

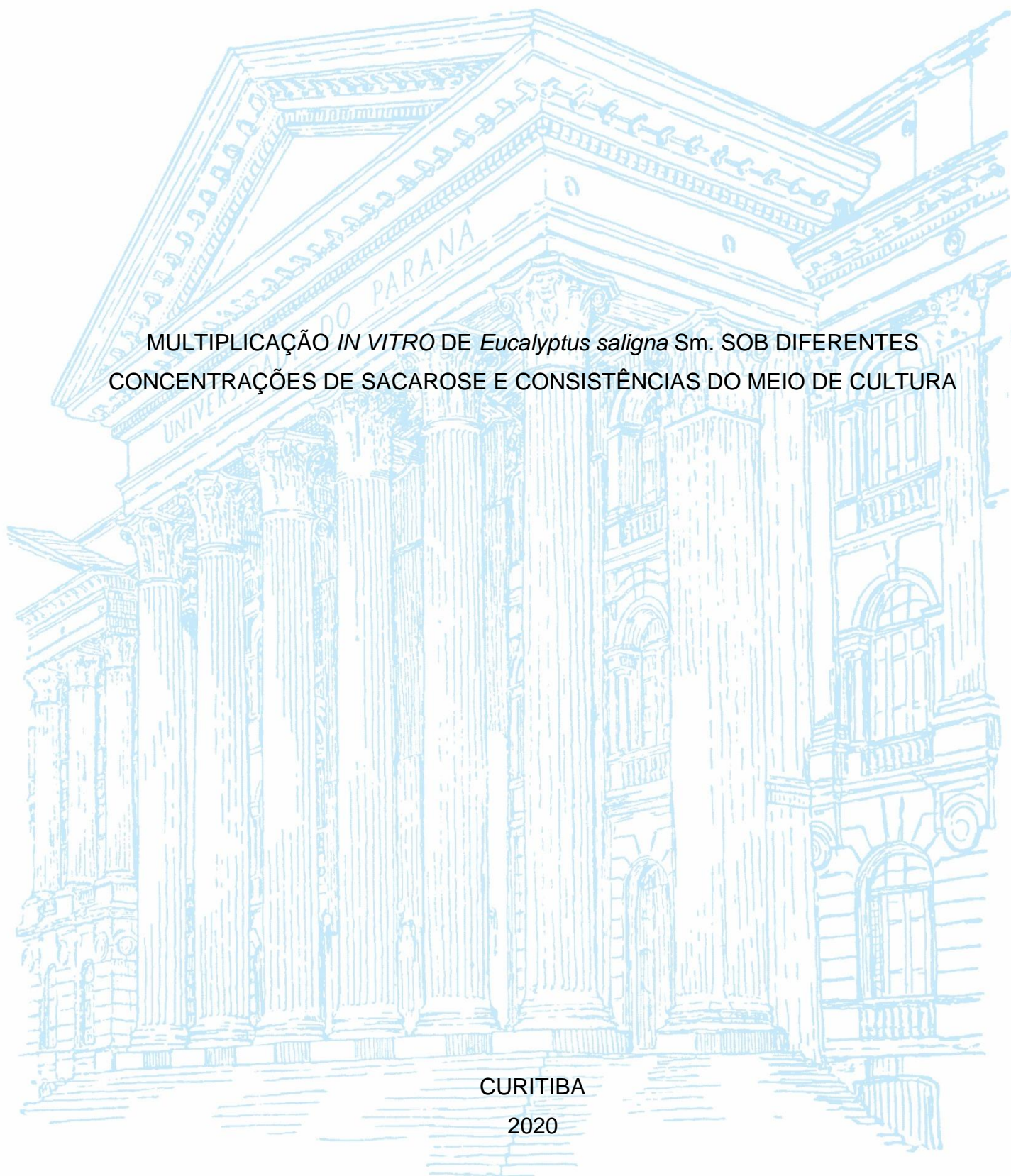
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIELE REISDÖRFER SCHORR

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Eucalyptus saligna* Sm. SOB DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E CONSISTÊNCIAS DO MEIO DE CULTURA

CURITIBA

2020



MARIELE REISDÖRFER SCHORR

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Eucalyptus saligna* Sm. SOB DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E CONSISTÊNCIAS DO MEIO DE CULTURA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Engenheira Florestal.

