



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**CAMPUS CAMPOS DOS GOYTACAZES**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E**  
**BIOTECNOLOGIA APLICADA – PPGFBA**

**ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA DE MEIO DE CULTURA**  
**PARA MICROPROPAGAÇÃO DE**  
**CANA-DE-AÇÚCAR [*Saccharum* spp.]**

**KAROLYNNE DA COSTA PINHO**

*Sob a orientação do Professor*  
**Carlos Frederico de Menezes Veiga**

*e sob a coorientação da Professora*  
**Virgínia Silva Carvalho**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Ciências Agrárias.

Campos dos Goytacazes – RJ  
Março/2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
CAMPUS CAMPOS DOS GOYTACAZES  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E  
BIOTECNOLOGIA APLICADA – PPGFBA

KAROLYNNE DA COSTA PINHO

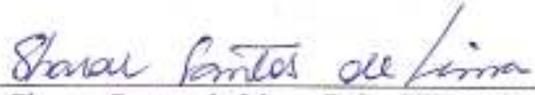
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Biotecnologia Aplicada.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 01/03/2012



---

Carlos Frederico de Menezes Veiga. D.Sc. UFRRJ/CCG  
(Orientador)



---

Sharon Santos de Lima. D.Sc. UFRRJ/IB/DB



---

Wagner Campos Otoni. D.Sc. UFV/CCBS/DBV

633.61

P654e

T

Pinho, Karolynne da Costa, 1986-  
Esterilização química de meio de cultura  
para micropropagação de cana-de-açúcar  
(Saccharum spp.) / Karolynne da Costa Pinho  
- 2012.  
48 f.: il.

Orientador: Carlos Frederico de Menezes  
Veiga.

Dissertação(mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de  
Pós-Graduação em Fitossanidade e  
Biotecnologia Aplicada.

Bibliografia: f. 42-46.

1. Cana-de-açúcar - Cultura e meios de  
cultura - Teses. 2. Cana-de-açúcar -  
Propagação in vitro - Teses. 3.  
Esterilização - Teses. I. Veiga, Carlos  
Frederico de Menezes, 1957- II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em  
Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada.  
III. Título.

Dedico aos amigos que acreditaram  
(mais do que eu) que seria possível:  
Thiago, Vanessa e Bruno.

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo e de todos, agradeço àquele que me deu clareza, força, determinação, paciência e sabedoria, sem as quais eu não seria capaz de continuar seguindo. Deus.

Aos meus pais, Belmiro de Almeida Pinho e Maria de Fátima Ferreira da Costa, e irmã, Katherynne da Costa Pinho, por todos os problemas, brigas e frustrações já apresentados a mim, que me fizeram crescer e lutar.

Ao Thiago, mais do que meu noivo, meu amor e amigo, pela paciência, pelas palavras e pelo amor; sem você, nada faria sentido.

À Professora Elen e ao Roberto, do PPGFBA, por todo o apoio, disposição e trabalho duro.

Ao orientador, prof. Frederico, e à coorientadora, prof<sup>a</sup>. Virgínia, pelos ensinamentos e pelo longo ano de trabalho.

Às duas melhores amigas de laboratório que qualquer mestrando já teve – Roberta e Verônica – pelo suporte, pelas conversas, pelos risos, pelos almoços e pela cumplicidade.

A todas as pessoas do *Campus* de Campos dos Goytacazes pelo carinho, preocupação e caronas: Oto, Roberto e Alberto (os “meninos do laboratório”), Gil, Élvio, prof. Jair, prof. Mauri, Solange, Carlinhos, Djalminha, Fernanda, Jorge, Anderson e todos os outros seguranças do *Campus*.

Aos amigos confidentes, de ontem, de hoje e de sempre, pela disposição em ouvir (ou ler) e pelas palavras de ânimo e carinho: Igor, Lorryne, Débora, Duane, Soraia, Fábio, Roxanne, Vanessa, Flávio, Juliana, Bruno, Dalton, Mel, Racca, Marquinhos, Jackeline, Cristiano, Leonardo, João Paulo, Karina, Ana, Marilda e Joyce.

À Alice Suto, pelo sorriso mais gordo, bochechudo e gostoso do mundo, que me fez, em muitos momentos, esquecer as frustrações.

A toda a equipe e membros do fórum Magical Quill/RPG Hienart/Clube do Slugue.com, por entenderem minha ausência e por todas as energias positivas enviadas.

A toda a Armada Potterish, pelas risadas e debates de todos os dias.

A CAPES pelo financiamento. Sem isso, não seria possível sequer começar.

## RESUMO

COSTA-PINHO, Karolynne. Esterilização química do meio de cultura para micropropagação de cana-de-açúcar [*Saccharum* spp.]. 2012. 47 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2012.

A utilização de técnicas alternativas que possibilitem a esterilização dos meios de cultivo, aliada ao bom desenvolvimento dos explantes, é de fundamental importância para garantir a elevada produção de plantas micropropagadas em laboratórios comerciais, de forma economicamente viável. Objetivando substituir o método de esterilização por autoclavagem pela esterilização química de meios de cultura, de vidrarias e de utensílios, testaram-se produtos e metodologias potenciais para viabilizar um protocolo de esterilização química que permita a produção em larga escala de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar, oriundas de cultura de ápices caulinares, com reduzido custo de produção. As técnicas de esterilização química consistiram em preparar meio MS esterilizados com *clor•in*<sup>®</sup>, hipocloritos de sódio (NaClO) e de cálcio (Ca(ClO)<sub>2</sub>), às seguintes concentrações: 0,0003, 0,0006 e 0,0009% de cloro ativo total. Os experimentos contaram ainda com dois controles – autoclave e sem esterilização. Foram utilizadas dez repetições (frascos) por tratamento, contendo 40mL de meio de cultura do respectivo tratamento, onde os explantes foram inoculados. Para testar os hipocloritos, utilizou-se a cultivar RB99395, em seu 4º subcultivo; já para o *clor•in*<sup>®</sup>, utilizou-se a RB952890 (3º subcultivo). Anteriormente à realização de qualquer trabalho, toda a área do laboratório foi higienizada com NaClO a 2%. A contaminação foi monitorada ao longo dos 20 dias de duração de cada experimento, e passado esse tempo, foram tomados os seguintes dados das repetições que não apresentaram contaminação: altura, número de perfilhos e biomassas fresca e seca. Para a esterilização com hipocloritos, dentre os tratamentos contaminados (sem esterilização, 0,0003, 0,0006 e 0,0009% Ca(ClO)<sub>2</sub>), houve predominância de contaminantes de origem fúngica. No mesmo experimento, o NaClO apresentou potencial para viabilizar um novo protocolo de esterilização química no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar cultivar RB99395, já a partir de 0,0003% de c. a. total, pois os explantes inoculados nestes tratamentos apresentaram maior desenvolvimento quando comparadas ao controle autoclavado. Quando se testou o *clor•in*<sup>®</sup>, toda a contaminação observada foi de origem fúngica, sendo que apenas o controle sem esterilização apresentou contaminação em todas as amostras. Após as análises de desenvolvimento dos explantes obtidos através desta metodologia de esterilização, foi possível sugerir o uso deste produto como alternativa para o controle da contaminação no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar cultivar RB952890, visto que apresentou o mesmo nível de controle das amostras autoclavadas. Contudo, observou-se baixo desenvolvimento das plântulas inoculadas em meio MS esterilizado com este produto, nas três concentrações de c. a. total, sugerindo a possibilidade de haver influência fitotóxica de algum componente do produto. Apesar de os produtos mostrarem potencial para o desenvolvimento de novos protocolos de esterilização, há a necessidade de efetuar novos ensaios, não apenas para o ajuste das metodologias, como também para oferecer maior respaldo experimental para o desenvolvimento de um novo – e definitivo – protocolo de esterilização, substituindo a autoclavagem pela adição de produtos químicos ao meio nutritivo, reduzindo, assim, o custo das plântulas de cana-de-açúcar produzidas em laboratórios comerciais por técnicas de cultura de tecidos *in vitro*.

**Palavras-chave:** hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, *clor•in*<sup>®</sup>, mudas.

## ABSTRACT

COSTA-PINHO, Karolynne. Chemical sterilization of culture medium for micropropagation of sugar cane [*Saccharum* spp.]. 2012. 47 p. Dissertation (Master Science in Phytosanitary and Applied Biotechnology). Institute of Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2012.

The use of alternative and reliable techniques that allow the sterilization of culture media along with the adequate development of the explants is important to attend the demands for large production of micropropagated plants in commercial laboratories, in an economically viable means. Aiming to replace the conventional method of sterilization by autoclaving for chemical sterilization of culture media, glassware and utensils, we tested products and methodologies to enable a potential chemical sterilization protocol that allows large-scale production of micropropagated seedlings of sugarcane, derived from culture of the shoot apex, with reduced production costs. Chemical sterilization techniques consisted of MS medium prepared with clor•in<sup>®</sup>, sodium and calcium hypochlorites (NaClO and Ca(ClO)<sub>2</sub>), at the following concentrations of total active chlorine (a.c.): 0.0003, 0.0006 and 0.0009%. The experiments also counted with two controls - autoclave and none sterilization. Ten replicates were used (bottles) per treatment, containing 40 mL of culture medium of their treatment, in which the explants were cultured. The cultivar RB99395 in its 4th subculture, was used to test hypochlorites, whereas 'RB952890' (in its 3rd subculture) was used to test clor•in<sup>®</sup>. Prior to performing any work, all the laboratory area was sterilized with NaClO 2%. Contamination was monitored throughout the 20-day duration of each experiment, and after that time, the following data were taken from repetitions that were not contaminated: height, tillering number, fresh biomass and dry biomass. For sterilization with hypochlorite, from the contaminated treatments (without sterilization, 0.0003, 0.0006 and 0.0009% Ca(ClO)<sub>2</sub>) the predominance of fungal contaminants. In the same experiment, sodium hypochlorite has the potential to enable a new protocol of chemical sterilization of *in vitro* cultivation of sugar cane RB99395, from the 0.0003% total a. c., since the explants inoculated these treatments had higher development compared to the control autoclaved. When tested clor•in<sup>®</sup>, all contamination were observed of fungal origin, and only the control showed total contamination without sterilization. After the analysis of development of explants obtained through this methodology of sterilization, we can suggest the use of this product as an alternative to contamination control of *in vitro* cultivation of sugar cane RB952890 since had the same level of control autoclaved. However, there was a low development of plants inoculated in MS medium sterilized with this product, at the three concentrations of total a. c. total, suggesting the possibility of a phytotoxic effect of a component of the product. Although the products show potential for the development of new sterilization protocols, there is still the need to perform further tests, not just for adjusting the methodologies as well as to provide greater support for the development of experimental a new - definitive - sterilization protocol, by replacing the addition of chemicals to the nutrient medium, thus lessening the final costs of the cane sugar vitroplants in commercial laboratories produced by techniques of *in vitro* tissue culture.

**Keywords:** sodium hypochlorite, calcium hypochlorite, clor•in<sup>®</sup>, seedlings.

## LISTA DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS

**Figura 1.** Taxas de contaminações do experimento. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste do Qui-Quadrado, a 5% de significância. Onde: controles – T1 = autoclave; T2 = sem esterilização; hipoclorito de sódio – T3 = 0,0003% c. a. total; T4 = 0,0006% c. a. total; T5 = 0,0009% c. a. total; hipoclorito de cálcio – T6 = 0,0003% c. a. total; T7 = 0,0006% c. a. total; T8 = 0,0009% c. a. total.

