

ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DO MOGNO-AFRICANO (*Khaya senegalensis* A. CHEV.) NO CULTIVO “*IN VITRO*”

Luisa Costa Freitas¹; Isabela Cordeiro Guedes²; Caroline Junqueira Sartori³

1 Luisa Costa Freitas, Bolsista PIBIC IFMG, Engenharia Florestal, IFMG Campus São João Evangelista, São João Evangelista - MG; luisacoluna@hotmail.com

2 Isabela Cordeiro Guedes, Engenharia Agrônoma, IFMG Campus São João Evangelista, São João Evangelista – MG; isabela.agronima@yahoo.com

3 Caroline Junqueira Sartori: Pesquisador do IFMG, Campus São João Evangelista; caroline.sartori@ifmg.edu.br

Palavras-chave: Mogno-Africano; Micropropagação; Hipoclorito de sódio.

Área do Conhecimento (CNPq): Ciências agrárias – Engenharia Florestal

Campus: São João Evangelista.

RESUMO

A micropropagação *in vitro* é uma ferramenta importante para suprir dificuldades encontradas para espécies que impedem uma rápida reposição natural, como o Mogno-Africano (*Khaya senegalensis*). Entretanto, essa técnica é um tanto dispendiosa, como resultado do alto valor das instalações e da energia necessária, especificamente a autoclave. O objetivo desta pesquisa é utilizar o protocolo Teixeira et al. (2006), para a multiplicação *in vitro* do Mogno Africano, o qual utiliza solução clorada na sanitização sistemática dos utensílios utilizados na preparação e acondicionamento do meio de cultura, além de adicionar o NaClO (hipoclorito de sódio) diretamente ao meio de cultura. O estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais (IFMG) campus São João Evangelista. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em fatorial 5x2, sendo 5 níveis da variável hipoclorito de sódio (Água Sanitária Comercial (ASC) com concentração na faixa de 2 a 2,5% de cloro ativo), com doses de 0 mL/L, 2 mL/L, 5 mL/L, 10 mL/L e 20 mL/L e 2 níveis da água utilizada no processo, deionizada autoclavada e deionizada. Cada tratamento tem 5 repetições contendo 5 sementes cada. Os ensaios tiveram os dados submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 95% de probabilidade. As doses de 10 e 20 mL/L são as mais eficientes na esterilização dos meios quando utilizada água deionizada no preparo dos mesmos, com 12 e 4% de contaminação, respectivamente. Quando utilizada água autoclavada no preparo dos meios de cultura, a partir de 5 mL/L de NaClO a esterilização se torna mais eficiente. Para germinação não houve diferença estatística entre as doses utilizadas. A adoção desse protocolo dispensa o emprego da autoclavagem como técnica de esterilização de meios de cultura. Estes resultados sugerem a viabilidade da utilização de hipoclorito de sódio para a esterilização de meios nutritivos para cultivo *in vitro* de Mogno-Africano.

INTRODUÇÃO:

A espécie *Khaya senegalensis* pertence à família das Meliaceae e é conhecida como Mogno-Africano. É uma das espécies de maior valor econômico do mundo, sendo utilizada na produção de móveis e na produção de instrumentos musicais, especialmente o piano (LOPES; YAMADA; COSTA, 2009). Possui uma distribuição natural que vai desde o leste de Senegal até a região norte de Uganda (NIKIEMA; PASTERNAK, 2008 apud VASCONCELOS, 2012).

Um dos problemas na produção do Mogno Africano é a difícil execução de coletas de sementes devido ao porte da árvore e a perda da viabilidade em um curto espaço de tempo e a micropropagação *in vitro* aparece como ferramenta importante para suprir as dificuldades encontradas para espécies que impedem uma rápida reposição natural, como o Mogno (LAMEIRA et al., 2006).

Mesmo com os benefícios de se produzir em larga escala em um curto espaço de tempo com a preservação do material genético (LAMEIRA et al., 2006), segundo Teixeira et al. (2008), a produção de

mudas de plantas florestais e de outras espécies em laboratórios comerciais apresenta custo elevado, como resultado do alto valor das instalações e da energia necessária. Além disso, a autoclavagem, que é o método esterilizante utilizado, pode levar à decomposição de componentes do meio de cultura (BALL, 1953 apud TEIXEIRA et al., 2008; STREETT e LOWE, 1950 apud TEIXEIRA, et al., 2008).

Araújo e Teixeira (1998; 1999) e Teixeira et al. (2005a; 2005b) levantaram informações que permitiram o estabelecimento de um protocolo de preparo de meios de cultura que utiliza, como esterilizante, o hipoclorito de sódio (NaClO).