Orientadora: Profa. Dra. Giovana Bomfim de Alcantara

CURITIBA

2020

## TERMO DE APROVAÇÃO

MARIELE REISDÖRFER SCHORR

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Eucalyptus saligna* Sm. SOB DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E CONSISTÊNCIAS DO MEIO DE CULTURA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Florestal, pela seguinte banca examinadora:



---

Profa. Dra. Giovana Bomfim de Alcantara

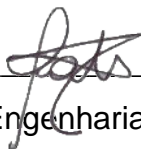
Orientadora – Departamento de Ciências Florestais, UFPR.



---

Dra. Angela Cristina Ikeda

Departamento de Ciências Florestais, UFPR.



---

Mestrando em Engenharia Florestal João Arthur Tikler Sousa

Curitiba, 20 de novembro de 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Renê Schorr e Claudia Reisdörfer Schorr, indispensáveis em minha vida, por não medirem esforços para me proporcionar uma educação de qualidade, juntamente ao meu irmão Renan Reisdörfer Schorr, pelo apoio e amizade.

Ao meu namorado e melhor amigo, pelo companheirismo e apoio ao longo da jornada juntos nesta graduação.

À professora Giovana Bomfim de Alcantara, pelo acompanhamento e ótima orientação.

À técnica Angela Cristina Ikeda e aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Florestal, pela ajuda na instalação e avaliação dos experimentos.

Ao técnico Roger Cipriano por ceder as instalações do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal para condução de análises aqui apresentadas.

Ao Curso de Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, na pessoa de seu coordenador Nelson Yoshihiro Nakajima e vice-coordenador Umberto Klock, pelo ensino e todas as oportunidades oferecidas.

*“A persistência é o caminho do êxito.”*

Charles Chaplin

## RESUMO

*Eucalyptus saligna* Sm. é uma das espécies do gênero *Eucalyptus* mais cultivadas para reflorestamento no centro sul do Brasil, cujo melhoramento genético visa atualmente a obtenção de plantios clonais de genótipos superiores. Entre os principais métodos de propagação vegetativa para obtenção de clones está a micropropagação, que entretanto ainda não é viável sob o ponto de vista econômico para uso em larga escala, sendo necessário reduzir os custos de produção através, por exemplo, do ajuste de certos componentes do meio de cultura. Este trabalho teve como objetivo testar quatro concentrações de sacarose (0, 15, 30 e 45 g L<sup>-1</sup>) e avaliar duas consistências de meio de cultura (semissólido e líquido com suporte) na multiplicação *in vitro* de *E. saligna*. Introduziu-se explantes obtidos de culturas *in vitro* de *E. saligna* em fase de subcultivo em tubos de ensaio de 50 mL contendo 4 mL de meio de cultura MS, suplementado com 0, 15, 30 e 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Para atingir a consistência semissólida diluiu-se 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e como suporte no meio líquido utilizou-se cerca de 7 g de um sólido em formato esférico. Em esquema fatorial e delineamento inteiramente casualizado, realizou-se oito tratamentos com quatro repetições de dez explantes. As culturas foram avaliadas após 30 dias mantidas em sala de crescimento. Obteve-se os teores de clorofila através de espectrofotometria. A sobrevivência e a taxa de multiplicação dos explantes foram maiores na consistência de meio semissólido de forma que se constatou a ineficácia do suporte utilizado em meio líquido. O aumento da concentração de sacarose favoreceu a formação de brotos, mas estatisticamente não houve diferença entre os tratamentos suplementados com 15, 30 e 45 g L<sup>-1</sup> do carboidrato em meio com ágar. Em meio semissólido, a maior concentração de sacarose promoveu significativamente menor teor de clorofila do que na ausência do componente testado.

Palavras-chave: Eucalipto. Micropropagação. Meio de cultura.

