

Resposta de explantes de *Epidendrum ibacuense* (Orchidaceae) a diferentes concentrações e tempo de exposição ao hipoclorito de sódio e a diferentes antioxidantes

Rodrigues, Donizetti Tomaz¹; Berger, Marcus V Sossai²; Dias, José Maria Moreira³; Barros, Aline Ferreira⁴

¹Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, CEP: 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, fone: (31) 3899-2575, email: donitom@yahoo.com.br;

²Biólogo, email: mvsberger@gmail.com; ³Professor da Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Fitotecnia, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais, email: jmmdias@ufv.br;

⁴Estudante especial do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000 Viçosa, Minas Gerais, email: afbarros2004@yahoo.com.br.

INTRODUÇÃO

O interesse despertado pelas orquídeas é antigo, sendo relatado o seu fascínio sobre filósofos e grandes nomes da história e hoje há uma clara popularização do cultivo das orquídeas. Um dos desafios do cultivo de orquídeas é a obtenção de protocolos de micropropagação eficientes, há alguns problemas que ainda carecem de solução, por exemplo a oxidação do material utilizado como explante e a contaminação tardia por microorganismos latentes presentes no tecido vegetal. No presente trabalho se estudou o efeito de agentes desinfestantes no processo de oxidação e desinfestação do material cultivado, e também a ação de agentes antioxidantes no meio de cultivo.

O sucesso de um sistema de propagação *in vitro* depende do controle de um grande número de variáveis (Kozai et al., 1995). Sem dúvida a desinfecção dos explantes é uma etapa fundamental neste processo. A dificuldade maior nesta etapa reside em se obter tecido descontaminado sem conduzi-lo a morte quando isolado (Grattapaglia & Machado, 1998). Várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfecção dos explantes. Os mais comuns são o etanol e os compostos a base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio. Outros agentes desinfestantes usados incluem o cloreto de mercúrio, o ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônio e o peróxido de hidrogênio.

As concentrações das soluções desinfestantes assim como as combinações dos princípios ativos desinfestantes e os tempos de exposição podem variar muito. Considerando a sensibilidade do tecido a ser desinfestado, manipula-se a concentração da solução e tempo de exposição de maneira inversamente proporcional (Grattapaglia & Machado, 1998). A retirada do explante e manipulação no momento da desinfecção podem causar danos físicos culminando numa maior oxidação de fenóis no estabelecimento inicial deste, tendo como consequência principal à morte do explante.

A liberação de compostos fenólicos ocorre devido ao dano causado nas células durante a excisão dos explantes e algumas enzimas, como as polifenoloxidasas, oxidam os fenóis, que são compostos incolores, formando quinonas (Lerch, 1981; Barbosa, 2000). Algumas medidas podem ser tomadas a fim de reduzir a ação de fenóis. Teixeira (2004) relata que durante a excisão e esterilização, deve-se tomar os devidos cuidados para que os danos físicos e químicos ao explante sejam minimizados. A lavagem dos explantes coletados antes da desinfecção auxilia na lixiviação dos compostos fenólicos (Grattapaglia & Machado, 1998).

Algumas substâncias com ação antioxidante podem ser utilizadas após a desinfecção na forma de um último enxágüe mais demorado, ou fazendo o trabalho de isolamento de explantes dentro de uma placa de petri contendo a solução (Grattapaglia & Machado, 1998). Outra medida seria a adição destas substâncias ao meio de cultivo. O efeito do antioxidante consiste na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metabólicos ou na redução dos peróxidos para produtos incapazes de formar radicais livres com potencial de se oxidar (Araújo, 1995). Dentre as substâncias com efeito antioxidante, pode-se citar o ácido ascórbico, ácido cítrico, polivinilpirrolidona (PVP), carvão ativado, L-cisteína, ditiotreitól, tiuréia, água de coco e albumina de soro bovino. Estas substâncias

podem atuar de modo a inibir a síntese ou a ação de enzimas ligadas a oxidação dos polifenóis ou agir como adsorventes destas substâncias.

Os ácidos cítrico e ascórbico reagem com os metais presentes no meio de cultura, evitando que os mesmos fiquem disponíveis para se oxidarem (Araújo, 1995; Taiz e Zeiger, 1999).

MATERIAL E MÉTODOS

- Efeito de diferentes concentrações e tempo de exposição ao hipoclorito de sódio.

Foram utilizadas neste experimento gemas basais de *Epidendrum ibacuense* cultivadas em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa, sendo que estas plantas receberam tratamento prévio com a aplicação um coquetel com dois fungicidas e um bactericida nove dias antes da coleta, com intervalo de três dias entre cada aplicação.