**Figura 2.** Dinâmica da contaminação fúngica nos tratamentos afetados. Onde: controles – T1 = autoclave; T2 = sem esterilização; hipoclorito de sódio – T3 = 0,0003% c. a. total; T4 = 0,0006% c. a. total; T5 = 0,0009% c. a. total; hipoclorito de cálcio – T6 = 0,0003% c. a. total; T7 = 0,0006% c. a. total; T8 = 0,0009% c. a. total.

**Figura 3.** Dinâmica da contaminação bacteriana nos tratamentos. Onde: controles – T1 = autoclave; T2 = sem esterilização; hipoclorito de sódio – T3 = 0,0003% c. a. total; T4 = 0,0006% c. a. total; T5 = 0,0009% c. a. total; hipoclorito de cálcio – T6 = 0,0003% c. a. total; T7 = 0,0006% c. a. total; T8 = 0,0009% c. a. total.

**Figura 4.** Altura média (cm) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB99395 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

**Figura 5.** Número médio de perfilhos de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB99395 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

**Figura 6.** Biomassa fresca média (g) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB99395 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

**Figura 7.** Biomassa seca média (g) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB99395 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

**Figura 8.** Tratamento 1 (controle autoclave).

**Figura 9.** Tratamento 3 (NaClO – 0,0003% c. a. total).

**Figura 10.** Tratamento 4 (NaClO – 0,0006% c. a. total).

**Figura 11.** Tratamento 5 (NaClO – 0,0009% c. a. total).

**Figura 12.** Taxas de contaminações do experimento. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste do Qui-Quadrado, a 5% de significância. Onde: controles – T1 = autoclave; T2 = sem esterilização; clor•in<sup>®</sup> - T3 = 0,0003% c. a. total; T4 = 0,0006% c. a. total; T5 = 0,0009% c. a. total.

**Figura 13.** Dinâmica da contaminação fúngica nos tratamentos afetados. Onde: controles – T1 = autoclave; T2 = sem esterilização; clor•in<sup>®</sup> - T3 = 0,0003% c. a. total; T4 = 0,0006% c. a. total; T5 = 0,0009% c. a. total.

**Figura 14.** Altura média (cm) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB952890 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de clor•in<sup>®</sup> no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

**Figura 15.** Número médio de perfilhos de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB952890 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de clor•in<sup>®</sup> no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

**Figura 16.** Biomassa fresca média (g) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB952890 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de clor•in<sup>®</sup> no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

**Figura 17.** Biomassa seca média (g) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB952890 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de clor•in<sup>®</sup> no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

**Figura 18.** Tratamento 1 (controle autoclave).

**Figura 19.** Tratamento 3 (clor•in<sup>®</sup> – 0,0003% c. a. total).

**Figura 20.** Tratamento 4 (clor•in<sup>®</sup> – 0,0006% c. a. total).

**Figura 21.** Tratamento 5 (clor•in<sup>®</sup> – 0,0009% c. a. total).

**Tabela 1.** Substâncias complementares ao meio MS utilizado no desenvolvimento das plântulas de cana-de-açúcar, conforme proposto por Lee (1986).

**Tabela 2.** Volumes das soluções-estoque de NaClO 2% e Ca(ClO)<sub>2</sub> 2% utilizados na preparação dos tratamentos.

**Tabela 3.** Volume final de meio esterilizado por pastilha de clor•in<sup>®</sup> em cada tratamento.

**Tabela 4.** Número e porcentagem de culturas de cana-de-açúcar cultivar RB99395 contaminadas em função da concentração de c. a. total (%) adicionado ao meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste do Qui-Quadrado, a 5% de significância.

**Tabela 5.** Número e porcentagem de culturas de cana-de-açúcar cultivar RB952890 contaminadas em função da concentração de c. a. total (%) adicionado ao meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste do Qui-Quadrado, a 5% de significância.

## LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	marca comercial registrada
BAP	6-benzilaminopurina
c. a.	cloro ativo
Ca(ClO) <sub>2</sub>	hipoclorito de cálcio
MS	meio de cultura desenvolvido por Murashige e Skoog, em 1962
NaClO	hipoclorito de sódio
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

## LISTA DE ANEXOS

**Anexo I** – Avaliações de crescimento das plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB99395 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de hipoclorito de sódio no meio de cultura. As médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

**Anexo II** – Avaliações de crescimento das plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB952890 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de clor•in<sup>®</sup> no meio de cultura. As médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	11
<b>2 OBJETIVOS</b>	14
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b>	15
3.1 Contaminação	15
3.2 Desinfestação dos Explantes	15
3.3 Esterilização do Meio de Cultura	17
3.3.1 Esterilização Física	17
3.3.2 Esterilização Química	18
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	21
4.1 Condução dos Experimentos	21
4.2 Esterilização do Ambiente de Trabalho	23
4.3 Preparo de Soluções-Estoque e Soluções Esterilizantes	23
4.4 Esterilização de Instrumentos e Preparo de Meio MS	24
4.5 Esterilização Química	24
4.6 Distribuição do Meio de Cultura nos Frascos	25
4.7 Esterilização Física	26
4.8 Subcultivo de Material Vegetal	26
4.9 Delineamento Experimental	27
4.10 Coleta de Dados	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	28
5.1 Utilização de Hipocloritos de Sódio e de Cálcio como Esterilizantes Químicos de Meio de Cultura de Cana-de-Açúcar Cultivar RB99395	28
5.2 Utilização de clor•in® como Esterilizante Químico de Meio de Cultura de Cana-de-Açúcar Cultivar RB952890	35
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	40
<b>7 PERSPECTIVAS</b>	41
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	42
<b>ANEXOS</b>	47

## 1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à família Poaceae, tem origem na Oceania e na Ásia e é uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo tropical, gerando centenas de milhares de empregos diretos e indiretos. Sua produção é de grande importância como fonte de renda e desenvolvimento, pois é matéria-prima para a fabricação de açúcar, etanol e aguardente, além de forrageira na forma *in natura* (SANTOS *et al.*, 2010). Sua produção mundial atual chega a 74,5 toneladas por hectare (NASTARI, 2010) e seu produto mais explorado comercialmente, e o mais valioso, é a sacarose, pois dela pode-se obter açúcar e álcool etílico.

A baixa eficiência dos métodos de produção de mudas de cana-de-açúcar torna sua propagação inicial lenta e seu custo elevado, inviabilizando a utilização de variedades melhoradas pelos produtores de menor poder aquisitivo (KÖPP *et al.*, 2009).

A micropropagação (ou propagação vegetativa *in vitro*) vem sendo utilizada para reduzir o tempo na produção de mudas de boa qualidade e livres de doenças (MONTARROYOS, 2000). Esta é uma das técnicas do cultivo *in vitro* que apresenta maior aplicação no agronegócio, no qual várias frutíferas, hortaliças, ornamentais e arbóreas podem ser multiplicadas gerando grande número de mudas em curto intervalo de tempo, tanto em pequenos laboratórios de pesquisa como de forma comercial, disponibilizando aos produtores mudas semelhantes à planta matriz, com qualidade genética e fitossanitária (SOUZA & JUNGHANS, 2006).

Normalmente, antes da utilização desta técnica, além dos 10 ou 15 anos de seleção, eram requeridos mais alguns anos para se estabelecer as novas cultivares em plantios comerciais (DONATO *et al.*, 2005).

A utilização do processo de limpeza clonal a partir da cultura de ápices meristemáticos não garante totalmente a sanidade do material trabalhado (LIU, 1989; TORRES *et al.*, 1998).

A contaminação do meio de cultura por microrganismos é conhecida como um dos mais sérios problemas da cultura de tecidos de plantas (KNEIFEL & LEONHARDT, 1992). Na maioria das vezes, essa contaminação é proveniente de bactérias endofíticas.

Mas, em muitos casos, as fontes contaminantes não são determinadas com facilidade. Entretanto, as mais comuns são associadas aos micro-organismos do ambiente e do indivíduo manipulador (LEIFERT *et al.*, 1994). As contaminações em laboratório desse tipo podem ser provenientes de várias fontes, como: correntes de ar, partículas do solo carregando esporos e células de micro-organismos que penetram nos locais de trabalho pelos condicionadores de ar, podendo ser também transportadas e introduzidas pelos seres humanos, permanecendo no ambiente em condições de assepsia inadequada. Outros equipamentos que podem introduzir a contaminação são aqueles destinados aos tratamentos de água (deionizadores e destiladores, por exemplo), seja pela falta de manutenção ou por manuseio inadequado.

Além disso, há ainda a esterilização inadequada do meio de cultura, pinças, bisturis, vidrarias e outros materiais necessários e a desinfestação inadequada das plantas trazidas do campo, que podem contaminar as culturas (LOPES, 1996). A câmara de fluxo laminar é o principal local onde a maioria dos contaminantes pode ser introduzida por manipulação (CAPÓ, 1998).

Diante das vantagens apresentadas pelas técnicas de cultivo *in vitro*, elas tomaram uma direção comercial e surgiram as biofábricas. Devido ao elevado custo para a manutenção desses laboratórios, algumas pesquisas tem visado à automação do processo, buscando aumentar o rendimento das operações e, principalmente, reduzir os custos de produção em larga escala. A substituição da técnica de autoclavagem (BURGER, 1988), para esterilização de meios de cultivo, por outra mais econômica, tem sido apontada como principal fator para reduzir o consumo de energia, e assim desonerar a produção.

Neste sentido, a esterilização química do meio de cultura surge como uma alternativa viável. O emprego de agentes químicos como o hipoclorito de sódio – NaClO – ou cálcio – Ca(ClO)<sub>2</sub> – na esterilização em larga escala é evidenciado, devido ao vasto espectro de atividade biocida apresentado contra bactérias, fungos e vírus, além do fato de serem produtos de baixo custo (ESTRELA *et al.*, 2002).

Atualmente, os processos biotecnológicos utilizados para a produção agrícola seguem a tendência das necessidades do mercado nacional e mundial. Entretanto, a automação dos processos encarece o produto final, de modo que, hoje, observa-se que o grande desafio para a produção agrícola é exatamente reduzir os custos, mantendo, porém, a qualidade do produto.

O uso de cultivares melhoradas de cana-de-açúcar adaptadas às condições edafoclimáticas locais constitui um insumo de grande retorno, tendo em vista que o custo para o plantio de uma cultivar de maior potencial genético é praticamente o mesmo de uma cultivar tradicional (VEIGA, 2000). Em diagnóstico da cadeia produtiva da cana-de-açúcar do Estado do Rio de Janeiro, Veiga *et al.* (2006) constataram que entre os produtores de cana-de-açúcar da região do Norte Fluminense, ocorre o predomínio de uma cultivar, a RB72454, que ocupa 49,8% da área cultivada, o que aumenta os riscos e dificulta o manejo da cultura.

Devido à pequena disponibilidade inicial de mudas, são gastos de 3 a 4 anos para que cultivares recém-liberadas pelos Programas de Melhoramento Genético alcancem áreas comerciais, constituindo grande perda econômica se considerarmos as altas produções que poderiam ser alcançadas pelas mesmas, podendo ocorrer em alguns casos um precoce processo degenerativo por meio das contínuas contaminações que ocorrem no plantio de campo (LEE, 1986, 1987; WALKER *et al.*, 1991). Assim, a produção de mudas em larga escala e curto espaço de tempo torna-se de grande valor para reduzir o tempo entre a produção de uma nova cultivar e o seu efetivo cultivo em grandes áreas. A produção massiva de mudas já pode ser conseguida em biofábricas, porém a um custo ainda elevado, em instalações que utilizam técnicas tradicionais, como a esterilização física em autoclaves de meios de cultura e de utensílios.

