

Cultivo *in vitro* de explantes removidos de plantas cultivadas a campo visando à micropropagação de *Eucalyptus citriodora*

*In vitro culture of explants removed from field-cultivated plants for micropropagation of *Eucalyptus citriodora**

*Cultivo in vitro de explantes removidos de plantas cultivadas a campo para la micropropagación de *Eucalyptus citriodora**

Lorrayne Guimarães Bavaresco

Mestranda em Agronomia
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Brasil
lgbavaresco@hotmail.com

Rafael Pasquali

Graduado em Agronomia
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, Brasil
rafaelpasquali00@hotmail.com

Antonio Fluminhan

Professor Doutor
fluminhan@hotmail.com

RESUMO

Eucalyptus citriodora apresenta diversas finalidades silviculturais e muitas vantagens em relação à adaptabilidade, rapidez de crescimento, qualidade da madeira e extração de óleo essencial. Porém, sua multiplicação comercial no Brasil ainda é limitada pela baixa disponibilidade de sementes e pelo difícil enraizamento em estacas e miniestacas na produção clonal. O presente trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo experimental para o cultivo *in vitro*, avaliando métodos para obtenção e descontaminação de explantes, emprego de diferentes meios de cultura e de um composto antioxidante visando à micropropagação desta espécie. Foram utilizados como explantes segmentos nodais com 1 a 2 cm, originados de rebrotas de plantas matrizes adultas mantidas a campo, submetidas a tratamento fitossanitário periódico. Após a limpeza e assepsia, os explantes foram cultivados em meios JADS, WPM e MS, suplementados com ácido ascórbico, prolina, glutamina, ácido aspártico e arginina. Foram avaliadas as taxas de sobrevivência, contaminação fúngica e bacteriana e grau de oxidação dos explantes. O tratamento de descontaminação de plantas matrizes otimizou o protocolo de assepsia, sendo eficiente para a instalação das culturas. Foi notada uma grande interação genótipo x meio de cultura, que afetou o seu estabelecimento *in vitro* e com reflexo na longevidade das culturas.

PALAVRAS-CHAVE: Silvicultura. Biotecnologia. Cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Eucalyptus citriodora has several silvicultural purposes and many advantages in relation to the adaptability, speed of growth, quality of the wood and extraction of essential oil. However, its commercial multiplication in Brazil is still limited by the low availability of seeds and by the difficult rooting of cuttings and minicuts in clonal production. The present research aimed to establish an experimental protocol for *in vitro* culture, evaluating methods for obtaining and decontaminating explants, using different culture media and an antioxidant compound for the micropropagation of this species. Nodal segments with 1 to 2 cm originated from regrowths of adult matrices maintained in the field, submitted to periodic phytosanitary treatment, were used as explants. After cleansing and asepsis, the explants were cultured in JADS, WPM and MS media, supplemented with ascorbic acid, proline, glutamine, aspartic acid and arginine. The survival rates, fungal and bacterial contamination and degree of oxidation of the explants were evaluated. The decontamination treatment of matrix plants optimized the asepsis protocol, being efficient for the installation of the cultures. A great interaction genotype x culture medium was observed, which affected the *in vitro* establishment and reflected on the longevity of the cultures.

KEYWORDS: Forestry. Biotechnology. *In vitro* culture.

RESUMEN

Eucalyptus citriodora presenta diversas finalidades silvícolas y muchas ventajas en relación a la adaptabilidad, rapidez de crecimiento, calidad de la madera y extracción de aceite esencial. Sin embargo, su multiplicación comercial en Brasil todavía está limitada por la baja disponibilidad de semillas y por el difícil enraizamiento en estacas y minizas en la producción clonal. El presente trabajo tuvo por objetivo establecer un protocolo experimental para el cultivo *in vitro*, evaluando métodos para obtención y descontaminación de explantes, empleo de diferentes medios de cultivo y de un compuesto antioxidante para la micropropagación de esta especie. Se utilizaron como explantes segmentos nodales de 1 a 2 cm, originados de rebrotes de plantas matrizes adultas mantenidas a campo, sometidas a tratamiento fitosanitario periódico. Después de la limpieza y asepsia, los explantes fueron cultivados en medios JADS, WPM y MS, suplementados con ácido ascórbico, prolina, glutamina, ácido aspártico y arginina. Se evaluaron las tasas de supervivencia, contaminación fúngica y bacteriana y grado de oxidación de los explantes. El tratamiento de descontaminación de plantas matrizes optimizó el protocolo de asepsia, siendo eficiente para la instalación de los cultivos. Se notó una gran interacción genotipo x medio de cultivo, que afectó su establecimiento *in vitro* y con reflejo en la longevidad de las culturas.

PALAVRAS-CLAVE: Silvicultura. Biotecnología. Cultivo *in vitro*.

INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* engloba o maior número de espécies florestais conhecidas, sendo atualmente de grande importância econômica, devido ao fato de apresentar inúmeras características vantajosas, tais como: rápido crescimento, grande variedade de espécies, adaptabilidade a diversas condições edafoclimáticas e alto potencial para a produção de madeira e derivados (ABRAF, 2013).