Após a aplicação do tratamento prévio com o coquetel, gemas basais com comprimento variando entre 5 a 10 cm foram coletadas, levadas para a sala de preparo, no laboratório de cultura de células e tecidos vegetais, onde foram lavadas em água corrente e posteriormente imersas em solução detergente 1:10 (v/v) por 30 minutos, transcorrido este tempo retirou-se as brácteas externas das gemas, as quais foram novamente imersas em uma nova solução detergente durante 5 minutos, logo após serem lavadas em água corrente foram levadas para dentro do laboratório e sob condições de capela de fluxo laminar foram imersas em álcool 70 % durante um minuto. A partir deste ponto foram aplicados os tratamentos, que consistiram em quatro concentrações de hipoclorito (5, 10, 15 e 20 ml L⁻¹) e quatro tempos de exposição (5, 10, 15, 20 m).

Após a aplicação do agente desinfestante, foram realizadas quatro enxágües em água estéril, sendo a primeira por cinco minutos, e as três seguintes por 10 minutos cada. Logo após, as gemas de cada tratamento foram seccionadas em segmentos nodais com aproximadamente cinco milímetros de comprimento e inoculados em meio sólido, sendo incubados em sala de crescimento durante um mês, na ausência de luz e a 27 °C ± 2.

- Efeito de diferentes agentes antioxidantes.

Devido o fato deste material ser oriundo do campo, o mesmo foi deixado por uma noite em uma solução desinfestante composta pelo coquetel fungicida/bactericida, no dia seguinte as gemas foram lavadas em água corrente e levadas para dentro do laboratório. Sob condições de capela de fluxo laminar as gemas foram imersas em uma solução de álcool 70 % por um minuto, logo após foram imersas em uma solução com 100 % de água sanitária Super Globo® durante 20 minutos, sob agitação manual intermitente (Ventura, 2002), após esta operação foi realizado quatro enxágües nos tempos de 5, 10, 10 e 10 minutos respectivamente. Após o último enxágüe as gemas foram mantidas em uma solução contendo o agente antioxidante do respectivo tratamento até o momento de sua inoculação no meio, vale ressaltar também que os cortes realizados foram feitos em placa de petri contendo a solução antioxidante. Os segmentos nodais, assim preparados foram cultivados no meio MS completo, contendo diferentes agentes antioxidantes: Ácido Bórico, Carvão Ativado, L-Cisteína e Água de Coco, em sala de crescimento na ausência de luz e a 27 °C ± 2 (Quadro 1).

Quadro 1 - Agentes antioxidantes aplicados ao meio de cultura e a solução para realização dos cortes.

Tratamento	Agente antioxidante	Concentração no meio de cultura	Concentração na solução para cortes
Testemunha (T0)	-	-	-
T1	Ácido Bórico	6,20 mg/L	50 mg/L
T2	Carvão Ativado	2,0 g/L	2,0 g/L
T3	L-Cisteína	50 mg/L	50 mg/L
T4	Água de Coco	50 mL/L	100 % ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Foi utilizada água de coco pura filtrada.

Para ambos os ensaios o meio utilizado foi composto por: sais de MS (Murashige e Skoog, 1962); 30 g. L⁻¹ de sacarose; 0,4 mg. L⁻¹ de tiamina; 100 mg L⁻¹ de mio-inositol; 0,2g L⁻¹ de cinetina; 1,0 g L⁻¹ de ácido alfa-naftalenoacético (ANA) e 50 mL L⁻¹ de água de coco natural, o pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 e solidificado com 8 g.L⁻¹ de ágar Isofar® e distribuídos 10 mL L⁻¹ em tubos de ensaio e fechados com tampa de polipropileno (Ventura, 2002). Os tubos de ensaio contendo meio foram autoclavados a 1,5 atm e 121 °C, durante 15 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento da concentração de hipoclorito no meio provocou maior oxidação dos explantes o mesmo acontecendo para o aumento do tempo de exposição. Isso mostra a importância de se conhecer as concentrações que minimizem tais efeitos. Já em termos de contaminação não houve grandes diferenças na redução no nível de contaminação tanto em relação ao tempo quanto concentração de NaClO⁻ (Quadro 2). Um fato interessante a ser observado é o desempenho dos explantes para as doses 10,0 e 15,0 mL L⁻¹ de NaClO⁻, que mostraram melhores resultados em relação ao comprimento dos mesmos apresentando o máximo crescimento com a desinfestação realizada com 12,0 mL L⁻¹ de hipoclorito de Sódio (Figura 1).

