

UTILIZAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO NA ESTERILIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Eucalyptus pellita* L.¹

USE OF SODIUM HIPOCHLORITE IN STERILIZATION OF CULTURE MEDIUM FOR MULTIPLICATION OF *Eucalyptus pellita* L.

Silvio Lopes Teixeira² Juliana Martins Ribeiro³ Márcia Torres Teixeira⁴

RESUMO

Ultimamente, vem-se observando grande interesse na área de pesquisa em cultura de tecidos vegetais, em se descobrir novas opções que resultem na redução dos custos da micropropagação das plantas em laboratórios comerciais, de modo a torná-la mais viável economicamente. Uma opção potencialmente promissora para a redução de custos, mas que não tem recebido a devida atenção, é a perspectiva de se substituir a técnica de autoclavagem por outra mais econômica. Com esse objetivo, foram realizados dois testes utilizando um novo protocolo de preparo do meio, que consistiu na esterilização química de todos os utensílios utilizados no preparo e acondicionamento do meio de cultura, associado à adição do esterilizante ao meio em diferentes concentrações. O primeiro teste teve como objetivo observar a influência de diferentes concentrações de NaClO adicionado ao meio de cultura sobre a esterilização deste. O segundo objetivou verificar a reação dos tecidos de *Eucalyptus pellita* a diferentes concentrações de NaClO adicionado ao meio de cultura. A adição, ao meio de cultura, de concentrações iguais ou superiores a 0,0005% no primeiro teste e de 0,005% no segundo, permitiu completa esterilização do meio, não se tendo observado qualquer dano aos tecidos do *Eucalyptus pellita*, quando cultivado em meio de cultura com até a concentração máxima testada, de 0,009% de NaClO. Os resultados obtidos mostraram a viabilidade de dispensar o uso da autoclave para a esterilização de meios de cultura para esta espécie.

Palavras-chave: esterilização química; micropropagação; autoclavagem.

ABSTRACT

Lately it has been observed a great interest in the research area of plant tissue culture in discovering new alternatives leading to cost reduction of the plants produced in commercial laboratories, in order to turn this alternative of plant propagation more economical. A potentially promising alternative for this reduction of costs, but which has not been receiving the due attention, is the possibility of substituting the autoclaving technique to a more economical one. With this purpose, two tests were carried out, using a new protocol of medium preparation, which consisted of the chemical sterilization of all the utensils used in the preparation and packaging of the culture medium as well, associated to the addition of the sterilizing agent to the medium, in different concentrations. The objective of the first test was to observe the influence of different concentrations of NaClO added to the culture medium, on its sterilization. The second test aimed at verifying the reaction of the *Eucalyptus pellita* tissues to different concentrations of NaClO in the culture medium. The addition of NaClO to the culture medium, equal or higher than 0.0005% in the first test and of 0.005% in the second one, allowed complete sterilization of the medium, without observing any damage to the *Eucalyptus pellita* tissues, even when they were grown on culture medium containing up to 0.009%, the maximum concentration tried. The results showed the viability of eliminating the autoclave for the sterilization of culture media.

Keywords: chemical sterilization; micropropagation; autoclaving.

1. Trabalho financiado pela FAPERJ, UENF e FENORTE/ TECNORTE.

2. Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Associado do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Av. Alberto Lamego 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes (RJ). teixeira70@yahoo.com.br

3. Bióloga, Dr^a., Pesquisadora de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Semi-Árido, BR 428, Km 152, Caixa Postal 23, Zona Rural, CEP 56.300-970, Petrolina (PE). juliana.ribeiro@cpatsa.embrapa.br

4. Engenheira Agrônoma, MSc, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, CEP 28013-602 Campos dos Goytacazes (RJ).

INTRODUÇÃO

A produção de mudas de plantas florestais e de outras espécies em laboratórios comerciais apresenta custo elevado, como resultado do elevado custo das instalações e da energia necessária. Ultimamente vem crescendo o interesse em se buscar novas opções para essa finalidade, e uma delas tem sido a substituição da técnica de esterilização por autoclavagem, por alguma outra de menor custo.

A autoclavagem de vidraria, meios de cultura e materiais cirúrgicos (BURGER, 1988) encarece a produção de mudas em laboratório, em razão do elevado custo do equipamento e do igualmente elevado consumo de energia, além do longo tempo necessário para esterilização de limitado número de frascos. Além disso, a autoclavagem pode levar à decomposição de componentes do meio de cultura (BALL, 1953; STREETT e LOWE, 1950).