A espécie de *Eucalyptus citriodora* ocorre nas regiões norte e central da província de Queensland na Austrália, em altitudes variáveis, de clima quente úmido ou sub úmido, tolerando vários tipos de solo, preferindo solos bem drenados, resistindo a geadas leves e apresentando boa resistência a deficiência hídrica. Esta espécie ocorre principalmente em florestas abertas ou matas em formação (BOLAND *et al*, 1984).

A planta apresenta tronco ereto com casca lisa e decídua, cinza, branca ou rósea, com porte entre 15 a 30m de altura (LORENZI *et al.*, 2003). Segundo Pereira *et al.* (2000) a madeira possui alta densidade, variando de 0,73 g/cm³ a 0,99 g/cm³ e é amplamente cultivada em florestamento para produção de madeira (construção, caixotaria, postes, mourões, dormentes, lenha e carvão). Em adição, as suas folhas são muito utilizadas para a produção de óleos essenciais para indústria de perfumaria e desinfetantes, em função da sua produção de óleo citronela entre 1,60 a 1,65% (VITTI; BRITO, 1999; BOLAND *et al*, 1984).

O cultivo do *E. citriodora* tem sido ampliado no Brasil, ano após ano, pelas suas características de rápido crescimento e adaptação edafoclimáticas, além das características silviculturas, qualidade de sua madeira e óleo essencial (MORAIS *et al*, 2010). Pelas características de alta adaptação a diferentes regiões do Brasil e atividades agregadas a esta espécie, pode-se afirmar que há uma grande possibilidade de seleção de populações geneticamente superiores e resistentes a geadas e seca, e que poderiam ser submetidos à micropropagação para multiplicação destes materiais (FERREIRA; SANTOS, 1997). Por se tratar de uma planta de uso múltiplo e de importância comercial, se torna promissora a propagação *in vitro* e manipulação genética desta espécie.

Devido a limitações referentes à obtenção de mudas homogêneas e à dificuldade de enraizamento por meio de estaquia convencional, torna-se apropriada a utilização de técnicas de micropropagação para a produção massal desta espécie. A micropropagação, ou propagação vegetativa *in vitro*, consiste na reprodução de plantas idênticas à planta mãe pelo cultivo asséptico de partes das plantas em condições controladas de nutrição, umidade, luz e temperatura (QUISEN; ANGELO, 2008; MALYSZ *et al.*, 2011; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A crescente busca pelo melhoramento genético e seleção de genótipos superiores de espécies lenhosas permitiu a difusão de técnicas de biotecnologia voltadas à propagação *in vitro*, em especial a clonagem vegetativa. Bonga; Von Aderkas (1992) ressaltam que, entre as técnicas de cultivo *in vitro*, a micropropagação se destaca entre aquelas de maior interesse científico e econômico, pois possibilita alto índice de multiplicação em escala, reprodução de plantas idênticas à planta mãe, propagação de material livre de patógenos e vírus, multiplicação de espécies de difícil propagação vegetativa *in vivo* e exigindo espaço reduzido para a

multiplicação de mudas. Conforme Ferreira; Santos (1997) esta técnica permite a obtenção de populações de indivíduos com estabilidade genética, maior produtividade e resistência, e a rápida multiplicação de genótipos com características econômicas favoráveis. Aliada a estas aplicações, Bonga e Von Aderkas (1992) citaram também a possibilidade da criopreservação de tecidos por longos períodos, a remoção de patógenos de propágulos e o maior controle das condições ambientais durante a multiplicação das mudas.

As técnicas de propagação *in vitro* têm sido largamente difundidas e aplicadas na área florestal possibilitando à manutenção do genótipo e do fenótipo das variedades selecionadas, oferecendo propagação comercial de plantas geneticamente idênticas e fisiologicamente uniformes, possibilitando a obtenção de grande número de indivíduos, maiores índices de enraizamento, com excelente estado fitossanitário, a partir de poucas matrizes, em curto espaço de tempo e em reduzida área de laboratório (BONGA; VON ADERKAS, 1992). Pode também auxiliar em programas de melhoramento, possibilitando a antecipação em décadas dos resultados finais e regeneração de plantas com dificuldade de reprodução natural (PAIVA; GOMES, 1995; XAVIER *et al.*, 2007).

No entanto, uma das grandes limitações da micropropagação é o alto investimento em instalações e manutenção de um laboratório, resultando em um aumento de custo de produção das mudas e também, a necessidade de desenvolvimento de protocolos específicos para diferentes espécies ou grupos de clones, bem como a recalcitrância de espécies lenhosas a propagação *in vitro* e os riscos de contaminação das culturas por microrganismos e oxidações dos explantes, dificultam sua multiplicação em larga escala (XAVIER *et al.*, 2009; DUTRA *et al.* 2009; CORDEIRO, 2013). Efetivamente, um dos maiores entraves no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas está a dificuldade de se obter tecidos livres de contaminações provocadas por fungos e bactérias e a frequente ocorrência de oxidações provocadas por compostos fenólicos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para Cordeiro (2013) o gasto na execução desta técnica é altamente compensatório quando empregados em plantas com alto valor agregado e com grande demanda de mercado, como é o caso do eucalipto, justificando assim, os estudos para aperfeiçoar a micropropagação em benefício de necessidades específicas e comerciais.