## ABSTRACT

*Eucalyptus saligna* Sm. is one of the most cultivated species of the genus *Eucalyptus* for reforestation in southern Brazil, whose genetic improvement is currently aimed at obtaining clonal plantations of superior genotypes. Among the main vegetative propagation methods for obtaining clones is micropropagation, which however is not yet economically viable for large-scale use, and it is necessary to reduce production costs, for example, by adjusting certain components of the culture medium. This work aimed to test four concentrations of sucrose (0, 15, 30 and 45 g L<sup>-1</sup>) and to evaluate two consistencies of culture medium (semi-solid and liquid with support) in the *in vitro* multiplication of *E. saligna*. Explants obtained from *in vitro* cultures of *E. saligna* in the subculture phase were introduced into 50 mL test tubes containing 4 mL of MS culture medium, supplemented with 0, 15, 30 and 45 g L<sup>-1</sup> of sucrose. To reach the semi-solid consistency, 7.5 g L<sup>-1</sup> of agar was diluted and as a support in the liquid medium, approximately 7 g of a spherical solid was used. In a factorial scheme and completely randomized design, eight treatments were performed with four repetitions of ten explants. Cultures were evaluated after 30 days in a growth room. The chlorophyll contents were obtained through spectrophotometry. The survival and the multiplication rate of the explants were higher in the consistency of semi-solid medium so that the inefficiency of the support used in liquid medium was verified. The increase in the sucrose concentration favored the formation of sprouts, but statistically there was no difference between the treatments supplemented with 15, 30 and 45 g L<sup>-1</sup> of the carbohydrate in agar medium. In a semi-solid medium, the higher sucrose concentration promoted significantly less chlorophyll content than in the absence of the tested component.

Keywords: *Eucalyptus*. Micropropagation. Culture medium.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA DE MICROPROPAGAÇÃO PELA PROLIFERAÇÃO DE GEMAS AXILARES.....	21
FIGURA 2 – EXPLANTES DE <i>Eucalyptus saligna</i> NA QUINTA FASE DE SUBCULTIVO UTILIZADOS NA INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	31
FIGURA 3 – EXPLANTES DE <i>E. saligna</i> INOCULADOS EM TUBO DE ENSAIO CONTENDO MEIO DE CULTURA SEMISSÓLIDO (A) E LÍQUIDO COM SUPORTE (B) .....	31
FIGURA 4 – SUPORTE SÓLIDO EM FORMATO ESFÉRICO UTILIZADO CONJUNTAMENTE AO MEIO LÍQUIDO NO EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	32
FIGURA 5 – EXEMPLO DOS TRATAMENTOS COM CONSISTÊNCIA DE MEIO SEMISSÓLIDO (A) E LÍQUIDO (B) APÓS MONTAGEM DO EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	34
FIGURA 6 – MACERAÇÃO DAS AMOSTRAS (A) E CONTEÚDO RESULTANTE (B) NA PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA O TESTE DE CLOROFILA.....	35
FIGURA 7 – EXPLANTE MORTO (A) E EXPLANTE VIVO (B) DE <i>Eucalyptus saligna</i> APÓS 30 DIAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO DE CULTURA MS LÍQUIDO COM SUPORTE .....	39
FIGURA 8 – EXEMPLO DA MULTIPLICAÇÃO DE EXPLANTES DE <i>E. saligna</i> APÓS 30 DIAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS SEMISSÓLIDO SUPLEMENTADO DE 0 g L <sup>-1</sup> (A) E 30 g L <sup>-1</sup> (B) DE SACAROSE.....	41

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – TRATAMENTOS REALIZADOS NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *E. saligna*.....33
- TABELA 2 – CONTAMINAÇÃO FÚNGICA, BACTERIANA E SOBREVIVÊNCIA DE EXPLANTES DE *Eucalyptus saligna* MULTIPLICADOS *IN VITRO* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E CONSISTÊNCIAS DO MEIO DE CULTURA.....37
- TABELA 3 – TAXA DE MULTIPLICAÇÃO (NÚMERO DE BROTO / EXPLANTE) E COMPRIMENTO DOS BROTO DE EXPLANTES DE *Eucalyptus saligna* MULTIPLICADOS *IN VITRO* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E CONSISTÊNCIAS DO MEIO DE CULTURA .....39
- TABELA 4 – TEOR DE CLOROFILA *a*, *b* E TOTAL EM EXPLANTES DE *Eucalyptus saligna* MULTIPLICADOS *IN VITRO* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E CONSISTÊNCIAS DO MEIO DE CULTURA .....43