O objetivo desta pesquisa é utilizar o referido protocolo (TEIXEIRA et al., 2006), para a multiplicação do Mogno-Africano *in vitro*, o qual utiliza solução clorada na sanitização sistemática dos utensílios utilizados na preparação e acondicionamento do meio de cultura, além de adicionar o NaClO diretamente ao meio de cultura.

METODOLOGIA:

O estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais (IFMG) campus São João Evangelista.

As sementes de Mogno Africano utilizadas no estudo foram obtidas junto ao Viveiro de mudas do IFMG-SJE. Após o recebimento das sementes, as mesmas foram levadas para o laboratório de culturas de tecidos vegetais para serem submetidas aos respectivos tratamentos.

Utilizou-se tratamento de esterilização segundo Couto et al. (2004) e Filho et al. (1998), o qual consiste em submeter as sementes com tegumentos à imersão em água corrente durante 15 minutos. Dentro de Câmara de Fluxo Laminar as sementes foram imersas em hipoclorito de sódio (NaClO) comercial a 50% (v/v) por 20 minutos, e em seguida imersas em álcool 70 % (v/v) por 1 minuto. Posteriormente as sementes foram mergulhadas em hipoclorito de sódio com gotas de detergente Tween 20 durante 30 minutos, e por último, após o procedimento de desinfecção, as sementes foram submetidas a um triplo enxágue com água destilada antes das suas transferências ao meio de cultivo, para a remoção de resíduos das soluções desinfectantes.

O meio de cultivo utilizado foi o MS (Murashige; Skoog, 1962) meia força, o qual contém 15 g/L de sacarose (Synth), 0,1 g/L de mio-inositol (Vetec), 7 g/L de ágar bacteriológico (Alphatec) e os sais MS. O meio não foi autoclavado, sendo que cada frasco recebeu Água Sanitária Comercial (ASC) com concentração de cloro ativo na faixa de 2 a 2,5% de cloro ativo.

Para os cinco primeiros tratamentos a água utilizada no preparo dos meios de cultura foi a água apenas deionizada, portanto os tratamentos ficaram distribuídos da seguinte forma: T1 → 0 mL/L de ASC e o meio autoclavado (testemunha); T2 → 2,0 mL/L de ASC e o meio não autoclavado; T3 → 5,0 mL/L de ASC e o meio não autoclavado; T4 → 10,0 mL/L de ASC e o meio não autoclavado e T5 → 20,0 mL/L de ASC e o meio não autoclavado.

Para os outros cinco tratamentos a água utilizada no preparo dos meios de cultura foi a água deionizada autoclavada, portanto os tratamentos ficaram distribuídos da seguinte forma: T6 → 0 mL/L de ASC e o meio autoclavado (testemunha); T7 → 2,0 mL/L de ASC e o meio não autoclavado; T8 → 5,0 mL/L

de ASC e o meio não autoclavado; T9 → 10,0 mL/L de ASC e o meio não autoclavado e T10 → 20,0 mL/L de ASC e o meio não autoclavado.

As sementes foram transferidas para frascos contendo 30 mL de meio de cultura com a parte côncava voltada para baixo de acordo com Couto (2002), em seguida os frascos foram lacrados e identificados. Após inoculação, os frascos contendo sementes de Mogno Africano foram levados à sala de crescimento para a incubação, com temperatura de 26 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz, permanecendo por um período de 60 dias (SILVA, 2003). O critério adotado para considerar como semente germinada foi a protrusão da radícula.

Avaliaram-se os efeitos das diferentes dosagens de hipoclorito de sódio sobre a contaminação do meio, e procedeu-se com a contagem diária dos frascos contaminados por fungos ou bactérias, utilizando como critério de avaliação a presença de micélio de qualquer cor ou formação de colônias bacterianas, respectivamente; e índice de germinação, sendo feita as contagens diárias das plântulas que germinaram durante 60 dias, adotando-se a metodologia recomendada por Maguire (1962).

Ao fim da coleta e tabulação dos dados deu-se início a descrição e tratamento dos dados computados utilizando-se de comparações e métodos estatísticos. Na instalação do experimento o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em fatorial 5x2, sendo 5 níveis da variável concentrações de hipoclorito de sódio e 2 níveis da água utilizada no processo (deionizada autoclavada e deionizada). Cada tratamento teve 5 repetições contendo 5 sementes cada. Os ensaios tiveram os dados submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 95% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

Após o período de 60 dias de incubação dos tratamentos, os resultados das porcentagens de contaminação e germinação analisados para as variáveis água deionizada e água deionizada autoclavada estão descritos nas tabelas a seguir:

Tabela 1- Resultados da variável água deionizada.

Tratamento	Contaminação (%)	Germinação (%)
1	64	4
2	48	12
3	20	28
4	12	20
5	4	28

Tabela 2- Resultados da variável água deionizada autoclavada.