Assim, a utilização de técnicas alternativas que possibilitem a esterilização dos meios de cultivo aliada ao bom desenvolvimento dos explantes é, portanto, de fundamental importância para garantir elevada produção de plantas micropropagadas em laboratórios comerciais, de forma economicamente viável (SILVA *et al.*, 2010).

Por meio da experimentação de diferentes produtos esterilizantes no meio de cultura, há possibilidade de elaborar novos protocolos que viabilizem maior disponibilização de mudas de elevada qualidade fitossanitária de cultivares com maior potencial genético para produtores de cana-de-açúcar do Estado do Rio de Janeiro a preços mais acessíveis, principalmente para os produtores de menor poder aquisitivo.

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo testar produtos e metodologias com potencial para viabilizar um novo protocolo de esterilização química de meio de cultura que permita a produção em larga escala de mudas micropropagadas de cana-de-açúcar, oriundas de cultura de ápice caulinar, com reduzido custo de produção, quando comparado ao custo de mudas produzidas com o protocolo convencional de esterilização física por autoclavagem.

Desta forma, pode-se ampliar o potencial de utilização desta técnica, como ferramenta de disseminação de novas cultivares, além de substituir o tradicional método de esterilização física de vidrarias, instrumentos, água e meio de cultura, por esterilização química, adicionando esterilizantes como hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio e clor•in<sup>®</sup> ao meio nutritivo e realizando a lavagem dos instrumentos e vidrarias em soluções cloradas.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Contaminação

A contaminação é uma das maiores barreiras para o cultivo *in vitro* de tecidos de plantas. Além da manipulação humana das mudas e da falta de assepsia no laboratório, outras fontes que podem promover a entrada de contaminantes no ambiente são os equipamentos. Nesse sentido, Oliveira *et al.* (2007) avaliaram e caracterizaram os níveis de contaminação microbiana nos diferentes ambientes do laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal da Embrapa Agroindústria Tropical, por meio de distribuição aleatória de placas de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) abertas para exposição do meio durante 60 minutos, que logo após, foram fechadas e mantidas em sala de incubação. Após a contagem e o isolamento das culturas microbianas, os fungos isolados foram identificados. Os autores concluíram que os ambientes do laboratório apresentaram diferentes níveis de contaminação, sendo a capela de fluxo laminar, quando ligada, um local completamente asséptico. Há ainda a sugestão de manter o grau de limpeza do laboratório elevado, controlar a entrada de pessoas nos ambientes que exigem maior assepsia e utilizar métodos preventivos de controle, como a limpeza dos autoclaves e a troca dos filtros das câmaras de fluxo laminar.

#### 3.2 Desinfestação dos Explantes

Alguns dos agentes químicos utilizados para desinfestação de explantes são: cloreto de mercúrio, ácido clorídrico, cloreto de benzalcônio, peróxido de hidrogênio e, os mais comumente utilizados como hipoclorito de cálcio e de sódio (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998), onde suas concentrações variam de acordo com o tipo do explante.

A assepsia dos explantes é uma das etapas cruciais da micropropagação, pois é responsável pela eliminação superficial de micro-organismos epifíticos e endofíticos antes de sua inoculação no meio nutritivo. Deve ser feita em ambiente esterilizado, utilizando-se câmara de fluxo laminar e agentes assépticos, químicos e físicos (SOUZA & JUNGHANS, 2006). Entretanto, dentre as etapas da micropropagação, a desinfestação tem apresentado baixa eficiência, pois deve eliminar os micro-organismos do tecido vegetal sem danificar e inviabilizar o mesmo (KÖPP *et al.*, 2009).

Morejón *et al.* (1985) realizaram ensaios para avaliar a eficiência da desinfestação de explantes, utilizando os seguintes desinfestantes: peróxido de hidrogênio 12% (v/v) por 5, 10 e 15 minutos; ácido peracético 0,1% e 0,2% (v/v) por 1, 2 e 5 minutos; e hipoclorito de sódio 3% e 4,5% (v/v), por 15, 20, 25 e 30 minutos. A avaliação dos resultados se deu por meio do balanço entre a porcentagem de desinfestação e o dano causado aos tecidos pelas substâncias utilizadas. Os autores concluíram que, dentre todas as combinações testadas, o peróxido de hidrogênio (a 12% (v/v) e por 10 minutos) foi o mais eficiente, principalmente devido ao menor nível de danos causados aos tecidos vegetais.

Köpp *et al.* (2009) avaliaram a eficiência de desinfestação de três agentes desinfestantes para explantes de cana-de-açúcar de quatro genótipos (Santa Isabel, São José, IAC862480 e IAC862210), que foram imersos em álcool 70% por cinco minutos, e logo após, submetidos aos agentes de desinfestação, seguindo a metodologia descrita por Sousa *et al.* (2007): hipoclorito de sódio 1% por 30 minutos, cloreto de benzalcônio 0,1% e cloreto de mercúrio 1%, ambos por 20 minutos. Posteriormente, os explantes passaram por três enxágues em água destilada estéril e foram transferidos para meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), contendo 2 $\mu$ M de BAP e 1 $\mu$ M de ANA, 3% de sacarose e 0,6% de ágar. Passados 15 dias após a introdução, os autores realizaram avaliações de contaminação, sobrevivência e oxidação nos explantes e concluíram que a eficiência do agente desinfestante depende do genótipo de cana-de-açúcar. Entretanto, recomendam a utilização de cloreto de mercúrio 1% por 30 minutos, pois foi o agente que apresentou a melhor eficiência na desinfestação da maioria dos genótipos.

Ferreira *et al.* (2010) avaliaram a ação do hipoclorito de sódio e de cálcio, com o objetivo de estabelecer um protocolo para a embriogênese somática de cana-de-açúcar da variedade RB872552. Segmentos de caule, depois de imersos em álcool 70% durante um minuto, foram submetidos a dois tratamentos de assepsia: hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos e hipoclorito de cálcio 1,5% por 20 minutos, ambos sob agitação constante. Após a assepsia, o agente utilizado foi removido por enxágue com tríplex lavagem em água destilada desionizada estéril. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio se mostrou um melhor descontaminante, por apresentar menor contaminação e maior índice de formação de calos.

### 3.3 Esterilização do Meio de Cultura

#### 3.3.1 Esterilização física

Os meios de cultura de tecidos são geralmente autoclavados a 121°C e a 1 atm por períodos de 20 a 30 minutos (PASQUAL, 2001). Esta técnica tem como vantagem a simplicidade e a velocidade do processo. Entretanto, além do elevado consumo de energia, a autoclavagem pode levar à degradação de componentes do meio de cultura, resultando inclusive na formação de compostos que podem ser tóxicos aos tecidos (RIBEIRO, 2006). Outras desvantagens são mudanças no pH, perda de atividade dos componentes do meio (PIERIK, 1990) e degradação, pelo calor, de compostos orgânicos como aminoácidos, vitaminas e alguns reguladores de crescimento (ácido giberélico, ácido abscísico, zeatina e ácido pantotênico), além de colchicina, antibióticos, extratos vegetais e algumas enzimas (PASQUAL, 2001; PIERIK, 1990).

Teixeira *et al.* (2005b) investigaram o uso do forno de micro-ondas para a esterilização de frascos de cultura contendo meio nutritivo BDA líquido. Contudo, os resultados mostraram que o uso do forno de micro-ondas tem eficiência elevada quando combinado com o uso de água tratada com peróxido de hidrogênio – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – ou com hipoclorito de sódio para o preparo do meio, além da exposição dos frascos a potências mais altas por período contínuo. Os autores observaram também que o efeito do forno micro-ondas foi letal para os fungos, independentemente da origem da água, enquanto que as bactérias mostraram elevada resistência a esta alternativa. A partir destas conclusões, Teixeira *et al.* (2005a) realizaram outros dois ensaios para esterilização em micro-ondas, onde o meio BDA foi acrescido de água sanitária (cujo princípio ativo é o hipoclorito de sódio) em diferentes concentrações. No primeiro experimento, a determinação final do pH foi realizada após a solidificação do ágar; no segundo, o ajuste ocorreu logo após o acréscimo do esterilizante (o ágar, previamente fundido, foi incorporado posteriormente e solidificou-se normalmente). Por meio destes experimentos, concluiu-se que a adição de hipoclorito de sódio, quando resulta na esterilização total do meio, é prejudicial à solidificação do ágar, mas quando permite a solidificação do agente geleificante, reduz o poder esterilizante do tratamento. Entretanto, como esses resultados foram obtidos em meio semisólido, onde a limitação se encontra na dificuldade da solidificação do ágar, seria interessante verificar a eficiência da adição de hipoclorito de sódio nessas diferentes concentrações no meio MS líquido.

### 3.3.2 Esterilização Química

#### a) Esterilizantes:

Griffings & Ray (1979), comparando hipoclorito de sódio com hipoclorito de cálcio, afirmam que este último apresenta a vantagem de ser menos tóxico para os tecidos vegetais. A ação germicida das soluções de hipoclorito se deve a alta capacidade oxidante desses compostos, atuando na destruição da atividade das proteínas celulares (TSAI *et al.*, 1998). Apesar de a oxidação ser um processo que pouco interfere no desenvolvimento do material vegetal e não contribui para o aparecimento de contaminações, esta dificulta a visualização caso esteja presente, aumentando a probabilidade de propagação da contaminação durante os sucessivos subcultivos (KÖPP *et al.*, 2009).

Snow (1985) relatou o emprego de peróxido de hidrogênio para reduzir a contaminação de meios de cultura para germinação de sementes de orquídea, enquanto que Yanagawa *et al.* (1995) obtiveram sucesso na inoculação de sementes de orquídea em meio de cultura em condições não assépticas – fora da câmara de fluxo laminar – 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 0,5%, após a inoculação das sementes.

Teixeira *et al.* (2006) avaliaram a esterilização do meio de cultura acrescido com hipoclorito de sódio e o comportamento *in vitro* do abacaxizeiro Smooth Cayenne *cv.* e não constataram contaminações a partir de 0,0003% de hipoclorito de sódio. Os autores concluíram que o esterilizante proporcionou um efeito benéfico no crescimento e na multiplicação do abacaxizeiro.

Ribeiro (2006), ao avaliar a influência da concentração de cloro ativo (c. a.) total no meio de cultura de *Ananas comosus* L. e de *Sequoia sempervirens* L., constatou que concentrações superiores a 0,0003% de c. a. total em meios de cultura semi-sólidos, submetidos a tratamento de fusão do agente gelificante, asseguram total esterilização do meio nutritivo. Dados positivos quanto à utilização de esterilização química também foram registrados por Matsumoto *et al.* (2007), por meio da adição de 0,02g.L<sup>-1</sup> de hipoclorito de sódio, na forma de água sanitária comercial, ao meio MS líquido ou semisólido, para cultivar brotos de bananeira *in vitro*, não contabilizando qualquer contaminação microbiana nestes meios.

Ribeiro *et al.* (2009), analisaram o desenvolvimento de calos em *Pfaffia glomerata* na presença de diferentes concentrações de sacarose (0, 10, 20, 30 e 40g.L<sup>-1</sup>) em meios esterilizados quimicamente e autoclavados (121°C por 15 minutos). Os meios que foram esterilizados quimicamente sofreram adição de 0,05% de hipoclorito de sódio, em ambiente não estéril. Os autores observaram que o processo de autoclavagem promoveu a decomposição da sacarose, levando à formação de furfural, entretanto, já que não houve diferenças significativas no desenvolvimento dos calos entre os meios autoclavados e esterilizados quimicamente, concluiu-se que as quantidades de furfural presentes nos meios de cultura autoclavados não afetaram negativamente o desenvolvimento. Tampouco a presença de cloro interferiu negativamente. Os autores afirmam que a utilização de processo químico para esterilização de meios de cultura na formação de calos em fáfia é vantajosa, pois apresentou os mesmos resultados da autoclavagem, mas em tempo reduzido e com menores custos.