A opção do uso de forno de microondas com esse objetivo tem sido testada sem muito sucesso (Tisserat *et al.*, 1992; Teixeira *et al.*, 2005a; 2005b), em consequência da ebulição e transbordamento prematuros do líquido, antes da sua completa esterilização. A esterilização de meios nutritivos por meio químico é outra opção teoricamente possível, porém negligenciada. As empresas Plant Cell Technology, Inc (1995) e Bioactivos Químicos CBQ Centro (1997) patentearam esterilizantes químicos com esse objetivo, os quais, porém, não têm sido amplamente utilizados. Snow (1985) relatou o emprego de peróxido de hidrogênio para reduzir a contaminação de meios de cultura para germinação de sementes de orquídea, enquanto Yanagawa *et al.* (1995) afirmam ter obtido sucesso na inoculação de sementes de orquídea em meio de cultura, em condições não-assépticas, 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 a 0,5 %, após a inoculação das sementes. Em ambos os casos, não se encontrou na literatura científica qualquer informação de que tais procedimentos venham sendo utilizados.

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 em concentrações muito abaixo daquelas relatadas por Snow (1985) e por Yanagawa *et al.* (1995). Recentemente, Teixeira *et al.* (2006) mostraram que o uso do referido protocolo, além de permitir a eliminação da contaminação introduzida no meio pelos explantes provenientes de cultura *in vitro* de abacaxizeiro, resultou também no aumento do número de ramos e do peso da biomassa fresca. O objetivo desta pesquisa foi usar o referido protocolo (TEIXEIRA *et al.*, 2006), para a multiplicação de *Eucalyptus pellita in vitro*, o qual difere do protocolo tradicional, desenvolvido por Murashige e Skoog (1962), por utilizar 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.

MATERIAL E MÉTODOS

As soluções de água clorada empregadas na pesquisa foram preparadas com água sanitária comercial da marca “CAMPINHO[®]”, contendo 2% de cloro ativo total, diluída com água deionizada para se obter a concentração desejada. A dosagem da água sanitária, quando referida em gotas, foi efetuada com uma pipeta-Pasteur; quando referida em volume definido, foi efetuada com uma pipeta Eppendorf[®].

Os tubos de ensaio e tampas utilizados para as culturas, bem como a vidraria usada no preparo do meio, após o uso anterior, foram lavados em água de torneira, enxaguados em água clorada composta de água deionizada adicionada de duas gotas de água sanitária comercial por litro, e mantidas em prateleiras limpas até a data da utilização.

A água utilizada para a diluição dos reagentes foi esterilizada em dias anteriores, pela adição de duas gotas de água sanitária por litro de água deionizada.

Foram conduzidos dois testes: o primeiro teve como objetivo observar o efeito de três concentrações de cloro ativo total adicionado ao meio de cultura, sobre a eliminação de microorganismos. Os tratamentos foram: A) meio de cultura preparado pelo protocolo convencional (MURASHIGE e SKOOG, 1962), mas sem autoclavagem (tratamento controle); B) meio de cultura preparado pelo protocolo de Teixeira (TEIXEIRA *et al.*, 2006), com a vidraria enxaguada com água clorada como descrito acima, mas sem adição de NaClO ao meio de cultura; C) meio de cultura preparado pelo protocolo de Teixeira (TEIXEIRA *et al.*, 2006), com a vidraria enxaguada com água clorada como descrito acima e adicionado de 0,0005% de cloro ativo total; D) meio de cultura preparado pelo protocolo de Teixeira (TEIXEIRA *et al.* 2006), com a vidraria

enxaguada com água clorada como descrito acima e adicionado de 0,001% de cloro ativo total; E) meio de cultura preparado pelo protocolo de Teixeira (TEIXEIRA *et al.*, 2006), com a vidraria enxaguada com água clorada como descrito acima e adicionado de 0,002% de cloro ativo total. Nos tratamentos preparados pelo protocolo de Teixeira (TEIXEIRA *et al.*, 2006), com adição de NaClO ao meio de cultura, estes não foram autoclavados.