## LISTA DE SIGLAS

AIB	– Ácido indolbutírico
ANA	– Ácido naftalenoacético
BAP	– 6-benzilaminopurina
CV	– Coeficiente de variação
DAP	– Diâmetro à altura do peito
GA <sub>3</sub>	– giberelina
MS	– Meio de Murashige e Skoog
nm	– nanômetro
pH	– potencial hidrogeniônico
PVC	– Policloreto de vinila
RITA®	– Recipiente de Imersão Temporária Automatizada (Vitropic S/A)
rpm	– rotações por minuto
μM	– micromolar
μmol	– micromol

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1	OBJETIVOS .....	13
1.1.1	Objetivo geral .....	13
1.1.2	Objetivos específicos.....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1	<i>Eucalyptus saligna</i> Sm. ....	14
2.2	MELHORAMENTO GENÉTICO .....	14
2.3	CULTURA DE TECIDOS E MICROPROPAGAÇÃO .....	17
2.3.1	Multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Eucalyptus</i> .....	18
2.3.2	Sistemas de micropropagação .....	20
2.3.3	Etapas da micropropagação .....	21
2.3.3.1	Seleção do explante .....	22
2.3.3.2	Estabelecimento da cultura asséptica .....	22
2.3.3.3	Multiplicação de propágulos .....	23
2.3.3.4	Alongamento .....	23
2.3.3.5	Enraizamento .....	24
2.3.3.6	Aclimatização .....	24
2.4	FATORES QUE INTERFEREM NA MICROPROPAGAÇÃO .....	24
2.4.1	Meio de cultura .....	25
2.4.1.1	Concentração de sacarose.....	26
2.4.1.2	Consistência do meio de cultura.....	27
2.5	BIORREATORES .....	28
2.6	CLOROFILA .....	29
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS .....	30
3.2	CONDIÇÕES GERAIS DE CULTURA <i>IN VITRO</i> .....	30
3.3	MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	30
3.3.1	Instalação do experimento.....	30
3.3.2	Metodologia de avaliação .....	32
3.3.3	Delineamento experimental .....	33
3.4	TEOR DE CLOROFILA .....	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>

4.1	MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	37
4.2	TEOR DE CLOROFILA .....	43
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Eucalyptus saligna* Sm. é uma árvore de tamanho alto, atingindo de 30 a 55 m de altura e mais de 2 m de DAP. Esta espécie é originária da Austrália, sendo uma das mais cultivadas em reflorestamentos no centro sul do Brasil. Produz madeira pesada (densidade de 690 kg/m<sup>3</sup> a 15% de umidade), de boa qualidade e destinada a diversos usos, como laminação, móveis, estruturas, postes, celulose e carvão (INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS (IPEF), 2020).

Diante do crescente uso de clones na cadeia produtiva do eucalipto, observa-se também um crescente avanço nas tecnologias de produção comercial de mudas por meio da biotecnologia (XAVIER; SILVA, 2010). Dentre as técnicas de biotecnologia, a cultura de tecidos assume importância crucial e o eucalipto é o gênero florestal que mais possui estudos de micropropagação (QUISEN; ANGELO, 2008; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009), sendo este um método de propagação vegetativa que consiste no cultivo de células de tecido vegetal em meio nutritivo e em condições assépticas, fazendo com que elas se multipliquem e formem uma nova planta (XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007).

A micropropagação possibilita clonar espécies que tenham altas taxas de crescimento, tolerância a baixas temperaturas e resistência a pragas e doenças, tendo como importante vantagem o rejuvenescimento de árvores adultas e a possibilidade de propagação vegetativa de espécies que apresentam dificuldade de propagação por outros métodos (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

A importância da micropropagação pode ser observada quando este processo está presente em algumas empresas florestais fazendo parte da produção de mudas, quando estas são mantidas *in vitro* para abastecer o mini/micro jardim clonal, por exemplo (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Entretanto, de acordo com Assis e Mafia (2007), são poucos os resultados efetivos obtidos com a multiplicação contínua de espécies de *Eucalyptus*. Assim, Sahu e Sahu (2013) destacam que para a aplicação da micropropagação na produção de mudas tenha viabilidade comercial é necessário reduzir os custos de produção. Isto pode ser alcançado através do ajuste de certos componentes como a sacarose, geralmente usada como fonte de carbono, e o ágar, como agente gelificante, que podem trazer impacto no custo do meio de cultura.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta do *Eucalyptus saligna* Sm. sob diferentes concentrações de sacarose e consistências do meio de cultura na multiplicação *in vitro*.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Testar quatro concentrações de sacarose (0, 15, 30 e 45 g L<sup>-1</sup>) na multiplicação *in vitro* de *E. saligna*.
- Avaliar duas consistências de meio de cultura (semissólido e líquido com suporte) na multiplicação *in vitro* de *E. saligna*.
- Correlacionar as diferentes respostas da multiplicação *in vitro* com determinações e análises bioquímicas de clorofila.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Eucalyptus saligna* Sm.