De acordo com Dutra *et al.* (2009) o eucalipto é o gênero florestal que mais possui estudos referente a micropropagação, sendo aquele o primeiro relato de sucesso com o cultivo *in vitro* em regeneração de plântulas em espécie de *Eucalyptus citriodora*. A alta taxa de multiplicação proporcionada pela micropropagação possibilita a clonagem de híbridos e genótipos selecionados de *Eucalyptus* de alto valor e de difícil enraizamento (BRONDANI *et al.*, 2009).

As etapas da micropropagação seguem um procedimento padrão, no qual os explantes oriundos de material vegetal são selecionados e coletados no campo ou em cultivo protegido, desinfestados, esterilizados e utilizados para inoculação em meios de cultura. Diversos tipos de explantes podem ser utilizados para iniciar a propagação *in vitro*. Assim, a seleção dos explantes deve ser realizada, preferencialmente, a partir de brotações fisiologicamente ativas em estágio primário de crescimento (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Em espécies lenhosas, existe um gradiente de juvenildade em direção à base da árvore,

podendo este variar entre as espécies (WENDLING 2002). A maior juvenilidade da região basal das plantas se deve ao fato de que os meristemas mais próximos da base formaram-se em épocas mais próximas à germinação que o das regiões terminais (HARTMANN *et al.*, 1997). Para isso o emprego do procedimento de rejuvenescimento através de decepta de árvores adultas doadoras tem se mostrado eficiente para a indução de características juvenis (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral estabelecer um protocolo experimental para o cultivo *in vitro* de *Eucalyptus citriodora*, avaliando métodos de descontaminação de explantes, a utilização de diferentes meios de cultura para a micropropagação desta espécie.

Foram avaliados também a eficiência de utilização de segmentos nodais dos meristemas apicais como explantes, os quais foram oriundos da decepta de plantas matrizes adultas mantidas à campo.

Foram testados os meios de cultivo JADS, WPM e MS, e avaliados os efeitos da adição de antioxidante e aminoácidos nos mesmos, para verificar qual a combinação mais adequada entre as composições dos meios para o estabelecimento *in vitro* da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Os explantes utilizados foram coletados em área de povoamento comercial da decepta de plantas matrizes de *Eucalyptus citriodora* localizada no município de Álvares Machado-SP. Essas plantas foram originadas a partir de plantio por sementes, possuindo cerca de 20 anos de idade, e sendo a madeira destinada para construções rurais (curral, mourões, tábuas). Para a obtenção das matrizes, foram escolhidas 5 árvores de altura média ao redor de 20 m e DAP (diâmetro a altura do peito) médio de 47 cm, com copas bem formadas a que não apresentavam sintomas de deficiência nutricional ou ocorrência de ataque de pragas e doenças.

As plantas escolhidas foram cortadas, deixando-se uma cepa de cerca de 25 cm de altura. Com o início das brotações, foram realizados tratamentos preventivos com fungicidas Recop® (Oxicloreto de cobre) a 2 g.L⁻¹(p.c) e Cercobin® 700 WG (Tiofanato-Metílico) a 1g.L⁻¹ (p.c) a cada 15 dias.

Após 90 dias do corte das plantas, as brotações jovens com aproximadamente 60 cm de comprimento total tiveram as suas extremidades, com dimensão de aproximadamente 12 cm, coletadas. As coletas ocorreram nas primeiras horas da manhã, sendo acondicionadas em frasco plástico contendo água, colocados em isopor com gelo, e transportados até o Laboratório localizado em Presidente Prudente-SP, acarretando um tempo de transporte de aproximadamente 30 minutos.

Protocolo de descontaminação de explantes

Em laboratório, as brotações foram pré-lavadas em água de osmose reversa para remoção de impurezas. Após esta limpeza inicial, foram removidas cuidadosamente as folhas e seccionados os explantes contendo um par de gemas axilares com aproximadamente 1 a 2 cm de comprimento (Figura 1 - A e B).

FIGURA 1 - Obtenção de explantes para iniciação da micropropagação *in vitro* de *Eucalyptus citriodora*: (A) Remoção das folhas das brotações, (B) Segmento nodal com comprimento aproximado de 1 a 2 cm.