Silva *et al.* (2010) compararam a eficácia da esterilização de meios de cultura utilizados na embriogênese somática de *S. officinarum* (variedade RB872552) pelo processo de autoclavagem e pela adição de hipoclorito de cálcio. Além disso, também avaliaram o desenvolvimento dos explantes cultivados nesses meios. Para tal, utilizaram oito tratamentos, onde os explantes foram inoculados em meio MS suplementado com sacarose (2% e 3%), combinado com 2,4-D (13,6µM) e BAP (1,1 e 2,2µM), respectivamente; ambos os meios foram submetidos à esterilização física (autoclavagem a 121°C por 20 minutos) ou química, pela adição de hipoclorito de cálcio em três diferentes concentrações (0,01, 0,02 e 0,04%). Apesar da ocorrência de contaminação em três tratamentos (um autoclavado e dois acrescidos de hipoclorito de cálcio a 0,01%), as autoras concluíram que a utilização de hipoclorito de cálcio para esterilização de meios de cultura para a indução da embriogênese somática em cana-de-açúcar é viável, especialmente nas concentrações de 0,01 e 0,02%, visto que, a concentração de 0,04% parece ser tóxica, pois houve redução no IFE (Índice de Formação de Embriões Somáticos).

## **b) Antibióticos:**

A utilização de antibióticos para o controle e erradicação de microrganismos contaminantes também acontece, podendo adicioná-los ao meio de cultura ou submetendo os explantes a banhos sob agitação, durante alguns dias (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). No entanto, o uso de antibióticos apresenta problemas, uma vez que eles podem apresentar níveis consideráveis de toxidez ao tecido vegetal (POLLOCK *et al.*, 1983; SCORTICHINI & CHIARIOTTI, 1988). Além disso, dificilmente se consegue eliminar completamente as bactérias, já que os antibióticos normalmente utilizados em cultura de tecidos vegetais possuem ação bacteriostática, e não bactericida (DONATO *et al.*, 2005).

Donato *et al.* (2005) desenvolveram um trabalho com o objetivo de eliminar bactérias endofíticas fixadoras de N<sub>2</sub>, presentes em plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro*, por meio do uso de dois antibióticos – amoxicilina e cefatoxima sódica – acrescentados ao meio MS. Os autores constataram que a amoxicilina foi o antibiótico mais eficiente na inibição do crescimento das bactérias *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. O uso dos antibióticos no meio de cultura nas concentrações empregadas foi eficiente para eliminar *A. diazotrophicus*, mas não para *Herbaspirillum* spp., onde funcionaram apenas como bacteriostáticos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Condução dos Experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do *Campus* Campos dos Goytacazes, da UFRRJ, no município de Campos dos Goytacazes, RJ.

Os diferentes tratamentos foram testados em plântulas das cultivares RB952890 (subcultivo 4) e RB99395 (subcultivo 3), cujas culturas já haviam sido previamente estabelecidas no laboratório, a partir da extração de ápices caulinares, mantidas por subcultivos de 15-20 dias, sob fotoperíodo de 16h e temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , em frascos transparentes com tampas ventiladas (Bio-Sama PP63), com capacidade de 400mL e vedados lateralmente com filme PVC (sem obstruir o filtro de passagem de ar), contendo 30mL de meio MS complementado com fito-reguladores (tabela 1) esterilizado por autoclavagem ( $121^\circ\text{C}$ , 1 atm) por 20 minutos.

**Tabela 1.** Substâncias complementares ao meio MS utilizado no desenvolvimento das plântulas de cana-de-açúcar, conforme proposto por Lee (1986).

<b>Ingredientes</b>	<b>(mg/L)</b>
<b>1. Vitaminas, hormônios e outros componentes orgânicos</b>	
Tiamina	1,0
Inositol	100
Cinetina	0,1
BAP	0,2
<b>2. pH</b>	<b>5,8</b>

A cultivar RB99395 foi utilizada para avaliar a eficiência da esterilização química utilizando hipocloritos de sódio e cálcio em três diferentes concentrações. Já a cultivar RB952890, foi utilizada para testar a viabilidade do produto comercial *clor•in*<sup>®</sup> como esterilizante químico de meio de cultura. Os resultados dos experimentos nas diferentes cultivares foram analisados separadamente; do mesmo modo, segue a apresentação dos dados obtidos neste trabalho.

A metodologia utilizada para a condução dos experimentos foi adaptada a partir de protocolo desenvolvido por Teixeira *et al.* (2005a), para preparo de meios de cultura utilizando hipoclorito de sódio como esterilizante químico.

Os tratamentos consistiram nas seguintes técnicas de esterilização:

- a) esterilização física (protocolo convencional) do meio de cultura por autoclavagem a 121°C e 1 atm, por 20 minutos (controle I),
- b) meio de cultura sem qualquer tipo de esterilização (controle II),
- c) esterilização química - NaClO a 0,0003% de c. a. total,
- d) esterilização química - NaClO a 0,0006% de c. a. total,
- e) esterilização química - NaClO a 0,0009% de c. a. total,
- f) esterilização química - Ca(ClO)<sub>2</sub> a 0,0003% de c. a. total,
- g) esterilização química - Ca(ClO)<sub>2</sub> a 0,0006% de c. a. total,
- h) esterilização química - Ca(ClO)<sub>2</sub> a 0,0009% de c. a. total,
- i) esterilização química - clor•in<sup>®1</sup> a 0,0003% de c. a. total,
- j) esterilização química - clor•in<sup>®</sup> a 0,0006% de c. a. total,
- k) esterilização química - clor•in<sup>®</sup> a 0,0009% de c. a. total.

A aferição das quantidades de cloro ativo total foram realizadas com auxílio de um clorímetro digital portátil CL800, da MS TECNOPON, baseado no método DPD, cuja faixa de medição vai de 0 a 5 ppm. O aparelho toma como controle a leitura do “branco” (água destilada), e logo após, realiza a leitura de 10mL da amostra desejada quando combinada com uma medida (colher-padrão que acompanha o aparelho) do reagente DPD (também presente no kit). Para aferição da concentração de c. a. total dos produtos utilizados, e em virtude de o aparelho trabalhar com uma faixa pequena de c. a. total, realizaram-se estimativas (com base em cálculos de concentração x volume) acerca da concentração de cada produto esterilizante, ou seja, amostras dos produtos eram diluídas com base na concentração estimada, aferidas, e a partir da medição realizada pelo aparelho, as ‘soluções-estoque’ de esterilizantes (ver subitem 3.3) eram produzidas, já com base na concentração real. Por exemplo, o hipoclorito de sódio utilizado, de acordo com o rótulo, continha de 4 a 6% de c. a. total. Estimou-se, inicialmente, que ele estaria à concentração de 5%. Portanto, para que se chegasse a 0,0005%, foi necessário adicionar 0,02mL do produto químico para uma solução de 200mL. Esta solução estaria a uma concentração de 0,0005% se o hipoclorito de sódio estivesse a 5%; entretanto, ao mensurar a concentração de c. a. total no clorímetro, este forneceu um valor de 2,20 ppm, mostrando que o hipoclorito de sódio, que inicialmente supôs-se estar a 5%, na verdade, estava a 2%.

---

<sup>1</sup> Ver subitem 4.5.

#### **4.2 Esterilização do Ambiente de Trabalho**

Foi seguido um protocolo de limpeza e esterilização das áreas do laboratório antes do preparo dos meios de cultura e das soluções esterilizantes. O piso do laboratório foi varrido e esfregado com pano embebido em água sanitária comercial (NaClO 2% p.v.); os topos das bancadas foram igualmente desinfestados; toda a vidraria e frascos de cultura foram lavados em água de torneira e enxaguados com solução de água clorada a 0,003% de c. a. total e estocados em bandejas sanitizadas, situadas na sala de preparo de meio.

#### **4.3 Preparo de Soluções-Estoque e Soluções Esterilizantes**

Para o preparo de meio de cultura MS, foram utilizadas soluções-estoque dos componentes do meio MS e das substâncias complementares propostas por Lee (1986).

A ‘solução-estoque’ de hipoclorito de cálcio, para uso imediato, foi preparada da seguinte forma: partindo-se de hipoclorito de cálcio granulado concentrado, a 65% de c. a. total; foram utilizados 30,77g por litro de solução-estoque, a fim de se obter uma solução a 2% (também foram realizadas aferições no clorímetro para avaliar a concentração de c. a. total).

No caso da esterilização com hipoclorito de sódio, a própria solução comercializada (VETEC 4-6% P.A.) já servia como ‘solução-estoque’, tendo sempre sido aferida a atual concentração de c. a. total, utilizando-se o clorímetro, antes de cada esterilização, em virtude da elevada volatilização do cloro nesse produto.

#### **4.4 Esterilização de Instrumentos e Preparo de Meio MS**

Antes do início do preparo do meio de cultura utilizado para todos os tratamentos, exceto para o meio que seria utilizado para o controle sem esterilização (II), erlenmeyers, béqueres, bastões, espátulas e outros utensílios necessários foram novamente enxaguados em solução de água clorada a 0,003% de c. a. total e deixados a escorrer em posição invertida; em seguida, alíquotas das soluções-estoque dos componentes do meio de cultura MS, dos demais componentes propostos por Lee (1986) foram adicionados em erlenmeyers – tendo sido um para cada tratamento.

#### 4.5 Esterilização Química

Após homogeneizar os componentes do meio de cultura, volumes específicos de soluções-estoque dos esterilizantes químicos foram adicionados para cada tratamento, onde metade desse volume foi adicionada antes da correção do pH, e metade, depois, como medida de reforço da esterilização, a fim de impedir uma possível contaminação proveniente do pHmetro (tabela 2).

**Tabela 2.** Volumes das soluções-estoque de NaClO 2% e Ca(ClO)<sub>2</sub> 2% utilizados na preparação dos tratamentos.

Tratamento	Volumes de esterilizante adicionados antes e depois da correção do pH / Volume de Meio
<b>1. Solução-estoque de NaClO 2%</b>	
0,0003%	75µL/L + 75 µL/L
0,0006%	150 µL/L + 150 µL/L
0,0009%	225µL/L + 225 µL/L
<b>2. Solução-estoque de Ca(ClO)<sub>2</sub> 2%</b>	
0,0003%	75 µL/L + 75µL/L
0,0006%	150µL/L + 150 µL/L
0,0009%	225µL/L + 225µL/L

Essa metodologia de reforço apenas não foi utilizada nos meios esterilizados com *clor•in*<sup>®</sup> (produto comercial amplamente distribuído em supermercados e hortifrutis, utilizado como desinfetante de água e para desinfecção de hortifrutícolas, cujo princípio ativo é o dicloro-S-triazinetrione de sódio) devido ao fato de este ser comercializado em pastilhas (125mg).

Passados 15 minutos da adição da primeira fração do esterilizante, já com o pH corrigido, a segunda fração do esterilizante foi adicionada. Essa divisão das frações dos esterilizantes foi baseada em um teste realizado anteriormente ao início dos experimentos, com o objetivo de verificar se este reforço, após o ajuste do pH, diferiria da medição inicial.