Tratamento	Contaminação (%)	Germinação (%)
6	88	8
7	64	0
8	36	12
9	16	20
10	20	4

Nota-se que, nos tratamentos em que se utilizou água deionizada no preparo do meio de cultura as porcentagens de contaminação foram menores quando comparados aos tratamentos em que se utilizou água deionizada autoclavada e nos tratamentos em que não se utilizou o hipoclorito de sódio como desinfestante (tratamento 1 e 6) foram encontradas as maiores contaminações (64 e 88%).

Couto et al. (2004), encontrou resultados semelhantes avaliando a germinação *in vitro* de *Swietenia macrophylla* (Mogno Brasileiro), onde as maiores taxas de contaminações foram obtidas nos tratamentos em que as sementes não receberam a desinfestação com hipoclorito de sódio, apresentando as maiores taxas de contaminação com 89 e 67%.

A germinação apresentou porcentagens relativamente baixas para ambas variáveis. Esse resultado pode estar relacionado com a rápida perda de viabilidade das sementes após a queda e o período de exposição no solo até o momento da coleta, uma vez que perde 50% do seu poder germinativo, dependendo do tempo de exposição (MORAES, 2002).

Os resultados da contaminação na análise de variância pelo teste de Tukey a 95% de probabilidade para a variável água deionizada estão descritos na tabela 3. Os dados acompanhados de pelo menos uma mesma letra e número, são estatisticamente iguais.

Tabela 3- Resultados da contaminação para a variável água deionizada.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	3,2	a
2	2,4	a
3	1	a
4	0,6	b
5	0,2	b

*Teste de Tukey a 95% de probabilidade.

Os tratamentos 1, 2 e 3, em que se testaram as menores doses de hipoclorito de sódio, diferiram estatisticamente dos tratamentos 4 e 5. Nestes tratamentos foram testadas as maiores doses de hipoclorito de sódio e estes apresentaram os melhores resultados (0,6 e 0,2, respectivamente) na contaminação dos meios.

Os resultados da germinação na análise de variância pelo teste de Tukey a 95% de probabilidade para a variável água deionizada estão descritos na tabela 4.

Tabela 4- Resultados da germinação para a variável água deionizada.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0,2	a
2	0,6	a
3	1,4	a
4	1	a
5	1,4	a

*Teste de Tukey a 95% de probabilidade.

Em relação à germinação das sementes de Mogno Africano não houve diferença estatística entre os tratamentos utilizados.

Fontes (2011) utilizou doses de ASC (água sanitária comercial) como esterilizante do meio de cultura para avaliar seu uso na germinação de orquídeas. As doses adicionadas foram 2; 5; 10; 20; 30; 35; e 38 mL/L. O autor encontrou resultados significativamente maiores para a germinação em relação aos recipientes em que o meios receberam a menor dose de hipoclorito.

Os resultados da contaminação na análise de variância pelo teste de Tukey a 95% de probabilidade para a variável água deionizada autoclavada estão descritos na tabela 5.

Tabela 5- Resultados da contaminação para a variável água deionizada autoclavada.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
6	4,4	a
7	3,2	a b
8	1,8	b c
9	0,8	c
10	1	c

*Teste de Tukey a 95% de probabilidade.

O nível de contaminação variou estatisticamente entre os tratamentos quando a água utilizada no preparo do meio foi a deionizada autoclavada. O tratamento 7 é estatisticamente igual ao tratamento 6 e 8. O tratamento 8 é diferente de 6 e igual estatisticamente aos tratamentos 9 e 10.

Nota-se que, a maior média de contaminação foi encontrada no tratamento 6 (4,4), em que se utilizou a menor dose de hipoclorito e sódio e a menor média de contaminação foi encontrada no tratamento 9 (0,8) em que se utilizou a segunda maior dose de hipoclorito de sódio.

Os resultados da germinação na análise de variância pelo teste de Tukey a 95% de probabilidade para a variável água deionizada autoclavada estão descritos na tabela 6.

Tabela 6- Resultados da germinação para a variável água deionizada autoclavada.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
6	0,4	a
7	0	a
8	0,6	a
9	1	a
10	0,2	a

*Teste de Tukey a 95% de probabilidade.

Da mesma forma que não houve diferença significativa entre os tratamentos na germinação para a variável água deionizada, não houve diferença também para os tratamentos em que se utilizou água deionizada autoclavada no preparo do meio.

Comparando-se as duas variáveis, água deionizada e água deionizada autoclavada pelo teste de Tukey a 95% de probabilidade, obtiveram-se os resultados apresentados na tabela 7 para os dados de contaminação.

Tabela 7- Resultados da contaminação para as variáveis água deionizada e água deionizada autoclavada.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	1,48	a
2	2,24	b

*Teste de Tukey a 95% de probabilidade.