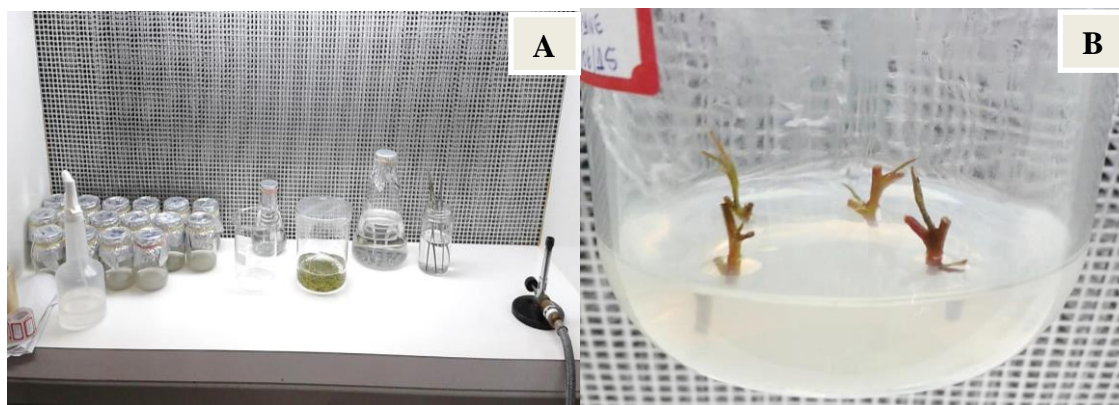
Fonte: Os autores

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, a desinfestação superficial dos explantes foi realizada com a imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,4% durante 20 minutos, enxaguados por duas vezes com água (deionizada e autoclavada). Em seguida os explantes foram submetidos à solução de álcool 70% por 30 segundos e enxaguados novamente por duas vezes com água deionizada e autoclavada (Figura 2 A) (para detalhes, veja: GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; MALYSZ *et al.*, 2011; NAVROSKI, 2011).

Composições dos Meios de Cultura

Após a etapa da desinfestação, os explantes de *E. citriodora* foram inoculados em frascos de vidro transparente, contendo 40 mL dos tratamentos sendo (T1) controle experimental com meios básicos de cultura JADS (CORREIA *et al.* 1995), WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981) e MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) (Tabela 1), isentos de reguladores de crescimento e contendo ágar geleificante na concentração de 9 g.L⁻¹, e (T2) idêntica composição aos anteriores, mas suplementados com composto antioxidante - ácido ascórbico (176 mg.L⁻¹) e os aminoácidos: prolina (115 mg. mg.L⁻¹), glutamina (146 mg.L⁻¹), ácido aspártico (133 mg.L⁻¹) e arginina (174 mg.L⁻¹), tal como descrito por Melo *et al.* (2014).

FIGURA 2 - Processo de desinfestação superficial dos explantes em câmara de fluxo laminar: (A) Aspecto geral dos materiais utilizados durante a desinfestação dos explantes. (B) Frasco contendo quatro explantes de segmentos nodais inoculado em meio de cultura.



Fonte: Os autores

A inoculação dos explantes em meios de cultura também foi realizada em câmara de fluxo laminar, sendo tomado o devido cuidado durante o manuseio dos materiais biológicos e vidrarias, com o emprego de máscaras, luvas, pinças e solução de etanol a 70% para assepsia da bancada, de modo a prevenir a ocorrência de contaminações. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 6,3 utilizando-se KOH 1N, antes do acréscimo do ágar, e a sua esterilização foi realizada por meio de autoclavagem à temperatura de 121°C ou 1 atm, e sob pressão de 1,05 kg.cm⁻² por 30 minutos.

Delineamento Experimental, Parâmetros Avaliados e Análises Estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 x 2, sendo três meios básicos de cultura (JASD, WPM e MS) e dois tratamentos, onde T1 refere-se ao controle experimental consistindo dos meios de cultura originais e T2 aos meios de cultura suplementados, com quinze repetições por tratamento, constituído por frascos contendo quatro explantes de segmentos nodais cada um (Figura 2B).

Aos 30 dias de cultivo após a inoculação, por meio de análise visual, foi avaliada a ocorrência de contaminação fúngica ou bacteriana e, aos 60 dias de cultivo, a taxa de sobrevivência dos explantes e a ocorrência de oxidação. Esses parâmetros foram utilizados para o cálculo do percentual de estabelecimento *in vitro* das culturas, necessário para o posterior desenvolvimento dos primórdios foliares nos explantes, com a emissão de folhas ou brotos.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias dos tratamentos foram analisadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, todas elas por meio de programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). Como medida de dispersão dos dados, foram calculados os coeficientes de variação (C.V.%) para cada característica avaliada.

TABELA 1- Composição e descrição das concentrações de cada elemento utilizado nos meios de cultura JADS, WPM e MS.

Componentes	Peso Molecular	JADS	WPM	MS
Macronutrientes	g. L ⁻¹	mg. L ⁻¹	mg. L ⁻¹	mg. L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	80,04	320	400	1650
KNO ₃	101,11	809	...	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	147,02	...	96	440
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,15	1181	556	...
KH ₂ PO ₄	136,09	408	170	170
K ₂ SO ₄	174,26	...	990	...
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,48	739,5	370	370
Micronutrientes				
Na ₂ EDTA .2H ₂ O	372,24	74,5	37,3	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	278,02	55,6	27,8	27,8
MnSO ₄ .H ₂ O	169,01	16,9	16,9	16,9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287,54	4,32	8,6	8,6
H ₃ BO ₃	61,83	3,1	6,2	6,2
KI	165,99	0,83
CuSO ₄ .5H ₂ O	249,68	1,25	0,25	0,025
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241,95	0,15	0,25	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	237,93	0,25	...	0,025
Vitaminas				
Tiamina HCl	337,3	5	1	0,1
Piridoxina HCl	205,6	0,5	1	0,5
Ácido Nicotínico	123,11	0,5	1	0,5
Pantotenato Ca ²⁺	476,54	2,4	1	...
Biotina	244,3	...	0,01	...
Aminoácidos				
Cisteína	121,16	5
Glicina	75,07	...	1	2
Outros componentes				
Mio-inositol	180,16	100	100	100
Sacarose	342,3	30.000	30.000	30.000

Fonte: JADS adaptado segundo (CORREIA et al. 1995), WPM adaptado segundo (LLOYD; MCCOWN, 1981) e MS adaptado segundo (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com os procedimentos para descontaminação de segmentos nodais de plantas de *E. citriodora* cultivadas a campo, utilizados como explantes para o cultivo *in vitro* foram satisfatórios, atingindo percentuais considerados baixos de contaminação fúngica e por bactérias endofíticas.