*Eucalyptus* é um gênero pertencente à divisão Angiospermae, classe Dicotyledonea, ordem Myrtales e família Myrtaceae, sendo a maior parte das espécies originárias da Austrália (FONSECA et al., 2010). No Brasil, este gênero desempenha um papel econômico muito importante, ocupando 5,7 milhões do total de 7,83 milhões de hectares de florestas plantadas em 2018 (INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBÁ), 2019) e supre principalmente a demanda de madeira para celulose e papel, lenha industrial e carvão, além da indústria madeireira, painéis reconstituídos, madeira tratada e outros (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF), 2013).

Dentre as cerca de 600 espécies do gênero está o *Eucalyptus saligna* Sm. (FONSECA et al., 2010), uma árvore de tamanho alto a muito alto, podendo alcançar de 30 a 55 m de altura e mais de 2 m de DAP, com tronco geralmente de excelente forma e reto. Originária da Austrália, ocorre principalmente na costa sul de New South Wales (NSW) e próximo de Maryborough no sul de Queensland, onde o clima é principalmente quente e úmido, sendo a média das temperaturas do mês mais quente entre 24 e 33°C e entre -2 e 8°C no mês mais frio. O alcance altitudinal da espécie varia de próximo ao nível do mar até 1100 m e ela ocorre em ambientes com geada de baixa a alta (chegando a mais de 60 em grandes altitudes). Essa espécie de eucalipto também ocorre em locais onde a precipitação anual varia de 900 a 1800 mm, com concentração maior no verão. O melhor desenvolvimento da espécie se dá em solos de aluvião, franco-arenoso de boa fertilidade, mas também em solos podzólicos profundos de origem vulcânica, bem drenados (BOLAND et al., 2006).

De acordo com Lorenzi et al. (2003), *E. saligna* é uma das espécies mais cultivadas para reflorestamento no centro sul do Brasil, produzindo madeira vermelha-clara, pesada, de boa qualidade e destinada a usos diversos como, segundo IPEF (2020), laminação, móveis, estruturas, caixotaria, postes, mourões, celulose e carvão.

### 2.2 MELHORAMENTO GENÉTICO

O melhoramento genético de plantas, definido como a arte e a ciência que visam à modificação gênica das plantas para torná-las mais úteis ao homem, envolve um conjunto de procedimentos e técnicas baseados em fundamentos científicos e visa a melhoria de características produtivas das culturas utilizadas pelo homem (QUEIRÓZ, 2001).

Basicamente o melhoramento consiste em manipular o patrimônio genético das plantas, com finalidade de obtenção de variedades ou híbridos de maior rendimento, produtos de alta qualidade e adaptabilidade às condições adversas. As seleções são realizadas a partir da variabilidade genética existente na população (TONELLO, 2004).

Borém e Miranda (2013) destacam o melhoramento genético como uma estratégia para ganhos de produtividade de forma ecologicamente sustentável, sendo muito enaltecido como fator primordial para a segurança alimentar global. Segundo os autores, o melhoramento de plantas permite o desenvolvimento de cultivares resistentes ou tolerantes a pragas, doenças e estresses climáticos, através do uso de técnicas que envolvem a biotecnologia como o uso de marcadores moleculares, sequenciamento de DNA, transgenia, entre outros.

Tratando-se especificamente do melhoramento florestal, este tornou-se uma ferramenta de uso muito comum e ganhou grande importância, de modo que a maior parte dos povoamentos comerciais de *Eucalyptus* são constituídos de florestas clonais produtos de programas de melhoramento genético (TONELLO, 2004).