No caso do uso de agentes antioxidantes apenas a L-cisteína mostrou resultados positivos no controle da oxidação, com redução de 50 % na mesma, os demais agentes: água de coco, ácido bórico e carvão ativado, não afetaram o controle da oxidação (Quadro 3).

Quadro 2 – Contaminação por bactéria e fungos e oxidação explantes e meio em resposta a concentrações e tempos de exposição de hipoclorito de sódio

Tempo m	NaClO mL L ⁻¹	Bactéria	Fungo	Oxid. Exp %	Oxid. Meio
5	20	50	-	30	50
5	15	30	-	50	20
5	10	10	-	10	-
5	5	10	10	50	-
10	20	10	10	-	10
10	15	10	-	-	-
10	10	10	-	30	-
10	5	30	-	30	-
15	20	10	-	-	10
15	15	10	-	20	-
15	10	50	10	20	20
15	5	30	-	30	40
20	20	40	-	50	20
20	15	20	20	40	10
20	10	40	-	40	30
20	5	50	10	70	30

Quadro 3 - Efeito de diferentes agentes antioxidantes na oxidação de explantes e nível de contaminação

Tratamento	Oxidação	Contaminação.
		%
Testemunha	90a	100a
Ac. Bórico	90a	90a
Água de Coco	80a	90a
Carvão Ativado	80a	70c
L-Cisteína	50b	20d

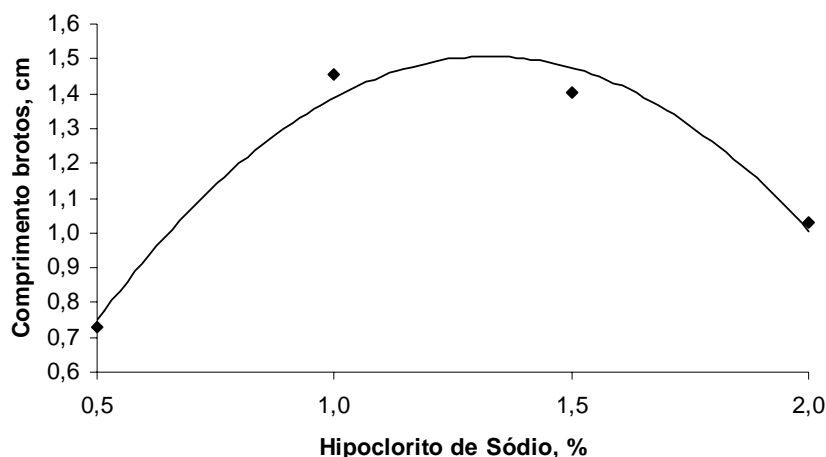


Figura 1 – Comprimento de brotos em resposta a concentração de NaClO na solução de desinfestação. Broto = $-4,2 + 10,17^{***} \text{Conc}^{0,5} - 4,58^{***} \text{Conc}$ $R^2 = 0,97$

CONCLUSÃO

O uso de L-Cisteína foi eficiente na redução da oxidação dos explantes, bem como o uso de concentrações menores de hipoclorito e menor tempo. Porém, a contaminação por fungos e bactérias não apresentou diferenças significativa entre os tratamentos aplicados.

BIBLIOGRAFIA

- ARAÚJO, J. M. A. (1985). **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: UFV, 355p.
- BARBOSA, L. C. A. (2000). **Química orgânica: uma introdução para as ciências agrárias e biológicas**. Viçosa: UFV, 354p.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. (1998). Propagação in vitro. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v.1, p. 183-260.
- KOZAI, T.; Fujiwara, K.; Kitaya, Y.; (1995). **Modeling, measurement and control in plant tissue culture**. Act. Hort., 393, 63-73.
- LERCH, K. (1981). **Cooper monooxygenases: tyrosinase and dopamine b-monoxydases**. In: Siegel, H. (Ed.). Metal ions in biological systems. Marchel Deckker, p. 143-186
- TAIZ, L.; Zeiger, E. (1998). **Plant physiology**. Publish Sunderland Editora Sinauer Associades: Massachusetts, 2^a ed.
- TEIXEIRA, J. B. (2004). **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. Disponível em: <http://www.redbio.org.br> em: 28 de junho de 2004.

PALAVRAS-CHAVES

Epidendrum ibacuense; orquídeas; agente desinfestante; antioxidantes.