Em relação à contaminação fúngica, os dados apresentados na Tabela 2 mostram que houve variação significativa ao nível de 5% de probabilidade entre os diferentes meios de cultura avaliados. Foram observadas menores taxas de contaminação para os meios JADS T1 e MS T1, que em média, apresentaram efeitos aproximados, sendo os melhores resultados observados para o meio JADS (T1), atingindo assepsia de cerca de 55% dos explantes. Dados semelhantes foram obtidos por Malysz *et al.* (2011) que, ao avaliarem métodos de desinfestação em *E. dunnii*, constataram índice de assepsia de 80,2% em tratamento de matrizes a campo com bactericida agrimicina + fungicida captan, seguido de assepsia dos explantes com álcool 70% mais 20 minutos em hipoclorito de sódio (0,5%). Ressalta-se que os resultados obtidos pelos mesmos autores, foram superiores a 95,8% de contaminação quando excluído o tratamento anti-fúngico a campo.

TABELA 2 - Médias de ocorrência de contaminação fúngica (%), contaminação bacteriana (%), oxidação após 60 dias de cultivo *in vitro* (%) e viabilidade de explantes (%) de *Eucalyptus citriodora* analisados pelo teste de Tukey para os meios de cultura JADS, MS e WPM - (T1) composições originais e (T2) - com adição de ácido ascórbico e os aminoácidos: prolina, glutamina, ácido aspártico e arginina.

FV	Contaminação Fúngica (%)	Contaminação Bacteriana (%)	Oxidação Após 60 dias (%)	Viabilidade dos Explantes (%)
Tratamentos	Médias	Médias	Médias	Médias
JADS T1	44,94 a	37,52 a	67,22 ab	27,25 a
JADS T2	67,22 ab	40,60 a	59,79 a	29,23 a
MS T1	52,37 a	44,94 a	74,64 b	19,39 b
MS T2	59,79 ab	44,94 a	67,22 ab	23,97 ab
WPM T1	74,64 b	37,52 a	87,02 b	9,34 c
WPM T2	87,02 b	30,10 a	74,64 b	18,71 b
Média Geral	62,93	40,60	71,76	21,31
C.V. (%)	43,44	27,77	22,33	31,18

Médias seguidas por letras minúsculas iguais não apresentam diferenças entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para Heimann *et al.* (2008) a maior dificuldade no estabelecimento *in vitro* de explantes de eucalipto reside em obterem-se indivíduos sadios. Assim como no presente trabalho, os autores observaram em estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de clone *E. dunnii*, taxas superiores de contaminação por fungos em meio de cultura WPM, desinfestados com hipoclorito de sódio a 2 % durante 5 min.

A importância do tratamento fitossanitário preventivo realizado em plantas matrizes a campo com utilização periódica de fungicidas de ação por contato e sistêmica, tem for objetivo manter os agentes contaminantes exógenos e endofíticos a níveis baixos, para otimização da etapa seguinte de desinfestação em laboratório, promovendo assim melhor assepsia dos explantes. Este fato é corroborado por Brondani *et al.* (2009) que, no estabelecimento de segmentos nodais de *E. benthamii* x *E. dunnii*, a partir de minicepas cultivadas em sistema semi-hidropônico, realizando aplicação de fungicida Kumulus DF® (enxofre como princípio ativo) a 3 g.L⁻¹ (p/v), constataram o percentual médio de 41,33% de contaminação fúngica. Os autores atribuíram este resultado ao tratamento fungicida de plantas matrizes, visto que, as diferentes concentrações de cloro ativo testados não diferiram para descontaminação dos explantes.

Analisando a descontaminação de segmentos nodais de *Eucalyptus* por outros autores, em situações em que não ocorreram a realização de tratamento com antibióticos das plantas matrizes, nota-se maiores taxas de contaminação dos explantes. Hansel *et al.* (2005) em estabelecimento com explantes de *E. benthamii* originados de decepta de plantas matrizes de 17 anos de idade cultivadas a campo, obtiveram 95% de contaminação por fungos e bactérias, ao realizarem somente a desinfestação em laboratório, com imersão de segmentos nodais em álcool 70% (1 min) e NaOCl₂ 2% (10min). Joshi *et al.* (2003), ao trabalharem com segmentos nodais coletados de árvores de *E. tereticornis* x *E. grandis* de 30 anos de idade, obteve 50% de segmentos nodais não contaminados quando expostos durante 20 min na concentração de 30% (v/v) de NaOCl₂.