O meio de cultura para o primeiro teste consistiu nos sais de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), vitaminas de White (WHITE, 1943), 100mg L⁻¹ de inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 1,5g L⁻¹ de PHYTAGEL[®]. O meio contendo o PHYTAGEL[®] foi aquecido em forno de microondas CONSUL[®] modelo WAVE 400, na potência máxima e dispensado à base de 5mL/ tubo de ensaio de 25 x 150 mm. Logo em seguida, os tubos de ensaio foram cobertos com a tampa de polipropileno cuja base foi selada com filme de PVC ROLOPAC[®].

O preparo dos meios de cultura, segundo o protocolo de Teixeira (TEIXEIRA *et al.*, 2006) obedeceu aos seguintes passos: a vidraria utilizada no preparo do meio de cultura foi enxaguada com água deionizada adicionada de duas gotas de água sanitária pouco antes do início do preparo do meio. No momento do enchimento com o meio de cultura, os tubos de ensaio e tampas foram enxaguados com água clorada a 0,001% de cloro ativo total, com exceção do tratamento-controle cujos utensílios foram enxaguados com água apenas deionizada. As operações de preparo do meio de cultura foram efetuadas sobre a bancada do laboratório, em ambiente não-estéril e somente o enchimento dos tubos de ensaio com o meio de cultura foi efetuado no ambiente estéril da capela de fluxo laminar. As operações de preparo do meio de cultura obedeceram à seguinte seqüência: todos os reagentes, inclusive sacarose e PHYTAGEL[®] foram adicionados a um erlenmeyer; adicionou-se em seguida o NaClO; após 15 minutos procedeu-se à diluição do meio de cultura para o seu volume final; ajustou-se o pH, e o erlenmeyer foi introduzido no forno de microondas para fusão do PHYTAGEL[®]; em seguida o meio de cultura foi vertido nos tubos de ensaio e colocada a tampa de polipropileno; após o esfriamento do meio de cultura foi efetuada a inoculação dos explantes.

O segundo teste teve como objetivo observar a reação dos tecidos de *Eucalyptus pellita* cultivado no meio nutritivo preparado pelo protocolo de Teixeira (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

O material vegetal utilizado como explante constituiu-se de segmentos nodais de *Eucalyptus pellita* cultivado *in vitro*, proveniente de germinação de sementes em bandejas plásticas, e cultivado *in vitro* por duas passagens sucessivas.

Os tratamentos consistiram nas seguintes concentrações de NaClO (p/v) no meio de cultura: A) meio de cultura preparado pelo protocolo convencional, de Murashige e Skoog (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e autoclavado (controle A); B) meio de cultura preparado pelo protocolo convencional, de Murashige e Skoog (MURASHIGE e SKOOG, 1962) não-autoclavado (controle B); C) meio de cultura preparado pelo protocolo de Teixeira (TEIXEIRA *et al.*, 2006) e adicionado de 0,001% de cloro ativo total; D) meio de cultura preparado pelo protocolo de Teixeira (TEIXEIRA *et al.*, 2006) e adicionado de 0,003% de cloro ativo total; E) meio de cultura preparado pelo protocolo de Teixeira (TEIXEIRA *et al.*, 2006) e adicionado de 0,005% de cloro ativo total; F) meio de cultura preparado pelo protocolo de Teixeira (TEIXEIRA *et al.*, 2006) e adicionado de 0,007% de cloro ativo total, e G) meio de cultura preparado pelo protocolo de Teixeira (TEIXEIRA *et al.*, 2006) e adicionado de 0,009% de cloro ativo total.

O preparo do meio de cultura para o segundo teste obedeceu aos seguintes passos: a água utilizada no preparo do meio de cultura consistiu em água deionizada, esterilizada com duas gotas de água sanitária em dias anteriores e uma gota adicionada à mesma água no momento do preparo do meio. No momento do uso, a vidraria utilizada no preparo do meio, os tubos de ensaio e tampas, bem como a bureta utilizada para dispensar o meio de cultura nos tubos de ensaio foram enxaguados com água clorada a 0,003% de cloro ativo total, com exceção dos tratamentos-controle A e B, cujos utensílios foram enxaguados com água apenas deionizada.

Todas as operações iniciais de preparo do meio de cultura foram efetuadas em ambiente não-estéril e somente o enchimento dos frascos foi efetuado na capela de fluxo laminar. A seqüência das operações de preparo do meio de cultura obedeceu à mesma seqüência descrita para o primeiro experimento.

