

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA DO MEIO DE CULTURA NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Hyptis platanifolia*

Isis Bugia Santana¹; Cristina Ferreira Nepomuceno²; José Raniere Ferreira de Santana³

¹Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: ibugia2@hotmail.com

²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: nepomucenocf@yahoo.com.br

³Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: raniere@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Planta medicinal; hiperidricidade; Cultura de tecidos.

INTRODUÇÃO

A espécie *H. platanifolia*, pertence à família Lamiaceae, endêmica do semi-árido nordestino é uma fonte potencial como agente antimicrobiano (Moreira, 2006; Pinto et al., 2008), o que lhe confere considerável importância econômica e torna plausível seu uso pela indústria farmacêutica.

Porém, a grande maioria das plantas medicinais utilizadas para fins farmacêuticos são coletadas em habitat natural e por maior que seja o número de indivíduos numa localidade, não são suficientes para atender uma demanda constante e ininterrupta. Desse modo, o cultivo *in vitro* de plantas medicinais contribui para obtenção de espécies com genótipos superiores e em abundância, o que possibilita aproveitar suas propriedades na indústria e comercializá-las. Portanto, a micropropagação, que é uma das técnicas do cultivo *in vitro*, busca obtenção de mudas com qualidades agrônomicas desejáveis, indexadas, livres de patógenos e com elevados padrões genéticos (França, 2004).

Esta técnica compreende algumas etapas, como o estabelecimento *in vitro* da espécie, a multiplicação e o enraizamento *in vitro* e por fim a aclimatização. Contudo, algumas espécies são acometidas por desordens morfofisiológicas, provocadas pelas condições físicas e químicas do cultivo *in vitro* ou devido às condições fisiológicas da espécie. Dentre as desordens morfofisiológicas, a espécie em estudo apresenta a hiperidricidade, que é caracterizada pela absorção excessiva de água pelos tecidos das plantas.

Outra preocupação em relação ao cultivo *in vitro* é a redução de custos em laboratórios comerciais, pois a produção de mudas tem seu custo elevado, devido principalmente ao custo das instalações e energia necessária para autoclavagem de meio de cultura e vidrarias. Estudos vêm sendo realizados com o intuito de substituir o processo de esterilização via autoclavagem por esterilização de menor custo (Teixeira et al, 2005). Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da esterilização química na germinação e crescimento *in vitro* de *H. platanifolia* com vistas ao desenvolvimento de um protocolo de micropropagação para a espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Unidade Experimental Horto Florestal (UEHF/UEFS).

As sementes foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar com imersão em álcool a 70% por 1 minuto, seguido de solução de hipoclorito de sódio (Qboa®) a 2,5 %, acrescida de uma gota de detergente neutro (Ypê ®) por 15 minutos e, então, lavados por quatro vezes em água destilada autoclavada. As sementes, foram inoculadas no meio de cultura MS½ (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 3% de sacarose e solidificado com 0,7% de agar. O meio de cultura foi esterilizado através da autoclave (à 121°C por 15min) e por esterilização química, utilizando-se o hipoclorito de sódio conforme metodologia realizada por Teixeira et al. (2006). Foram também utilizados diferentes tipos de fechamento dos tubos de ensaio [PVC; Tampão de algodão (TA) e Tampa plástica (TP)], totalizando quatro tratamentos: 1 – PVC/ esterilização via autoclave; 2 – PVC/ esterilização química; 3 – TA/ esterilização química e 4 – TP/ esterilização química.

O pH do meio de cultura esterilizado via autoclave foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da autoclavagem e no caso da esterilização química foi corrigido conforme Teixeira et al. (2006).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas, com umidade relativa de 60% e radiação fotossintética ativa de $60\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 10 repetições e cada parcela experimental foi constituída por cinco tubos contendo uma semente em cada tubo de ensaio. Avaliou-se após 30 dias da inoculação a porcentagem de germinação, comprimento de parte aérea, número de folhas e porcentagem de plantas hiperídricas.

Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando-se as médias pelo Teste de Scott-Knott para os fatores qualitativos. Os dados foram analisados usando o programa SISVAR desenvolvido pela UFLA (Ferreira, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância foram observadas diferenças altamente significativas ($p \leq 0,01$) entre os tratamentos para a porcentagem de germinação *in vitro*, comprimento de parte aérea, número de folhas e porcentagem de plantas hiperídricas.

Pôde-se observar que o tipo de esterilização não interferiu na germinabilidade das sementes de *H. platanifolia*. A maior porcentagem de germinação (92,50%) ocorreu quando o meio de cultura foi esterilizado através do método químico, porém não diferiu estatisticamente do meio de cultura autoclavado e quando o tubo de ensaio foi fechado com tampa plástica/meio de cultura esterilizado quimicamente, os quais apresentaram porcentagem de germinação igual a 74,17% e 71,33%, respectivamente (Tabela 1), o que indica que a concentração utilizada de hipoclorito de sódio não é tóxica as sementes desta espécie. Estes resultados corroboram aqueles encontrados para *Melocactus glaucescens* em que o tipo de esterilização não interferiu na germinação das sementes dessa espécie (Resende, 2010).