Além do tratamento realizado a campo, a retirada das brotações após 90 dias do corte da planta matriz, permitiu a ausência de tricomas foliares nos explantes, proporcionando a intensificação do efeito exercido pelos agentes utilizados na descontaminação para diminuição de microrganismos presentes em toda a superfície da epiderme dos explantes. Almeida (2012) observou atingir 90 a 93% de contaminação fúngica e/ ou bacteriana em explantes de *E. citriodora* provenientes de mini jardim clonal, sendo esta alta taxa de contaminação atribuída a presença de tricomas foliares que dificultaram a descontaminação dos explantes.

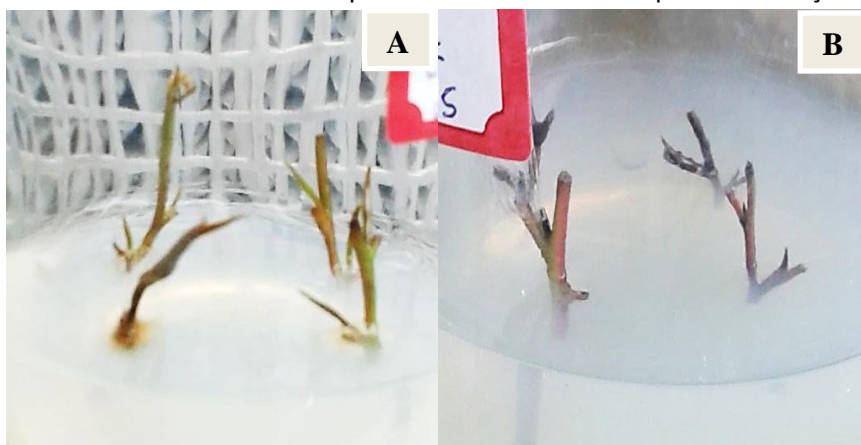
Níveis inferiores de contaminação foram obtidos por Pinedo *et al.* (1990), em segmentos nodais de plantas novas de *E. citriodora* cultivadas em casa de vegetação, observando eficiência no controle da contaminação ao mergulhar os explantes em fungicida Benlate® (Carbamato) 0,5 g.L⁻¹ por 5 minutos antes da descontaminação dos explantes por hipoclorito de sódio. Este método pode ser associado ao protocolo de desinfestação para plantas provenientes de matrizes a campo, visando aumentar o percentual de assepsia dos explantes.

O protocolo de descontaminação empregado também se mostrou eficaz no controle da contaminação bacteriana endofítica para todos os tratamentos, onde verificou-se ausência de efeito de meios de cultura na ocorrência da mesma. Entretanto, a análise de médias mostrou que os Meios MS apresentaram valores de contaminação bacteriana endofítica numericamente superiores aos demais meios de cultura (Tabela 2). Este fato pode ser atribuído à composição deste meio, considerando que as concentrações de nutrientes são as

mais elevadas em comparação aos meios JADS e WPM, permitindo o crescimento acelerado destes microrganismos no meio de cultura (YAMAZAKI *et al.*, 1995).

Infelizmente, a sobrevivência e o estabelecimento dos explantes foi bastante prejudicada devido à oxidação dos explantes, como apresentado na Tabela 2. A alta percentagem de oxidação pode estar relacionada à concentração intrínseca de compostos fenólicos nos tecidos de *E. citriodora*, o que eleva a tendência de oxidação dos tecidos. Este fato foi observado através da constatação da liberação de uma exsudação de coloração escura pelos explantes poucos dias depois de sua inoculação nos meios de cultivo. Foi notado que os explantes tenderam a escurecer e o meio de cultura passou a apresentar uma coloração marrom, sendo este processo intensificado ao longo do cultivo *in vitro* (Figura 3).

FIGURA 3 - Processo de oxidação dos explantes de *Eucalyptus citriodora* durante o cultivo *in vitro*: (A) Liberação de exsudado pela base do explante cerca de 30 dias após a inoculação. (B) Escurecimento das extremidades dos explantes cerca de 60 dias após a inoculação.



Fonte: Os autores

Erig e Schuch (2003) observaram este mesmo processo de oxidação no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de macieira (*Malus domestica* BORKH.). Segundo os autores, os tecidos recém excisados de espécies lenhosas tendem a secretar elevadas proporções de substâncias fenólicas e taninos no meio de cultura, em resposta ao ferimento sofrido. Essas substâncias podem modificar a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos, gerando a oxidação dos explantes durante o cultivo *in vitro* (ANDRADE *et al.*, 2000).

Pode-se inferir que a planta-matriz possui grande influência no posterior comportamento das culturas *in vitro*, onde a oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo, da fase de desenvolvimento da planta e da estação do ano em que os explantes são coletados (WERNER *et al.*, 2009). Normalmente, a variabilidade genética influencia o comportamento e adaptação ao cultivo *in vitro*, apresentando comportamento independente e tornando necessários ajustes na composição dos meios de cultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Tais fatores podem ter sido determinantes na ocorrência da oxidação dos explantes observada no presente trabalho, e que as plantas matrizes utilizadas não se mostraram totalmente adaptadas às

condições de cultivo testadas, sendo detectada uma significativa interação entre os genótipos e o ambiente *in vitro*. Foi notado que os melhores resultados em relação à viabilidade das culturas foram alcançados pelos explantes cultivados em meio JADS T2, JADS T1 e MS T2, o que sugere um efeito benéfico da suplementação com composto antioxidante e aminoácidos avaliados nesta pesquisa. Notou-se também que todos os outros meios de cultura em que houve a adição destas substâncias apresentaram resultados superiores às composições originais dos mesmos (Tabela 2).