O meio de cultura foi constituído dos sais de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), vitaminas de White (WHITE, 1943), 2,0mg.L⁻¹ AIA, 1,8mg.L⁻¹ AIB, 2,2mg.L⁻¹ BAP, 100g.L⁻¹ inositol, 30g.L⁻¹ sacarose e

1,5g.L⁻¹ de PHYTAGEL®. O pH foi ajustado para 6,0_{±0,1} e o meio de cultura acondicionado em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, à base de 20 mL/tubo de ensaio.

As culturas foram incubadas em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 19 µmol.m⁻².s⁻¹, fornecida por tubos fluorescentes OSRAM®, do tipo “luz do dia” e 40 Watts de potência.

Os parâmetros utilizados para avaliação no primeiro teste foram: pH do meio antes do ajuste para 6,0 ± 0,1, número total e porcentagem de culturas contaminadas.

Os parâmetros utilizados para avaliação no segundo teste foram: porcentagem de culturas contaminadas, número e comprimento médio dos ramos por cultura.

A coleta de dados correspondentes à contaminação do meio de cultura foi feita pelo aspecto visual destes a olho nu, decorridos do dias da inoculação dos explantes nos meios. Foram consideradas como não-contaminadas as culturas que se apresentaram límpidas, sem nenhuma mancha na superfície ou no interior do meio de cultura.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco e sete tratamentos, respectivamente para o primeiro e o segundo teste, vinte repetições e um tubo de ensaio contendo um explante, por unidade experimental. Foi acrescentado um tubo de ensaio a mais, para cada tratamento, para determinação do pH do meio antes do seu ajuste.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro teste, os resultados apresentados na Tabela 1 mostram uma pequena tendência de elevação dos pHs com o aumento da concentração de NaClO no meio de cultura. Teixeira *et al.* (2005b) observaram diferenças mais pronunciadas entre os pHs dos diferentes tratamentos, porém, a amplitude de variação entre as concentrações de NaClO foi também maior.

O percentual de contaminação foi de 100% no tratamento controle, com base no protocolo tradicional, mas sem o procedimento de autoclavagem. No entanto, houve uma diminuição desse percentual para 40% no meio de cultura preparado pelo protocolo de Teixeira (TEIXEIRA *et al.*, 2006), mas sem adição de NaClO no meio de cultura. Sendo assim, um dos motivos que justifique essa diferença pode ter sido em razão da presença, no meio de cultura desse tratamento, de cloro residual proveniente da água clorada empregada no enxague da vidraria utilizada tanto no preparo quanto no acondicionamento do meio de cultura.

TABELA 1: Efeito da presença de NaClO nos meios de cultura sobre o pH antes do ajuste para 6,0 ± 0,1 e sobre a contaminação das culturas.

TABLE 1: Effect of the presence of NaClO in the culture media, on the media pH before its adjustment to 6.0 ± 0.1 and on the cultures contamination.

Concentração de NaClO no meio de cultura (%)	pH do meio antes do ajuste para 6,0 ± 0,1	Tubos de ensaio contaminados (%)
Controle	4,83	100 a
0	4,83	40 b
0,0005	4,93	0 b
0,001	5,07	0 b
0,002	5,14	0 b

Em que: Os dados acompanhados de uma mesma letra na coluna são estatisticamente iguais segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A esterilização dos meios contendo NaClO foi completa, até mesmo com a concentração mais baixa, de 0,0005%. Esses resultados são parecidos com aqueles relatados por Teixeira *et al.* (2005b) e foram muito superiores àqueles citados por Yanagawa *et al.* (1995), que observaram 80% de contaminação, quando adicionaram 0,001% de NaClO ao meio de cultura. Isso pode ser explicado pelo fato de os autores citados acima não terem adotado os procedimentos de sanitização da vidraria citados nesse trabalho, ou então que a solução concentrada de hipoclorito de sódio por eles utilizada não tivesse a concentração suposta.

Os dados sobre contaminação da Tabela 2 estão de acordo com os resultados de Teixeira *et al.* (2005b). A esterilidade foi completa somente partindo da concentração de 0,005 % de hipoclorito de sódio

no meio de cultura. Todavia, foram observadas contaminações dos meios de cultura contendo concentrações abaixo de 0,005% e até mesmo no tratamento-controle autoclavado, ou nas bases dos explantes ou à superfície do meio, o que indica se tratar de contaminações introduzidas no meio de cultura junto com os explantes, no primeiro caso, e caídos à superfície do meio no momento do enchimento dos frascos, no segundo caso.