Tabela 1: Cultivo *in vitro* de *H. platanifolia*. Porcentagem de germinação e de hiperidricidade de plantas submetidas a diferentes tipos de esterilização do meio de cultura e fechamento dos tubos de ensaio. Feira de Santana, 2011.

Fechamento/ Esterilização	%GERMINAÇÃO	%HIPERIDRICIDADE
PVC/Autoclave	74,17a	44,49a
PVC/Química	92,50a	6,00b
Tampão de algodão/Química	39,66b	0,00c
Tampa plástica/Química	71,33a	28,83a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Para a variável porcentagem de hiperidricidade, o tratamento tampão de algodão/esterilização química, diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Não foi verificada ocorrência dessa desordem morfofisiológica quando o tubo de ensaio foi fechado com tampão de algodão associado à esterilização química (Tabela 1). No cultivo *in vitro* convencional se utiliza o PVC para o fechamento dos recipientes proporcionando alta umidade dentro dos frascos, dessa forma aumentando a disponibilidade de água dentro dos recipientes, o que favorece a absorção excessiva de água pelos tecidos das plantas e como consequência poderá conduzir a planta ao processo de hiperidricidade. E a utilização do tampão de algodão, neste caso favorece a redução da umidade dentro dos tubos, além de contribuir para que a planta possa aumentar o fluxo transpiratório, devido à promoção das trocas gasosas, além de reduzir e/ou reverter esse processo. A esterilização química, também atuou como fator para a redução da hiperidricidade, provavelmente este efeito benéfico foi por conta do processo que é realizado a esterilização, uma vez que o meio de cultura fica mais consistente que o meio de cultura quando autoclavado, diminuindo assim a disponibilidade de água para as plantas.

A maior média para o comprimento da parte aérea foi quando utilizou tampa plástica/esterilização química (1,23cm), porém não diferiu estatisticamente quando foi utilizado PVC/esterilização química, mas diferiu estatisticamente quando o meio de cultura foi autoclavado (Tabela 2). E para o número de folhas, a maior média foi observada para o tratamento PVC/esterilização por autoclave (3,86), contudo não diferiu estatisticamente dos tratamentos PVC/esterilização química e tampa plástica/esterilização química (Tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados para *E. pellita*, em que foi observado aumento no crescimento da parte aérea, quando o meio nutritivo foi esterilizado pelo hipoclorito de sódio (Teixeira et al., 2008).

Tabela 2: Cultivo *in vitro* de *H. platanifolia*. Médias do comprimento de parte aérea (CPA) e número de folhas de plantas submetidas a diferentes tipos de esterilização do meio de cultura e fechamento dos tubos de ensaio. Feira de Santana, 2011.

Fechamento/ Esterilização	CPA (cm)	NF
PVC/Autoclave	0,94b	3,86a
PVC/Química	1,08a	2,68a
Tampão de algodão/Química	0,47b	0,79b
Tampa plástica/Química	1,23a	3,49a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

CONCLUSÃO

A germinação e o crescimento *in vitro* de *H. platanifolia* pode ser realizada em meio de cultura esterilizado com hipoclorito de sódio. E o tampão de algodão pode ser utilizado para reduzir a hiperidricidade de *H. platanifolia*.

REFERÊNCIAS

- FERREIRA, D. F. Sisvar: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**. Lavras, v.6, n.2, p.36-41, 2008. Disponível em: <<http://www.fadminas.org.br/symposium/>>. Acesso em: 17 de abril de 2011.
- FRANÇA, S. C. 2004. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O. (Coord.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC. p.123-146.
- MOREIRA, J. S. **Variabilidade sazonal da composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído de *Hyptis platanifolia***. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Feira de Santana.
- MURASHIGE, T; SKOOG, F.,1962.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**. 15:473-497.
- PINTO, R. P., NOBRE, I. K. C., LUCHESE, A. M., QUEIROZ, L. P., UETANABARO, A. P. T., MENDES, C. Atividade antimicrobiana de extratos de *Hyptis platanifolia*. **III Seminário de Resistência Bacteriana e II Seminário de Resistência Microbiana**, 2008.
- RESENDE, S. V. **Micropropagação e conservação *in vitro* de *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo e *Melocactus paucispinus* G. Heimen & R. Paul (Cactaceae), espécies endêmicas da Bahia e ameaçadas de extinção**. 2010. Tese – Programa de Pós-Graduação em Botânica – Universidade Estadual de Feira de Santana.
- TEIXEIRA, S. L., TEIXEIRA, M.T., CAMPANATI M., ALMEIDA R.F. (2005) Cultura de tecidos vegetais, pela combinação de esterilizantes e forno microondas. **Revista Ceres** 52(301):343-349.
- TEIXEIRA, S.L., RIBEIRO, J.M., TEIXEIRA, M.T., 2006. Influence of NaClO on nutrient médium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**.86:375-378.
- TEIXEIRA, S.L., RIBEIRO, J.M., TEIXEIRA, M.T., 2008. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para a multiplicação *in vitro* *Eucalyptus pellita* L. **Ciência Florestal**. 18(2): 185-191.