A partir disso, as correções de pH foram realizadas da seguinte forma: para os tratamentos cuja concentração de c. a. total foram 0,0003%, o pH foi ajustado inicialmente para 5,8, sem posterior prejuízo após a adição da segunda fração; para os tratamentos cuja concentração de c. a. total foi 0,0006%, o pH foi ajustado inicialmente para 5,7; e para os tratamentos cuja concentração de c. a. total foi 0,0009%, o pH foi ajustado inicialmente para 5,6. Todo esse processo teve como objetivo manter o pH final do meio de cultura em 5,8 para todos os tratamentos.

Nas esterilizações químicas utilizando-se o clor•in<sup>®</sup>, o processo de adicionar o reforço (como realizado com os hipocloritos) não foi utilizado, em virtude de o produto ser comercializado na forma de pastilhas de 125mg contendo 10% de c. a. total, ou seja, para cada tratamento, o ajuste foi realizado no volume final do meio (tabela 3); passados 15 minutos da adição do esterilizante, o pH foi corrigido para 5,8.

**Tabela 3.** Volume final de meio esterilizado por pastilha de clor•in<sup>®</sup> em cada tratamento.

Concentração final de c. a. total no meio de cultura após a adição do clor•in <sup>®</sup>	Volume de meio
0,0003%	4166ml
0,0006%	2083ml
0,0009%	1388ml

Os erlenmeyers contendo os meios de cultura foram mantidos vedados com filme PVC durante os 15 minutos de ação do agente químico, e após a adição da segunda fração de esterilizante, também foram assim mantidos até o momento de sua distribuição nos frascos, em câmara de fluxo laminar.

#### **4.6 Distribuição do Meio de Cultura nos Frascos**

Os frascos e as tampas ventiladas a serem utilizados para a distribuição do meio de cultura esterilizado quimicamente foram novamente enxaguados em solução de água clorada a 0,003% de c. a. total. Adicionou-se 40mL de meio em cada frasco imediatamente após essa lavagem, a fim de aproveitar o resíduo de cloro dessa lavagem. Os frascos foram tampados para logo em seguida serem utilizados para a inoculação dos explantes. Todo esse procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de pinças e bisturis autoclavado, por operador utilizando luvas, touca e máscara descartáveis.

A escolha dos frascos a serem utilizados e do volume de meio a ser adicionada a cada um, assim como a vedação lateral com filme PVC já mencionada do subitem 3.1, foi realizada após resultados obtidos por Barbosa *et al.* (2011), que comparou o uso de frascos ventilados com e sem vedação lateral e não ventilados.

#### **4.7 Esterilização Física**

O meio de cultura que foi esterilizado fisicamente foi mantido em autoclave, a 121°C e 1 atm, por 20 minutos. O autoclave somente foi aberto no momento da inoculação dos explantes, quando os frascos, que também continham 40ml de meio, foram imediatamente levados para a sala de transferência.

#### **4.8 Subcultivo do Material Vegetal**

Frascos contendo culturas *in vitro* de cana-de-açúcar das cultivares RB952890 e RB99395 foram selecionados na sala de crescimento, tendo sido utilizados apenas aqueles que, além de não apresentarem nenhum sintoma de contaminação por fungos ou bactérias, apresentavam o meio com o mínimo de oxidação e com perfilhos mais uniformes. Essa seleção foi feita a olho desarmado e apenas foram utilizadas, para cada experimento, mudas de um mesmo lote, ou seja, mesma cultivar, mesmo explante, mesma data e fase de subcultivo e mesmo manipulador.

Estes frascos selecionados foram levados para a sala de transferência, e abertos dentro da câmara de fluxo laminar, onde se retirou a touceira de cada frasco com auxílio de pinça e bisturi cirúrgico; cada touceira foi subdividida, e de cada uma foram utilizados 3 ou 4 novos explantes com aproximadamente 3cm de altura. Os explantes obtidos foram inoculados nos frascos contendo os 40mL de meio de cultura.

#### **4.9 Delineamento Experimental**

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições (10 frascos) para cada tratamento, onde cada frasco continha um explante.

Os dados de crescimento dos tratamentos não contaminados ao final de cada experimento (ver subitem 3.10) foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, a 5% de significância, adotando-se como hipótese nula que a diferença entre os tratamentos não influencia as características de crescimento das plântulas.

Os dados de contaminação foram submetidos ao teste do Qui-Quadrado, também a 5% de significância, admitindo-se como hipótese nula que a diferença entre os tratamentos não influencia a contaminação, onde estes foram testados dois a dois para verificar a semelhança estatística entre as taxas de contaminações.

#### **4.10 Coleta de Dados**

Passados 20 dias da instalação de cada experimento, a partir da data da inoculação dos explantes em cada tratamento, as plântulas cujos meios não apresentavam contaminação foram retiradas dos frascos e passaram pelas seguintes avaliações: altura, número de perfilhos, biomassa fresca e biomassa seca. Também foi realizado um registro fotográfico.

Ao longo dos 20 dias da manutenção dos experimentos, a contaminação foi monitorada com o objetivo de avaliar sua evolução.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

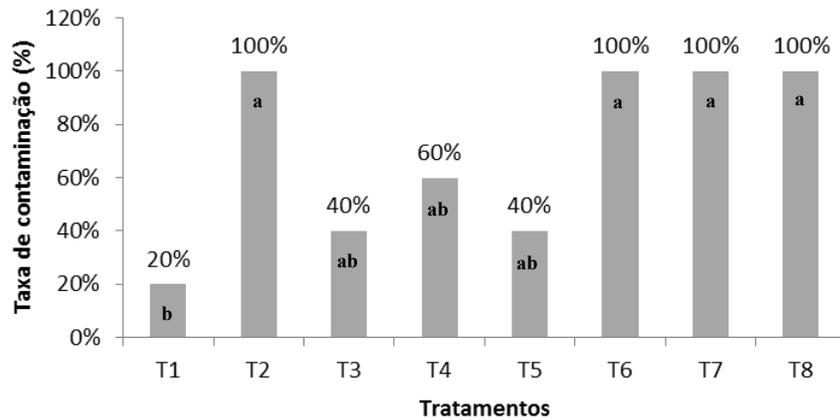
### 5.1 Utilização de Hipocloritos de Sódio e de Cálcio como Esterilizantes Químicos de Meio de Cultura de Cana-de-Açúcar Cultivar RB99395

Neste ensaio, não foram tomados dados de desenvolvimento dos tratamentos 2 (sem esterilização), 6 (0,0003% CaClO<sub>2</sub>), 7 (0,0006% CaClO<sub>2</sub>) e 8 (0,0009% CaClO<sub>2</sub>), em virtude destes tratamentos apresentarem sete ou mais amostras com contaminação visível, tendo sido assim, eliminadas, conforme mostra a tabela 4.

**Tabela 4.** Número e porcentagem de culturas de cana-de-açúcar cultivar RB99395 contaminadas em função da concentração de c. a. total (%) adicionado ao meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste do Qui-Quadrado, a 5% de significância.

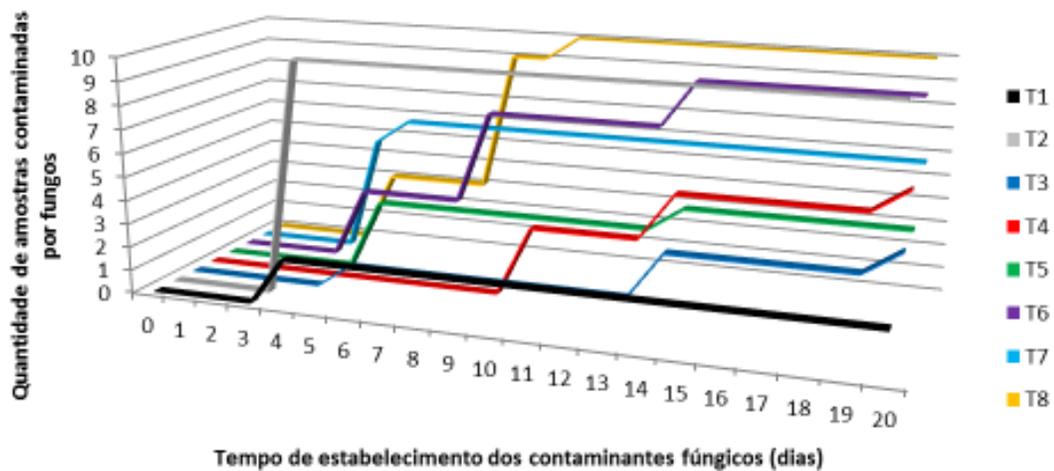
Tratamento	c. a. total adicionado ao meio de cultura (%)	Esterilizante utilizado	Número de culturas contaminadas
T1	0 (autoclavado)	-	2b
T2	0 (sem esterilização)	-	10a
T3	0,0003	NaClO	4ab
T4	0,0006	NaClO	6ab
T5	0,0009	NaClO	4ab
T6	0,0003	Ca(ClO) <sub>2</sub>	10a
T7	0,0006	Ca(ClO) <sub>2</sub>	10a
T8	0,0009	Ca(ClO) <sub>2</sub>	10a

A figura 1 exibe as taxas de contaminação em cada tratamento, testados dois a dois pelo Qui-Quadrado, a 5% de significância, em que houve diferenças estatísticas entre as taxas de 20% e 100% de contaminação.

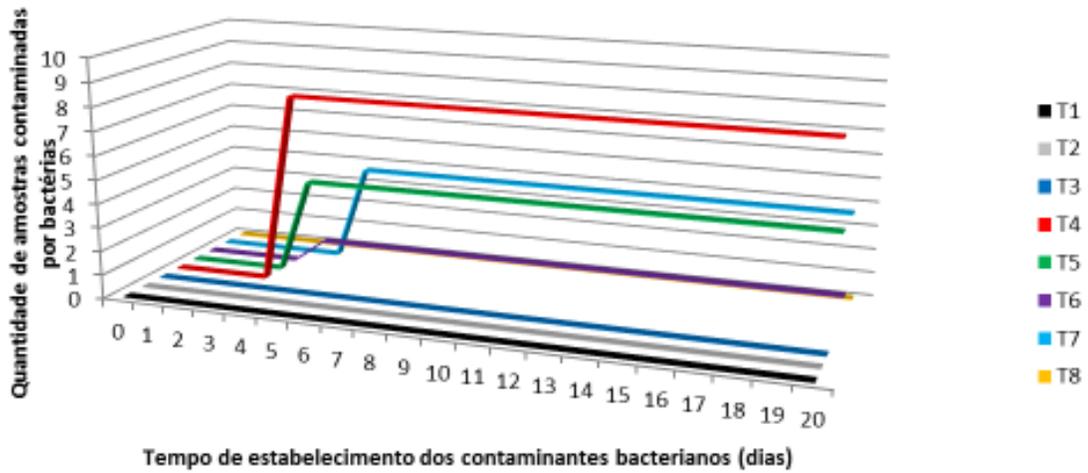


**Figura 1.** Taxas de contaminações do experimento. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste do Qui-Quadrado, a 5% de significância. Onde: controles – T1 = autoclave; T2 = sem esterilização; hipoclorito de sódio – T3 = 0,0003% c. a. total; T4 = 0,0006% c. a. total; T5 = 0,0009% c. a. total; hipoclorito de cálcio – T6 = 0,0003% c. a. total; T7 = 0,0006% c. a. total; T8 = 0,0009% c. a. total.

Apesar da total contaminação observada nos tratamentos com hipoclorito de cálcio e no tratamento sem esterilização, o experimento revelou o sucesso parcial da esterilização química utilizando-se hipoclorito de sódio a 0,0003% e a 0,0009% de c. a. total. As figuras 2 e 3 mostram a evolução da contaminação fúngica e bacteriana, respectivamente, por tratamento, onde é possível observar o predomínio de contaminantes de origem fúngica.