Navroski (2011) observou esta tendência durante o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de matrizes a campo de *Eucalyptus dunnii*, onde a influência dos genótipos testados foram fatores limitantes no sucesso da propagação *in vitro*, devido à alta especificidade das espécies e clones, quanto ao meio nutritivo e as condições ambientais controladas por fatores genéticos. Logo, ao se trabalhar com novos genótipos se faz necessário avaliar a resposta desses materiais ao cultivo *in vitro* e posteriormente, fazer ajustes necessários para otimizar o processo de micropropagação (GAHAN; GEORGE, 2011).

Analisando-se os resultados obtidos com a adição do ácido ascórbico e aminoácidos em relação à diminuição de oxidação dos explantes, embora a eficiência tenha sido relativa, foi detectada uma interação com os diferentes meios de cultura, sendo obtidos valores mais favoráveis com o meio JADS e inferiores com o meio WPM (Tabela 2). Desta forma, não pode ser descartada a eficiência destes componentes, sendo necessários novos estudos, com diferentes concentrações. As mesmas substâncias poderiam ser adicionadas em outras etapas do processo, tais como no acondicionamento do material vegetal no momento de coleta e transporte, além da adição em concentrações mais elevadas nos meios nutritivos, visando à redução da oxidação fenólica (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Pasqual et al. (1997) ressaltam a utilização de antioxidantes em meio de cultura citando o emprego de ácido ascórbico, ácido cítrico, carvão ativado, polivinilpirrolidona (PVP), cisteína, rosmanol e ditiotreitol com o propósito de evitar satisfatoriamente o processo de escurecimento dos explantes durante o cultivo *in vitro*. Em estudos realizados em micropropagação de espécies mais lignificadas, a redução da oxidação foi alcançada com acréscimos de 1000 mg. L⁻¹ de ácido ascórbico (GONÇALVES et al., 2013), mostrando a sua eficiência quando utilizado em concentrações adequadas para a espécie estudada. Navroski (2011) em micropropagação de *E. dunnii*, utilizou ácido ascórbico a 1% (p/v) nos frascos com solução contendo as brotações durante o transporte do campo até o laboratório pra efeito de minimizar o efeito de oxidação fenólica.

CONCLUSÃO

Os tratamentos empregados neste relato mostraram-se eficientes na promoção de uma assepsia adequada para segmentos nodais de *Eucalyptus citriodora* visando à sua utilização como explantes para o cultivo *in vitro*. O protocolo estabelecido envolveu o uso de fungicidas de contato e ação sistêmica em plantas matrizes a campo, em conjunto com a desinfestação em laboratório momentos antes da inoculação dos explantes em meios de cultura.

Foi observado que a oxidação dos explantes foi o fator determinante para o estabelecimento de cultivo *in vitro* de *Eucalyptus citriodora*, sendo possível avaliar a existência de interação entre os meios avaliados e a viabilidade das culturas.

Embora a presença do composto antioxidante e aminoácidos avaliados nesta pesquisa tenha possibilitado a detecção de redução na oxidação dos explantes durante os primeiros 60 dias de cultivo *in vitro*, ainda assim se faz necessária a realização de novos testes em relação às concentrações mais adequadas para o estabelecimento das culturas. Além disso, o emprego dessas substâncias devem ser avaliadas em outras etapas do processo, tais como durante a coleta das brotações no campo e durante o transporte das mesmas até o laboratório, para uma completa avaliação dos seus efeitos sobre a inibição da liberação de exsudados provocada pela injúria do corte realizado nas brotações.

REFERÊNCIAS

ABRAF – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. Anuário Estatístico da ABRAF 2013 ano base 2012. Brasília: ABRAF, 2013. 148 p.

ALMEIDA, L.V. Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K.D. Hill & L.A.S. Johnson. 2012. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.,

ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. *et al.* Micropropagação de aroeira (*Myracrodun urundeuva* Fr. Allemao). Ciência Agrotecnologia, Lavras, v. 24, n.1, p.174-180, 2000.

BOLAND, D.J.; CHIPPENDALE, G.M.; BROOKER, M.I.H.; HYLAND, D.B.; HALL, N. Forest trees of Australia. Melbourne: Nelson/ CSIRO, 1984. p. 687.

BONGA, J. M.; VON ADERKAS, P. *In vitro* culture of trees. Amsterdam: KluwerAcademic, 1992. p. 236.

BORGES, S.R. Micropropagação e enraizamento de miniestacas de clones Híbridos de *Eucalyptus globulus*. 2009. p. 65. Dissertação (Mestrado em Ciencia Florestal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. Revista Árvore, Viçosa; v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.

CORDEIRO, G. M. Otimização da propagação clonal de *Eucalyptus globulus* Labill. 2013. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013. p.101.

CORREIA, D.; GOLÇALVES, N.A.; COUTO, H.Y.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. IPEF, Piracicaba, n. 48/49, p. 107-116, 1995.