Avaliando-se as duas águas utilizadas no preparo do meio de cultura as médias de contaminação são estatisticamente diferentes. No tratamento 1, em que se utilizou água deionizada a média de contaminação (1,48) foi menor que no tratamento 2, em que se utilizou água deionizada autoclavada (2,24).

A adoção do procedimento de esterilização química dispensa o uso de autoclave para esterilização da água utilizada no preparo dos meios, assim como na esterilização dos próprios meios nutritivos.

Os resultados deste trabalho reforçam a conclusão de Teixeira et al. (2006) sobre a viabilidade do uso do hipoclorito de sódio, como esterilizante em cultura de tecidos vegetais, desde que se adotem as demais medidas de assepsia constantes desse novo protocolo de preparo do meio de cultura.

Comparando-se as duas variáveis, água deionizada e água deionizada autoclavada pelo teste de Tukey a 95% de probabilidade, obtiveram-se os resultados apresentados na tabela 8 para os dados de germinação.

Tabela 8- Resultados da germinação para as variáveis água deionizada e água deionizada autoclavada.

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
1	0,92	a
2	0,44	b

*Teste de Tukey a 95% de probabilidade.

Da mesma forma ocorreu para a germinação, que é estatisticamente diferente para as duas águas utilizadas no preparo do meio. No tratamento 1, em que se utilizou água deionizada a média de germinação (0,92) foi menor que no tratamento 2, em que se utilizou água deionizada autoclavada (0,44).

Apesar da baixa germinação, esta apresentou melhores resultados quando se utilizou água deionizada no preparo dos meios de cultura, dispensando, mais uma vez, o uso da autoclave.

CONCLUSÕES:

As doses de 10 e 20 mL são as mais eficientes na esterilização dos meios quando utilizada água deionizada no preparo dos mesmos.

Quando utilizada água autoclavada no preparo dos meios de cultura, apenas quando se utilizou a dose de 10,0 mL/L a média de contaminação foi inferior a 1.

Para germinação não houve diferença estatística entre as doses utilizadas.

A adoção desse protocolo dispensa o emprego da autoclavagem como técnica de esterilização de meios de cultura.

Estes resultados sugerem a viabilidade da utilização de hipoclorito de sódio para a esterilização de meios nutritivos para cultivo *in vitro* de Mogno Africano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ARAUJO, M.C.; TEIXEIRA, S.L. **Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de micro-ondas**. In: REUNIÃO DE PROGRAMAÇÃO DE PESQUISAS DO CCTA, 1998, Campos dos Goytacazes, RJ. Livro de resumos. Campos dos Goytacazes, RJ : CCTA/UENF, 1998. Resumo 154.
- COUTO, J. M. F. **Germinação e morfogênese *in vitro* de Mogno (*Swietenia macrophylla* King)**. 2002. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestal)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2002.
- FILHO, A. N. K.; GRAÇA, M. E. C.; JUNIO, A. G. Micropropagação do Mogno: desinfestação e germinação. **Embrapa**, n.65, p.2-3, dez. 1998.
- FONTES, A. A. **Desinfestação química para semeio e recultivo *in vitro* de orquídeas e sua influência sobre a nutrição das plântulas**. 35p. Dissertação (Magister Scientiae)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- LAMEIRA, O. et al. **Efeito de substratos a germinação *in vitro* de Mogno (*Swietenia macrophylla* KING)**. Plant Cell Culture Micropropagation, Lavras, v. 2, n. 1, p. 15-19, 2006.
- LOPES, D. C. F.; YAMADA, E.S.; COSTA, E.T. **Efeitos citoprotetores do extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) em modelo *in vitro* de exposição mercurial**. 2009. 80 f. Tese (Mestrado em Neurociência) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.
- MORAES, E. C. **Informações pessoais**, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- 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.¹** Ciência Florestal, Santa Maria, v. 18, n. 2, p. 185-191, abr.-jun., 2008.
- TEIXEIRA, S.L.; CAMPANATI, M.; TEIXEIRA, M.T.; ALMEIDA, R.F. **Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais, pela combinação de esterilizantes químicos e forno de micro-ondas**. Revista CERES, Viçosa – MG, v. 52, p. 343-349, 2005a.
- TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, M.T. **Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv *Smooth cayenne*) behavior**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Holanda, v. 86, n. 3, p. 375-378, 2006.
- TEIXEIRA, S.L.; SOUSA, R.T.S.; TEIXEIRA, M.T. **Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de micro-ondas**. Revista CERES, Viçosa – MG, v. 52, 2005b.
- VASCONCELOS, R. T. **Enraizamento de estacas de *Khaya senegalensis* A.Juss. em diferentes concentrações de ácido indolbutírico**. 2012. 45 p. Dissertação (Mestre em Agronomia (Produção Vegetal))- Unesp, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP, 2012.