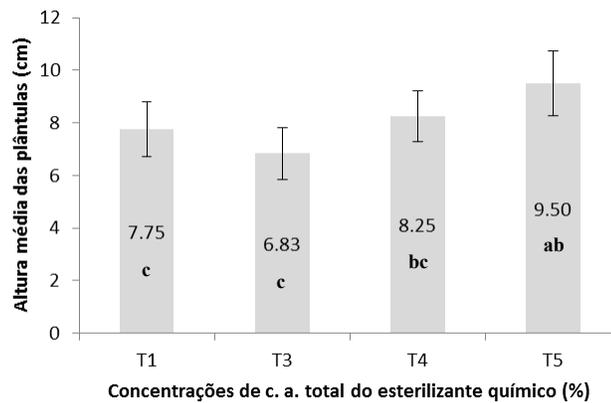


**Figura 2.** Dinâmica da contaminação fúngica nos tratamentos afetados. Onde: controles – T1 = autoclave; T2 = sem esterilização; hipoclorito de sódio – T3 = 0,0003% c. a. total; T4 = 0,0006% c. a. total; T5 = 0,0009% c. a. total; hipoclorito de cálcio – T6 = 0,0003% c. a. total; T7 = 0,0006% c. a. total; T8 = 0,0009% c. a. total.

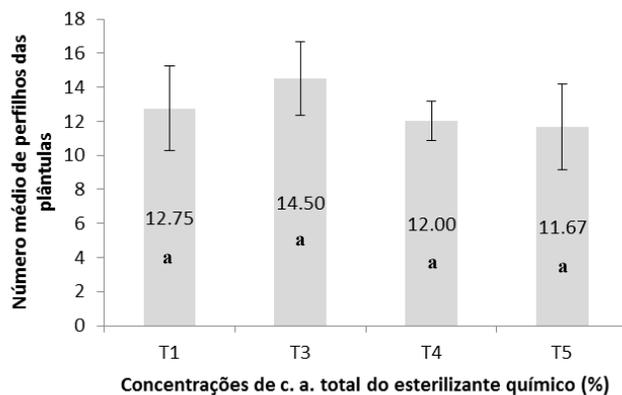


**Figura 3.** Dinâmica da contaminação bacteriana nos tratamentos. Onde: controles – T1 = autoclave; T2 = sem esterilização; hipoclorito de sódio – T3 = 0,0003% c. a. total; T4 = 0,0006% c. a. total; T5 = 0,0009% c. a. total; hipoclorito de cálcio – T6 = 0,0003% c. a. total; T7 = 0,0006% c. a. total; T8 = 0,0009% c. a. total.

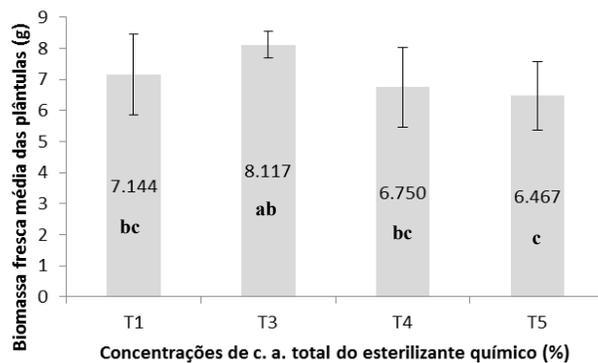
As figuras 4, 5, 6 e 7 são baseadas nas avaliações de crescimento dos tratamentos 1 (controle autoclave), 3 (NaClO – 0,0003% c. a. total), 4 (NaClO – 0,0006% c. a. total) e 5 (NaClO – 0,0009% c. a. total), presentes no anexo I.



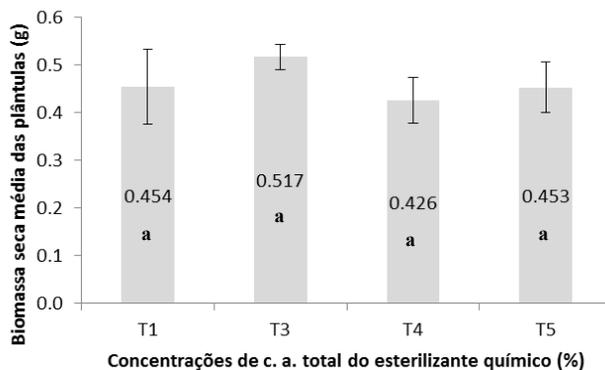
**Figura 4.** Altura média (cm) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB99395 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.



**Figura 5.** Número médio de perfilhos de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB99395 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.



**Figura 6.** Biomassa fresca média (g) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB99395 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.



**Figura 7.** Biomassa seca média (g) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB99395 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de hipoclorito de sódio no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

Em relação aos resultados apresentados na figura 4, após a comparação das médias pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ), observou-se que a altura média das plântulas dos tratamentos 1 (autoclave) e 3 (0,0003% NaClO) foram estatisticamente diferentes de T5 (0,0009% NaClO). Este fato pode sugerir influência positiva no crescimento das mudas conforme se aumenta a concentração de cloro ativo no meio de cultura, provavelmente, por permitir às plântulas uma melhor absorção dos nutrientes do meio. A figura 5 mostra que não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos analisados para a avaliação do perfilhamento, embora tenha havido uma tendência à redução do número de perfilhos com o aumento da concentração de cloro ativo. Tal fato se justifica devido a uma possível derivação de energia para o crescimento, acarretando, assim, o menor perfilhamento. Na análise da biomassa seca (figura 7), observou-se (assim como no perfilhamento) que os tratamentos foram estatisticamente semelhantes entre si. Já a análise de biomassa fresca, embora também tenha apresentado a mesma tendência observada nas avaliações anteriores, mostrou que o T3 (0,0003% NaClO) diferiu significativamente do T5 (0,0009% NaClO), em que este último tratamento deu origem às mudas com menor biomassa fresca do experimento.

Apesar da elevada taxa de contaminação, acima dos 10% admitidos em laboratórios comerciais, é possível sugerir a substituição da técnica convencional de autoclavagem, visto que os tratamentos esterilizados com hipoclorito de sódio exibem taxas de contaminação estatisticamente semelhantes ao tratamento autoclavado.

Por meio deste experimento, observou-se então, que o hipoclorito de sódio mostra potencial para viabilizar um novo protocolo de esterilização química do meio MS para o cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar, já a partir da concentração de 0,0003% de c. a. total.

Em virtude da semelhança estatística entre as taxas de contaminação dos tratamentos, a comparação do desenvolvimento das mudas nas análises realizadas fez-se necessária para que se possa, de fato, sugerir a substituição da técnica convencional de autoclavagem. Nesse sentido, devido ao fato de as plântulas dos tratamentos esterilizados quimicamente apresentarem um maior desenvolvimento, quando comparadas ao controle autoclave, mesmo tendo havido uma leve tendência de queda nesse desenvolvimento conforme se aumenta a concentração de c. a. total, pode-se sugerir a utilização do hipoclorito de sódio em um protocolo alternativo de esterilização química.

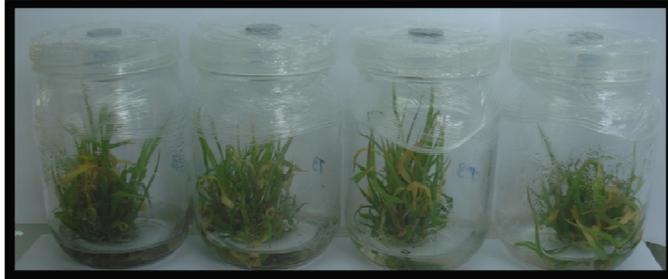
Os resultados apontam ainda a ineficiência da esterilização quando se utiliza o hipoclorito de cálcio, e isto pode ser devido à difícil solubilidade do produto utilizado no momento de preparar a ‘solução-estoque’ do esterilizante a partir dos granulados concentrados, característica que, inicialmente, pensou-se ser favorável à realização dos experimentos, pois, nesta forma, não há perda significativa no teor de c. a. total do produto quando estocado, diferentemente das soluções comercializadas de hipoclorito de sódio.

Para algumas culturas, como observado por Ribeiro (2006), a esterilização química mostra potencial para substituir a autoclavagem de meios de cultura e de vidrarias. Nesse sentido, como visto nesse trabalho, chegou-se à conclusão que a metodologia apresenta potencial para substituir a autoclavagem, todavia, devido aos elevados índices de contaminação dos meios esterilizados quimicamente, sugere-se que novas pesquisas sejam realizadas, a fim de ajustar metodologias com o objetivo de viabilizar um novo protocolo para a redução do custo das mudas de cana-de-açúcar micropropagadas.

As figuras 8, 9, 10 e 11 exibem algumas das plântulas do cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar cultivar RB99395, provenientes de quatro dos oito tratamentos realizados, utilizando-se hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,0003% c. a. total (T3), 0,0006% c. a. total (T4) e 0,0009% c. a. total (T5) como esterilizante químico, em comparação à técnica convencional de autoclavagem de meio de cultura (T1).



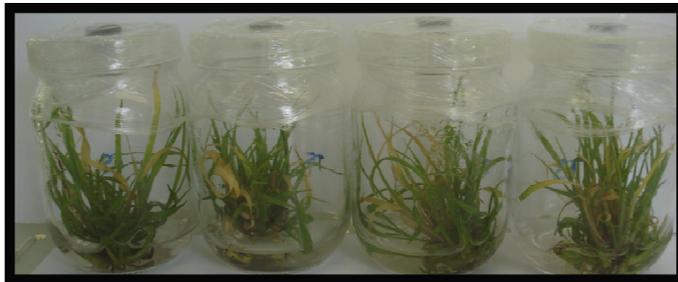
**Figura 8.** Tratamento 1 (controle autoclave).



**Figura 9.** Tratamento 3 (NaClO – 0,0003% c. a. total).



**Figura 10.** Tratamento 4 (NaClO – 0,0006% c. a. total).



**Figura 11.** Tratamento 5 (NaClO – 0,0009% c. a. total).

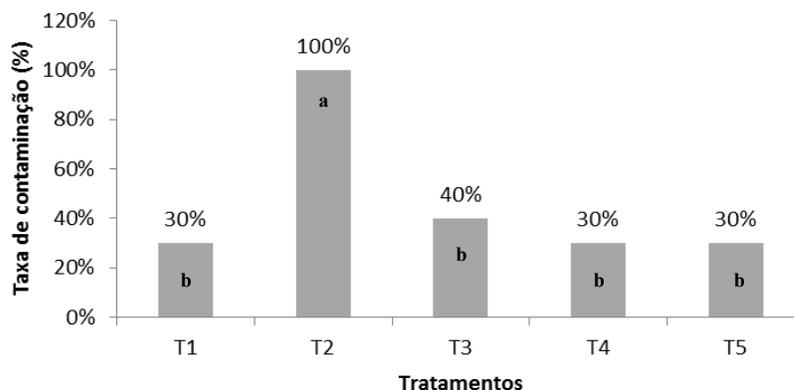
## 5.2 Utilização de clor•in® como Esterilizante Químico de Meio de Cultura de Cana-de-Açúcar Cultivar RB952890<sup>2</sup>

Neste ensaio, não foram tomados dados de desenvolvimento do tratamento 2 (não esterilizado), em virtude de todas as repetições apresentarem contaminação visível, tendo sido assim, eliminadas, conforme mostra a tabela 5.