TABELA 2: Efeito da presença do NaClO nos meio de cultura sobre o pH antes do ajuste para $6,0 \pm 0,1$ e sobre a contaminação das culturas.

TABLE 2: Effect of the presence of NaClO in the culture media, on the media pH before its adjustment to 6.0 ± 0.1 and on the cultures contamination.

Concentração de NaClO no meio de cultura (%)	Culturas contaminadas (%)	Número médio de ramos	Comprimento médio dos ramos (cm)
Controle A	20 b	4,9 a	0,73 b
Controle B	100 a	-	-
0,001	40 b	3,7 b	0,96 a
0,003	20b	3,5 b	0,85 a
0,005	0 b	3,5 b	0,94 a
0,007	0b	3,5 b	0,96 a
0,009	0b	2,2 c	0,94 a

Em que: Os dados acompanhados de uma mesma letra na coluna são estatisticamente iguais segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para tal situação, pode-se admitir que os explantes, apesar de serem provenientes de cultura *in vitro*, apresentavam contaminação endógena, além da contaminação no momento do enchimento dos frascos de cultura. Diante desse fato, pode-se esperar que as contaminações introduzidas pelos explantes ou provenientes do ar circundante, não sobrevivam às concentrações de NaClO iguais ou acima de 0,005% de NaClO no meio de cultura, o que está de acordo com os resultados de Teixeira *et al.* (2006). Isso se constitui em uma vantagem adicional desse novo protocolo de esterilização química em relação ao protocolo tradicional de esterilização por autoclavagem, possibilitando assim a eliminação de microorganismos endógenos e a realização da operação de enchimento dos frascos de cultura, bem como a inoculação do meio, em ambiente com elevado índice de assepsia.

Quanto ao comportamento do *Eucalyptus pellita*, observa-se que a presença de NaClO no meio de cultura, em todas as concentrações testadas, causou uma leve redução no número de ramos, mas estimulou o crescimento destes, quando comparados ao tratamento controle (Quadro 2). Não houve diferença estatística quanto à reação do *E. pellita* a concentrações de até 0,007% de NaClO no meio de cultura, o que sugere esta como a melhor concentração a ser utilizada.

Não se observou qualquer diferença visual entre os tratamentos com NaClO e o tratamento-controle, quanto ao aspecto dos explantes, os quais se apresentaram aparentemente saudáveis, de cor verde normal e sem anomalias morfológicas.

Yanagawa *et al.* (1995) só foram bem sucedidos quanto à obtenção de assepsia, quando pulverizaram solução de 0,5 % de NaClO, em ambiente não estéril, à superfície do meio de cultura previamente autoclavado. Nesse caso, não relataram o efeito do esterilizante sobre o crescimento das plantas. Quando esterilizaram o meio com 0,01 % de NaClO e o pulverizaram com 0,5 % do mesmo esterilizante, ocorreu crescimento normal das plântulas, mas os autores não relataram a porcentagem de contaminação observada.

Os resultados deste trabalho reforçam a conclusão de Teixeira *et al.* (2006) sobre a viabilidade do uso do hipoclorito de sódio, em baixas concentrações, 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.

Nos dois protocolos de esterilização de meios de cultura patenteados com outros produtos químicos (Bioactivos Químicos CBQ Centro, 1997; Plant Cell Technology Inc., 1995), bem como nos trabalhos relatados por Snow (1985) e Yanagawa *et al.* (1995), não foi adotado procedimento semelhante a esse novo protocolo, que associa a adição do esterilizante ao meio de cultura com outras medidas de assepsia adicionando o mesmo esterilizante também à água com que foram enxaguados todos os utensílios utilizados.

Esta modificação no procedimento tradicional de preparo de meios de cultura foi, sem dúvida, o fator que permitiu obter sucesso na esterilização, utilizando concentração do esterilizante no meio de cultura até dez vezes menor do que aquelas até então relatadas.

É importante observar que, quando Teixeira *et al.* (2006) utilizaram meio líquido para abacaxizeiro, eles obtiveram sucesso na esterilização do meio, com concentração de 0,0005% de NaClO no meio de cultura, que é ainda dez vezes menor do que a empregada no segundo teste. A necessidade de concentração dez vezes maior neste trabalho certamente foi porque se utilizou meio semi-sólido, o qual foi submetido a aquecimento no forno de microondas para fusão do Phytigel. Sem dúvida, esse aquecimento resultou na eliminação praticamente total do NaClO, já que um teste efetuado pelos autores não acusou sequer traços do produto no meio de cultura, após aquela operação.