DUTRA, L.F.; WENDLING I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de Eucalipto. Pesquisa Florestal Brasileira, Colombo. N. 58, p. 49-59, jan./jun. 2009.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. Revista Brasileira Agrociência, Pelotas, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2003.

FERREIRA, D.F. Análises Estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. UFSCAR, São Carlos, SP. Julho de 2000. p. 255 -258.

FERREIRA, M.; SANTOS, P.E.T. Melhoramento genético florestal dos *Eucalyptus* no Brasil: Breve histórico e perspectivas. In: IUFRO - Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts, 1997, Salvador, Proceedings. Colombo: Embrapa, CNPF, 1997. v.1. p. 14-34.

GAHAN, P.B.; GEORGE, E.F. Adventitious regeneration. In: NAVROSKI, M.C. Multiplicação *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii*. 2011. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Maria - RS. 2011.

GONÇALVES, T.S.; BARBOSA, W.M.; NANNETTI, D.C.; SANTOS, L.G.M.; CAPRONI, D.T.R.; MELO, F. Oxidação *in vitro* de *Olea europaea* L. In: 5ª Jornada Científica e Tecnológica e 2º Simpósio de Pós-Graduação do IFSULDEMINAS Inconfidentes/MG, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: SPI/Embrapa - CNPH, 1998, p. 183-260.

HANSEL, F.A. et al. Ápices caulinares como alternativa para o resgate de matrizes adultas de *Eucalyptus benthamii* diretamente do campo – Resultados preliminares. Comunicado Técnico 153. Colombo, PR. Dezembro, 2005.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. Plant propagation: principles and practices. 6. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997.

HEIMANN, J.P. et al. Influência do meio de cultura no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus sp.* In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 7., 2008, Colombo. Anais. Colombo: Embrapa Floresta, 2008.

JOSHI, I. et al. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F₁ hybrid (*Eucalyptus tereticornis* SM . x *E. grandis* Hill ex Maiden) *Silvae Genetica*, V.52, N. 3-4, p.110-113. 2003.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montaim laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combinet Proceedings International Plant Propagators Society*, v. 30, p. 421-427, 1981.

LORENZI, H; SOUZA, H.M.; TORRES, M.A.V.; BACHER, L.B. Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003.

MALYSZ, M.; CADORE, D.; TIBOLA, E.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CANSIAN, R.L.; MOSSI, A.J.M. Desinfestação e micropropagação de *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Perspectiva*, Erechim. v.35, n.131, p. 69-77, setembro/2011.

MELO, B.L.; LIMA, I.G.G.M.; FLUMINHAN, A. Avaliação do efeito de substâncias antioxidantes no crescimento de culturas celulares de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). *Colloquium Vitae*, v.6, n.2, p. 43-52, maio-ago/2014.

MORAIS, E. et al. Variação genética, interação genótipo solo e ganhos na seleção em teste de progênes de *Corymbiacitriodora* Hook em Luiz Antonio, São Paulo. *Scientia Forestalis*. Piracicaba. V, 38, n 85, p. 11-18, 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.S. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.

NAVROSKI, M.C. Multiplicação *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii*. 2011. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Maria - RS. 2011.

OLIVEIRA, L.S. et al. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, out./dez. 2013.

PAIVA, H.N.; GOMES, J.M. Propagação vegetativa de espécies florestais. Viçosa: UFV, 1995, p.40 (UFV, Boletim 322).

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. Cultura de tecidos vegetais: Tecnologia e aplicações – Introdução: Fundamentos básicos. Lavras: UFLA/FAEPE. 159 p. 1997.

PEREIRA, J.C.D.; STURION, J.A.; HIGA, A.R.; HIGA, R.C.V.; SHIMIZU, J.Y. Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil. Colombo: Embrapa Florestas, 2000.

PINEDO, D.N.H. et al. Micropropagação de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus tereticornis* In: 6º Congresso Florestal Brasileiro, Campos do Jordão, São Paulo. Setembro 1990.

QUISEN, R.C.; ANGELO P.C.S. Manual de Procedimentos do laboratórios de cultura de tecidos da EMBRAPA Amazônia Ocidental. Documentos 61, 3º Título, IV Serio, p.44. Manaus, 2008.

VITTI, A.M.S.; BRITO, J.O. Avaliação do rendimento e o teor de citronelal do óleo essencial de procedências e raças locais de *Eucalyptus citriodora*. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, n 56, p. 145-154, 1999.

WENDLING, I. Rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia seriada e micropropagação. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2002.

WERNER, E.T.; CUZZUOL, G.R.F.; PESSOTTI, K.V.; LOPES, F.P.; ROGER, J.A. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. *Revista Árvore*, Viçosa, MG, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.

XAVIER, A.; OTANI, W.C.; PENCHEL, R.M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed). *Biotechnology Florestal*. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. *Silvicultura clonal: princípios e técnicas*. Viçosa: Ed. UFV, 2009.

YAMAZAKI, T.; OYANAGI, H.; FUJIWARA, T.; FUKUMORI, Y. Nitrite reductase from the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum*: a novel cytochrome-cd (1) with Fe(II)-nitrite oxidoreductase activity. *European Journal of Biochemistry*, Berlim, v. 233, n. 2, p. 665-671, 1995.