Introduzido comercialmente no Brasil no início do século XX, o eucalipto vem sendo melhorado geneticamente ao longo dos anos (FONSECA et al., 2010). O melhoramento deste gênero iniciou-se com os trabalhos do pesquisador Dr. Edmundo Navarro de Andrade a partir de 1904. Inicialmente, Navarro introduziu diversas espécies de *Eucalyptus* no Horto de Jundiaí a fim de identificar as espécies mais bem adaptadas às condições climáticas brasileiras para abastecer as estradas de ferro com dormentes (FERREIRA; SANTOS, 1997).

A partir de 1941, Navarro de Andrade e o Dr. Carlos Arnaldo Krug, chefe da Seção de Genética do Instituto Agrônomo de Campinas, elaboraram um programa de melhoramento genético do eucalipto, cujos objetivos eram melhorar a uniformidade das plantações, reduzir falhas, melhorar a forma do tronco, aumentar diâmetro e altura, melhorar a capacidade de brotação e aumentar a capacidade produtiva. O programa era baseado na seleção de árvores superiores e de mudas em viveiros, na

seleção de áreas de produção de sementes e na hibridação interespecífica (FERREIRA; SANTOS, 1997). Porém, foi com o início dos incentivos fiscais na década de 1960 que se deu o grande impulso ao melhoramento de eucalipto no Brasil (ASSIS; ABAD; AGUIAR, 2016).

Os primeiros programas de instituições públicas e privadas consistiram inicialmente na avaliação de espécies e procedências promissoras e então a partir da seleção massal de indivíduos superiores em famílias de meios-irmãos houve a formação de pomares de sementes melhoradas. A partir da década de 80, dominou-se a técnica de clonagem do eucalipto que passou a ser utilizada para a perpetuação e multiplicação de bons materiais genéticos (ASSIS; ABAD; AGUIAR, 2016). Assim, no processo de melhoramento, houve a transição dos plantios seminais para plantios clonais (FONSECA et al., 2010). A primeira plantação clonal comercial de eucaliptos no Brasil ocorreu em 1979, pela empresa Aracruz Florestal, no Espírito Santo (FERREIRA; SANTOS, 1997).

O desenvolvimento das técnicas de clonagem de espécies de eucalipto apresentou duas fases distintas, sendo que até a década de 90 sua evolução foi relativamente lenta. Em 1992, ocorreu a primeira grande mudança com o surgimento da microestaquia com origem *in vitro* via micropropagação e, mais tarde, da miniestaquia. A criação dessas tecnologias foi um marco dos sistemas de clonagem de eucalipto e marcou o início de um novo ciclo na propagação de espécies lenhosas (ASSIS; ABAD; AGUIAR, 2016).

Hoje, há mais de 30 anos de sua introdução no Brasil, o conceito de florestas clonais encontra-se bem estabelecido e integrado aos processos de produção de matéria-prima em vários setores da indústria, e propiciaram-se significativos ganhos de produtividade, além da contribuição em melhoria da qualidade da madeira e produtos derivados (ASSIS; ABAD; AGUIAR, 2016).

Ao longo dos últimos anos vem ocorrendo um crescente aumento na produtividade dos plantios do eucalipto, o que de acordo com Assis (2014), é graças ao desenvolvimento de materiais com maior potencial produtivo, sobretudo a partir da hibridização e clonagem, aliado ao avanço das técnicas de manejo florestal.

De acordo com Assis e Mafia (2007), a hibridação interespecífica de *Eucalyptus* tem sido a forma mais rápida e eficiente de obtenção de ganhos genéticos no melhoramento das espécies deste gênero. Já o emprego da clonagem no lugar dos métodos sexuais de produção de mudas permite a transferência da variância

genética e obtenção de ganhos máximos, como de produtividade volumétrica, propriedades da madeira, ou resistência a fatores bióticos e abióticos. Em resumo, a clonagem seria a forma mais rápida de se incorporar ao processo industrial os ganhos advindos da hibridização.

Outra vantagem da clonagem é a produção de matéria-prima mais uniforme, o que traz significativos benefícios para a indústria no que se refere a minimização de custos dos processos e aumento da qualidade dos produtos (ASSIS; MAFIA, 2007).