Quanto à esterilização do meio com apenas a adição de 0,0005% de NaClO ao meio de cultura do primeiro teste, cujo protocolo foi o mesmo do segundo e usando também meio semi-sólido, pode-se sugerir que o cuidado com as manipulações durante todo o processo, bem como a assepsia do ambiente, como no caso de utilização de sistema de pressão positiva, podem ser fatores determinantes do sucesso do protocolo.

CONCLUSÕES

É possível obter a esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais, pela adição de 0,0005 % ou mais de NaClO ao meio de cultura, desde que se adotem as demais medidas de assepsia estabelecidas neste protocolo.

A adição de NaClO ao meio de cultura, até a concentração de 0,009 % de hipoclorito de sódio, resulta em pequena redução no número de ramos de *Eucalyptus pellita*, mas em compensação estimula significativamente o alongamento deles.

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

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Estadual do Norte Fluminense – FENORTE, ao Parque de Alta Tecnologia do Norte Fluminense – TECNORTE, à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e à Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, pelo auxílio financeiro sob a forma de bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, M.C.; TEIXEIRA, S.L. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de microondas. 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.
- ARAUJO, M.C.; TEIXEIRA, S.L. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de microondas. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UENF, 4., 1999, Campos dos Goytacazes, RJ. **Livro de resumos**. Campos dos Goytacazes, RJ : CCTA/UENF, 1999. Resumo D-29, Pg. 81.
- BALL, E. Hydrolysis of sucrose by autoclaving media a neglected aspect in the technique of culture of plant tissues. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, Lancaster-PA, v. 80, p. 409-411, 1953.
- BIOACTIVOS QUÍMICOS CBQ CENTRO. Diaz Martinez Grisell; Conzalez Bedia Martha Mayra; Salazar Yera Eloisa; Castanedo Cancio Nilo Ramon; Cueto Sanchez Madaisy de la Ca; Gonzalez Lorenzo Carlos Manuel; Machado Rodriguez Rosa Margari; Martin Triana Esther Lilia; Ramirez Dieguez Alain. **Microcide composition**. AO1N43/00. CU EP0920804. 23/06/1997. European Patent Disponível em < <http://v3.espacenet.com/texto?AB>>
- BURGER, D.W. Guidelines for autoclaving liquid media used in plant tissue culture. **HortScience**, Alexandria-VA, v. 23, p. 1066-1068, 1988.
- MURASHIGE, T.M.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-97, 1962.
- PLANT CELL TECHNOLOGY, INC. Assaf Z. Guri & Kishor N. Patel. **Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media**. C12N005/00; C12N005/02. US 5,750,402. 02/06/1995, 12/05\1998. United States Patent and Trademark Office – USPTO. Disponível em <<http://www.uspto.gov/patft/index.html>>
- SNOW, R. Improvements in methods for the germination of orchid seeds. **American Orchid Society Bulletin**, West

Palm Beach, Fla, v. 54, p. 178-181, 1985.

STREET, H.E.; LOWE, J.S. The carbohydrate nutrition of tomato roots. II. The mechanism of sucrose absorption by excised roots. **Annals of Botany**, London, v. 14, p. 307-329, 1950.

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 microondas. **Revista CERES**, Viçosa – MG, v. 52, p. 343-349, 2005a.

TEIXEIRA, S.L.; SOUSA, R.T.S.; TEIXEIRA, M.T. Esterilização de meios nutritivos para cultura de tecidos vegetais em forno de microondas. **Revista CERES**, Viçosa – MG, v. 52, 2005b.

TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, M.T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Holanda, v. 86, n. 3, p. 375-378, 2006.

TISSERAT, B.; JONES, D.; GALLETTA, P.D. Microwave sterilization of plant tissue culture media. **HortScience**, Alexandria-VA, v. 27, p. 358-361, 1992.

WHITE, P.R. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient medium for cultivation of excised tomato roots. **Growth**, Lakeland, Fla, v. 7, p. 53-65, 1943.

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**, Palm Beach, Fla, v. 10, p. 33-36, 1995.