**Tabela 5.** Número e porcentagem de culturas de cana-de-açúcar cultivar RB952890 contaminadas em função da concentração de c. a. total (%) adicionado ao meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste do Qui-Quadrado, a 5% de significância.

Tratamento	c. a. total adicionado ao meio de cultura (%)	Esterilizante utilizado	Número de culturas contaminadas
T1	0 (autoclavado)	-	3b
T2	0 (sem esterilização)	-	10a
T3	0,0003	clor•in®	4b
T4	0,0006	clor•in®	3b
T5	0,0009	clor•in®	3b

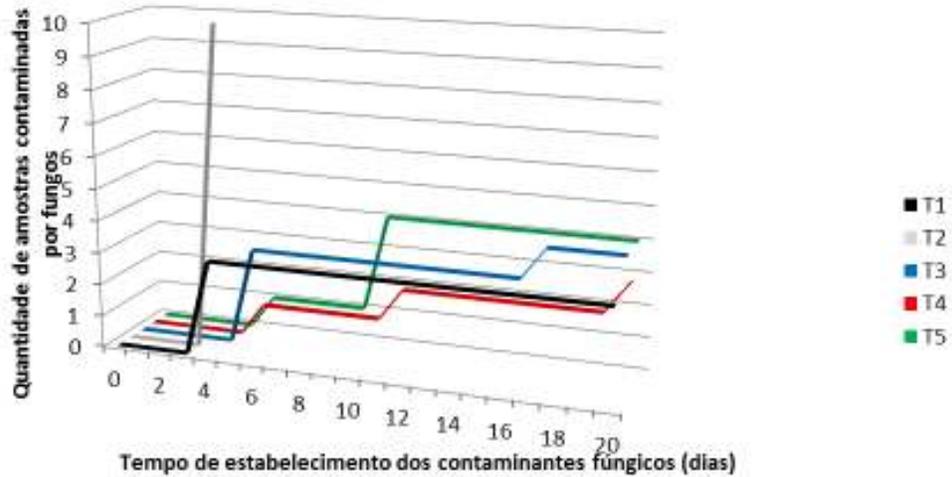
A figura 12 exibe as taxas de contaminação em cada tratamento, testados dois a dois pelo Qui-Quadrado, a 5% de significância, onde, pode-se observar que houve diferenças estatísticas entre as taxas de 30% e 40% quando comparadas a taxa de 100% de contaminação.



**Figura 12.** Taxas de contaminações do experimento. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste do Qui-Quadrado, a 5% de significância. Onde: controles – T1 = autoclave; T2 = sem esterilização; clor•in® - T3 = 0,0003% c. a. total; T4 = 0,0006% c. a. total; T5 = 0,0009% c. a. total.

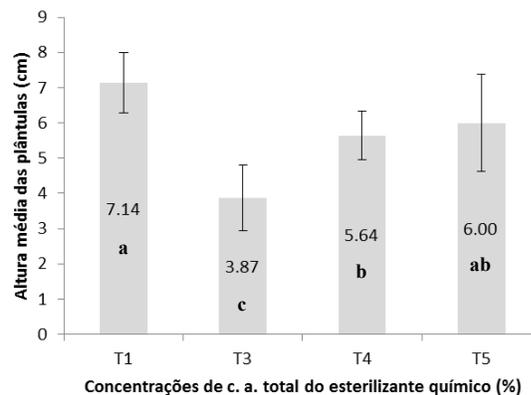
<sup>2</sup> Os resultados deste ensaio foram submetidos, aceitos e apresentados na forma de pôster no V Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, em Joinville, SC, sob autoria de COSTA-PINHO *et al.* (2011).

Apesar da elevada contaminação observada, o experimento revelou o sucesso parcial da esterilização química utilizando-se o *clor•in*<sup>®</sup>. A figura 13 mostra a evolução da contaminação fúngica por tratamento. Não se observou contaminação de origem bacteriana neste experimento.

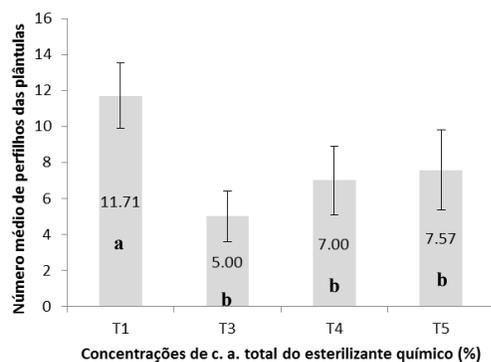


**Figura 13.** Dinâmica da contaminação fúngica nos tratamentos afetados. Onde: controles – T1 = autoclave; T2 = sem esterilização; *clor•in*<sup>®</sup> - T3 = 0,0003% c. a. total; T4 = 0,0006% c. a. total; T5 = 0,0009% c. a. total.

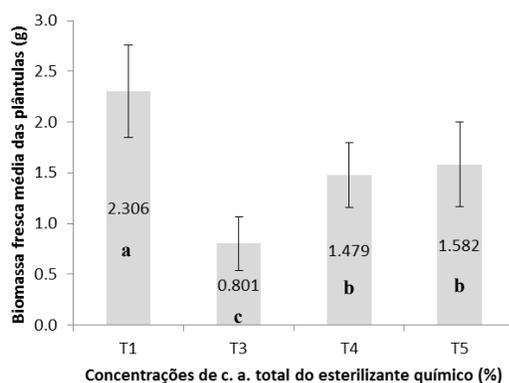
As figuras 14, 15, 16 e 17 são baseadas apenas nas avaliações de crescimento dos tratamentos 1 (controle autoclave), 3 (*clor•in*<sup>®</sup> – 0,0003% c. a. total), 4 (*clor•in*<sup>®</sup> – 0,0006% c. a. total) e 5 (*clor•in*<sup>®</sup> – 0,0009% c. a. total), presentes no anexo II.



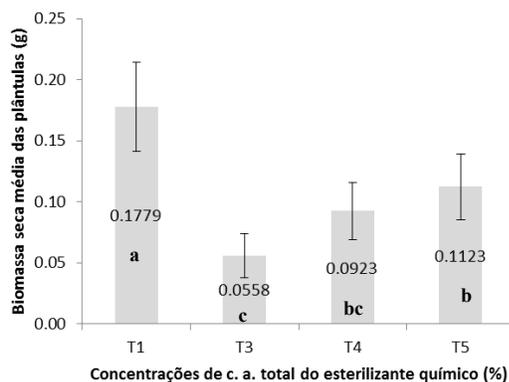
**Figura 14.** Altura média (cm) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB952890 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de *clor•in*<sup>®</sup> no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.



**Figura 15.** Número médio de perfilhos de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB952890 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de clor•in® no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.



**Figura 16.** Biomassa fresca média (g) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB952890 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de clor•in® no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.



**Figura 17.** Biomassa seca média (g) de plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB952890 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de clor•in® no meio de cultura. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

Em relação aos resultados apresentados nas figuras 14, 15, 16 e 17, observou-se que as mudas do T1 foram significativamente superiores às do T3 e do T4 em todas as análises, e de T5 em perfilhamento e biomassas fresca e seca; T4 foi semelhante a T5 em todas as análises. Já T3, foi estatisticamente semelhante à T4 e T5 apenas no perfilhamento.

Por meio deste experimento, é possível sugerir a utilização do *clor•in*<sup>®</sup> como alternativa para o controle da contaminação no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar, visto que apresentou o mesmo nível de controle das amostras esterilizadas pelo protocolo convencional (autoclave). Entretanto, o pouco desenvolvimento das plântulas quando inoculadas em meio MS esterilizado com este produto, nas três concentrações de c. a. total testadas, sugere a possibilidade de ter havido uma influência fitotóxica de algum componente do produto. Portanto, para recomendar a substituição da técnica convencional de autoclavagem pela esterilização química com *clor•in*<sup>®</sup>, ainda seria necessário realizar testes com menores concentrações de c. a. total.

As figuras 18, 19, 20 e 21 exibem algumas das plântulas do cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar, provenientes de quatro dos cinco tratamentos realizados, utilizando-se *clor•in*<sup>®</sup> nas concentrações de 0,0003% c. a. total (T3), 0,0006% c. a. total (T4) e 0,0009% c. a. total (T5) como esterilizante químico, em comparação à técnica convencional de autoclavagem de meio de cultura (T1).



**Figura 18.** Tratamento 1 (controle autoclave).



**Figura 19.** Tratamento 3 (clor•in® – 0,0003% c. a. total).



**Figura 20.** Tratamento 4 (clor•in® – 0,0006% c. a. total).



**Figura 21.** Tratamento 5 (clor•in® – 0,0009% c. a. total).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível obter assepsia de meios nutritivos mediante a adição de pequenas concentrações de hipocloritos de sódio e do produto comercial clor•in<sup>®</sup>. Entretanto, apenas o acréscimo desses produtos, por si só, não garante o sucesso da esterilização química. Continua sendo necessário o controle da assepsia do laboratório, dos instrumentos e vidrarias, e também da equipe, tendo em vista de que todo o processo de limpeza é importante e deve continuar sendo realizado nas áreas e nos utensílios a serem utilizados para o processo de esterilização química, sendo, deste modo, uma prática rotineira dentro do laboratório de cultura de tecidos.

Concentrações iguais ou superiores a 0,0003% de c. a. total, a partir de hipoclorito de sódio mostram potencial para o sucesso da esterilização química com esse produto para a micropropagação de cana-de-açúcar, já que proporcionaram um maior desenvolvimento das plântulas quando comparadas ao tratamento autoclavado. Os resultados obtidos à concentração de 0,0009% de c. a. total, a partir de hipoclorito de sódio, podem sugerir uma leve influência negativa no crescimento das mudas conforme se aumenta a concentração do cloro no meio nutritivo. Esterilizações com hipoclorito de cálcio foram ineficientes, possivelmente devido à difícil solubilidade do produto granulado concentrado.

O uso de clor•in<sup>®</sup> como esterilizante químico, nas mesmas concentrações de c. a. total das utilizadas com os hipocloritos se mostrou uma alternativa interessante para o processo. Assim como aconteceu com o hipoclorito de sódio, a contaminação foi estatisticamente semelhante à do tratamento autoclavado. Entretanto, o fato de o crescimento das plântulas dos tratamentos esterilizados com esse produto ter sido significativamente menor do que nas plântulas cujo meio de cultura foi autoclavado sugere que algum componente do produto possa ter provocado algum efeito fitotóxico, devendo-se, assim, realizar novos testes com concentrações menores que 0,0003%.

## **7 PERSPECTIVAS**

Há a necessidade de efetuar novos ensaios, não apenas para o ajuste das metodologias, como também para oferecer um maior respaldo experimental para o desenvolvimento de um novo – e definitivo – protocolo de esterilização, substituindo a autoclavagem pela adição de produtos químicos ao meio nutritivo, reduzindo, assim, o custo das plântulas de cana-de-açúcar produzidas em laboratórios comerciais através de técnicas de cultura de tecido *in vitro*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, R. R.; COSTA-PINHO, K.; BARROSO, V. C. A.; VEIGA, C. F. M. Efeito da ventilação de frascos no cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar [*Saccharum* spp.]. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 5, Joinville, 2011.
- BURGER, D. W. Guidelines for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. **HortScience**, v. 23, p. 1066-1068, 1988.
- CAPÓ, Y. A. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. In: PONCE, J. N. P. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Cuba: GEO, p. 81-104, 1998.
- COSTA-PINHO, K.; BARBOSA, R. R.; VEIGA, C. F. M.; CARVALHO, V. S.; BARROSO, V. C. A. Utilização de clor•in® como esterilizante químico de meio de cultura para propagação vegetativa *in vitro* de mudas de cana-de-açúcar [*Saccharum* spp.]. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 5, Joinville, 2011.
- DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; TAKAKI, G. M. C.; MARIANO, R. L. R.; MACIEL, G. A. Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1., p. 134-141, 2005.
- 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. **Brazilian Dental Journal**, v. 13, p. 113-117, 2002.
- FERREIRA, L. T.; SILVA, L. M. H.; PEREIRA, J. A. F.; OLIVEIRA, A. L. B.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Protocolo para desinfestação *in vitro* de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10, Recife, 2010.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, A. J. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/CNPH, v. 1, p. 183-260, 1998. *Apud*: DONATO *et al.* Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1., p. 134-141, 2005.

- GRIFFINGS, L. R. & RAY, P. M. Dependence of cell wall secretion on calcium. **Plant Physiology**, v. 63, p. 51-57, 1979. *Apud*: SILVA *et al.* **Esterilização química de meios de cultura para a obtenção de embriões somáticos de cana-de-açúcar**. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10, Recife, 2010.
- KNEIFEL, W. & LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 29, p. 139-144, 1992.
- KÖPP, M. M.; PASSOS, L. P.; SOUZA SOBRINHO, F.; VALE, N. M.; BARILI, L. D.; KELMER, G. A. R.; FILGUEIRAS, A. L.; MARQUES, R.; FERNANDES, F. S. Assepsia de propágulos vegetativos de cana-de-açúcar para cultivo *in vitro*. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 11, Pelotas, 2009.
- LEE, T. S. G. Micropropagation of sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 47, p. 47-55, 1987.
- LEE, T. S. G. Multiplication of sugarcane by apex culture. **Turrialba**, v. 36, n. 2, p. 231-236, 1986.
- LEIFERT, C.; MORAIS, C. E.; WAITES, W. M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 13, p. 139-183, 1994.
- LIU, L. J. Biotechnology: its potential importance for controlling sugar cane diseases in Latin America and the Caribbean. In: INTER-AMERICA SUGAR CANE SEMINAR, 1989. *Apud*: DONATO *et al.* **Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos**. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 29, n. 1., p. 134-141, 2005.
- MATSUMOTO, K.; COELHO, M. C. F.; TEIXEIRA, J. B. Desinfestação de meio de cultura e recipientes por hipoclorito de sódio em micropropagação de bananeira. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 13, p. 130-133, 2007.
- MONTARROYOS, A. V. V. Contaminação *in vitro*. ABCTP Notícias, v. 36/37, p. 5-10, 2000. *Apud*: KÖPP *et al.* **Assepsia de propágulos vegetativos de cana-de-açúcar para cultivo *in vitro***. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 11, Pelotas, 2009.
- MOREJÓN, A. A. G.; MORALES, E. C.; URQUÍA, M. R.; PONCE, J. P.; HERNÁNDEZ, O. V. Perfeccionamiento de los métodos de desinfección en el cultivo “*in vitro*” de caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbridos). **Centro Agrícola**, v. 12, n. 3, p. 140-143, 1985.

- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NASTARI, P. M. Açúcar e etanol: saindo da crise com responsabilidade. *Agroanalyses FGV*, São Paulo, fev. 2010. Disponível em <[http://www.agroanalysis.com.br/materia\\_detalhe.php?idMateria=787](http://www.agroanalysis.com.br/materia_detalhe.php?idMateria=787)>. Acesso em: 23 mar. 2011.
- OLIVEIRA, O. R.; TERAPO, D. CARVALHO, A. C. P. P.; SANTOS, E. M.; SILVA, J. F.; MORAIS, J. P. S. Avaliação dos níveis de contaminação microbiana em laboratório de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Cult. & Micropropag.**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 49-54, 2007.
- PASQUAL, M. Meios de cultura. Lavras: UFLA-FAEPE, 2001. 74p. *In*: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.) **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília: Embrapa, 2010. 446p.
- PIERIK, R. L. M. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. 3. Ed. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326 p. *In*: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.) **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília: Embrapa, 2010. 446p.
- POLLOCK, K.; BARFIELD, D. G.; SHIELDS, R. The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. **Plant Cell Report**, v. 2, p. 36-39, 1983. *Apud*: DONATO *et al.* **Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos**. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 29, n. 1., p. 134-141, 2005.
- RIBEIRO, J. M. Comparação entre as técnicas de esterilização de meios de cultura de tecidos vegetais com hipoclorito de sódio e por autoclavagem. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. 2006.
- RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, S. L.; BASTOS, D. C. Calogênese em explantes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivados em meio nutritivo esterilizado com hipoclorito de sódio. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 5, p. 537-541, 2009.
- SANTOS, F.; BOREM, A.; CALDAS, C. Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool – tecnologia e perspectivas. Viçosa: Editora UFV, 2010.

- SCORTICHINI, M. & CHIARIOTTI, A. *In vitro* culture of *Prunus persica* var. *laevis* gray (Nectarine): detection of bacterial contaminants and possibility of decontamination by means of antibiotics. **Acta Horticulture**, The Hague, v. 225, p. 109-118, 1988. *Apud*: DONATO *et al.* **Plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com antibióticos**. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 29, n. 1., p. 134-141, 2005.
- SILVA, M. M. A.; HERCULANO, L.; CAMARA, T. R. Esterilização química de meios de cultura para a obtenção de embriões somáticos de cana-de-açúcar. *In*: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10, Recife, 2010.
- SNOW, R. Improvements in methods for the germination of orchid seeds. **American Ochid Society Bulletin**, v. 54, p. 178-181, 1985. *Apud*: RIBEIRO *et al.* **Calogênese em explantes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivados em meio nutritivo esterilizado com hipoclorito de sódio**. Revista Ceres, Viçosa, v. 56, n. 5, p. 537-541, 2009.
- SOUSA, G. C.; CLEMENTE, P. L.; ISAAC, V. L. R.; FARIA, S. P.; CAMPOS, M. R. C. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 1, p. 405-407, 2007.
- SOUZA, A. S. & JUNGHANS, T. G. Introdução à micropropagação de plantas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.
- TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behaviour. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, p. 375-378, 2006.
- TEIXEIRA, S. L.; SOUSA, R. T.; TEIXEIRA, M. T. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de microondas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 52, n. 302, p. 499-507, 2005b.
- 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**, Viçosa, v. 52, n. 301, p. 343-349, 2005a.
- TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L. POZZEWR, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, A. J. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/CNPH, v. 1, p. 183-260, 1998.

- TSAL, C. T.; KUO, C. T.; LIN, S. T. Analysis of organic halides in hospital waste sludge disinfected using sodium hypochlorite (NaOCl). **Water Research**, v. 33, p. 778-784, 1998.
- VEIGA, C. F. M. **Estudo comparativo do desenvolvimento e do acúmulo de açúcares in e ex vitro de cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. 2000.
- VEIGA, C. F. M.; VIEIRA, J. R.; MORGADO, I. F. **Diagnóstico da cadeia produtiva da cana-de-açúcar do estado do Rio de Janeiro**; relatório de pesquisa. Rio de Janeiro: FAERJ/SEBRAE/SENAR, 2006.
- WALKER, P. H.; HARRIS, J. P.; GAUTZ, L. D. Optimal environment for sugarcane micropropagation. **Transactions of ASAE**, v.34, n. 6, p. 2609-2614, 1991.
- 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, p. 33-36, 1995. *Apud*: RIBEIRO *et al.* **Calogênese em explantes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivados em meio nutritivo esterilizado com hipoclorito de sódio**. Revista Ceres, Viçosa, v. 56, n. 5, p. 537-541, 2009.

## ANEXOS

**Anexo I** - Avaliações de crescimento das plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB99395 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de hipoclorito de sódio no meio de cultura. As médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

Tratamento	Altura das plântulas	Número de perfilhos	Biomassa fresca das plântulas	Biomassa seca das plântulas
T1	7,0	17	7,100	0,389
T1	7,0	11	5,600	0,488
T1	8,0	12	7,200	0,412
T1	7,0	12	8,700	0,395
T1	8,0	16	7,700	0,669
T1	7,0	10	6,900	0,510
T1	10,0	13	6,600	0,322
T1	8,0	11	7,300	0,470
<b>Média T1</b>	<b>7,75 c</b>	<b>12,75 a</b>	<b>7,138 bc</b>	<b>0,457 a</b>
T3	8,0	13	8,000	0,491
T3	7,0	12	7,500	0,490
T3	6,0	17	8,000	0,503
T3	6,0	15	8,600	0,547
T3	6,0	17	8,000	0,520
T3	8,0	13	8,600	0,550
<b>Média T3</b>	<b>6,83 c</b>	<b>14,50 a</b>	<b>8,117 ab</b>	<b>0,517 a</b>
T4	9,0	11	6,200	0,478
T4	9,0	13	5,200	0,361
T4	7,0	11	7,700	0,429
T4	8,0	13	7,900	0,435
<b>Média T4</b>	<b>8,25 bc</b>	<b>12,00 a</b>	<b>6,750 bc</b>	<b>0,426 a</b>
T5	9,0	9	7,400	0,416
T5	9,0	12	6,500	0,445
T5	11,0	14	7,400	0,505
T5	8,0	15	7,200	0,501
T5	11,0	11	5,500	0,482
T5	9,0	9	4,800	0,370
<b>Média T5</b>	<b>9,50 ab</b>	<b>11,67 a</b>	<b>6,467 c</b>	<b>0,453 a</b>

**Anexo II** – Avaliações de crescimento das plântulas de cana-de-açúcar cultivar RB952890 por tratamento em função das diferentes concentrações de c. a. total de clor•in<sup>®</sup> no meio de cultura. As médias acompanhadas de pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

<b>Tratamento</b>	<b>Altura das plântulas</b>	<b>Número de perfilhos</b>	<b>Biomassa fresca das plântulas</b>	<b>Biomassa seca das plântulas</b>
T1	7,5	11	2,380	0,193
T1	6,5	9	1,880	0,246
T1	7,5	14	2,449	0,181
T1	5,5	11	2,538	0,158
T1	8,0	14	1,788	0,151
T1	7,5	11	2,003	0,134
T1	7,5	12	3,101	0,182
<b>Média T1</b>	<b>7,14 a</b>	<b>11,71 a</b>	<b>2,306 a</b>	<b>0,1779 a</b>
T3	5,2	5	0,531	0,059
T3	2,5	3	0,607	0,039
T3	3,5	6	0,787	0,039
T3	3,5	4	0,705	0,044
T3	4,5	7	0,915	0,074
T3	4,0	5	1,262	0,080
<b>Média T3</b>	<b>3,87 c</b>	<b>5,00 b</b>	<b>0,801 c</b>	<b>0,0558 c</b>
T4	5,5	5	0,952	0,063
T4	5,5	8	1,524	0,121
T4	7,0	7	1,391	0,111
T4	5,0	7	1,504	0,095
T4	6,0	9	1,969	0,085
T4	5,5	4	1,303	0,109
T4	5,0	9	1,711	0,062
<b>Média T4</b>	<b>5,64 b</b>	<b>7,00 b</b>	<b>1,479 b</b>	<b>0,0923 bc</b>
T5	5,0	10	2,313	0,118
T5	6,0	5	1,425	0,114
T5	5,5	10	1,488	0,098
T5	4,0	8	1,503	0,156
T5	7,5	6	0,927	0,066
T5	8,0	9	1,708	0,116
T5	6,0	5	1,712	0,118
<b>Média T5</b>	<b>6,00 ab</b>	<b>7,57 b</b>	<b>1,582 b</b>	<b>0,1123 b</b>