Considerando-se o volume de madeira produzido ao ano e o período de rotação, o Brasil é referência mundial tendo apresentado uma produtividade média de 36 m<sup>3</sup>/ha.ano para os plantios de eucalipto em 2018. Mesmo frente aos efeitos das alterações climáticas no crescimento das plantações, como o desequilíbrio do regime de chuvas, a produtividade do eucalipto cresceu em uma média de 0,5% ao ano. Este fato é atribuído aos investimentos em pesquisa e melhoramento genético e a busca pela melhoria dos métodos silviculturais desenvolvidos por empresas (IBÁ, 2019).

### 2.3 CULTURA DE TECIDOS E MICROPROPAGAÇÃO

À medida que se desenvolveu a genética de plantas como ciência, novas tecnologias foram sendo utilizadas na seleção eficiente de genótipos. Ganhos como aumento da produtividade de culturas agrícolas e resistência a doenças, pragas e condições adversas foram obtidos através do melhoramento genético e suas ferramentas mais modernas, tais como a biotecnologia vegetal. Dentre as técnicas de biotecnologia, a cultura de tecidos assume importância crucial, constituindo uma ótima ferramenta para clonagem de plantas em escala comercial, para estudos de transformação genética de plantas e para conservação de espécies vegetais (QUISEN; ANGELO, 2008).

Entende-se por cultura de tecidos vegetais como a ciência de cultivar células vegetais, tecidos ou órgãos isolados da planta-mãe em meio artificial (GEORGE, 2008). Similarmente, em uma definição mais completa, refere-se ao conjunto de técnicas de cultivo *in vitro* de células e tecidos vegetais (explantes) em meio nutritivo de composição definida, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> para gerar uma planta (QUISEN; ANGELO, 2008).

Sabe-se que uma das primeiras teorias que fundamentaram o cultivo *in vitro* de plantas é a chamada totipotencialidade, formulada por Matthias Schleiden e Theodor Schwann em 1839. Devido a totipotência, a célula é autônoma e capaz de originar um organismo completo, quando em condições físicas e nutricionais favoráveis (SCHERWINSKI-PEREIRA, 2018).

De acordo com Xavier, Otoni e Penchel (2007), o cultivo *in vitro* tem várias aplicações na área florestal como a conservação de germoplasma; a aceleração dos programas de melhoramento pela multiplicação de clones superiores visando a produção de mudas; o rejuvenescimento de clones e o potencial de produção de sementes sintéticas por meio da obtenção de embriões somáticos.

Dentre as técnicas de cultivo *in vitro* a micropropagação é uma daquelas de maior interesse científico e econômico. Na área florestal é a técnica mais difundida e com aplicações comprovadas (XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007). Quisen e Angelo (2008) definem a micropropagação como a propagação de plantas *in vitro* a partir de ápices meristemáticos ou segmentos nodais, com objetivo de produção de mudas em grande escala.

A utilização desta técnica traz algumas vantagens como a possibilidade de obter várias plantas a partir de um explante inicial; a redução do tempo e da área necessária à propagação da espécie; a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos; dentre outras (ERIG; SCHUCH, 2005). Loyola-Vargas e Ochoa-Alejo (2018) também destacam a micropropagação como uma excelente ferramenta para contornar problemas de germinação de espécies recalcitrantes, por exemplo, cujas sementes possuem curta viabilidade.

No entanto, também há dificuldades neste processo, como a necessidade de desenvolver protocolos adaptados para diferentes espécies ou grupos de clones (XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007) e o elevado custo de produção (ASSIS; MAFIA, 2007).

### 2.3.1 Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus*

A micropropagação pode ser aplicada para quase todas as espécies de plantas, mas é mais utilizada para aquelas que são economicamente rentáveis (LOYOLA-VARGAS; OCHOA-ALEJO, 2018).

O eucalipto é o gênero florestal mais estudado quanto à micropropagação. Os primeiros trabalhos de cultivo *in vitro* com este gênero datam da década de 60, quando ocorreu o primeiro relato de sucesso na regeneração de plântulas de *Corymbia citriodora* (= *E. citriodora*) (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

De acordo com Chaperon (1987, apud DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009), a micropropagação de eucalipto é recomendada em três situações: 1) quando outras técnicas de propagação vegetativa não apresentam resultados satisfatórios; 2) quando a árvore selecionada não pode ser rejuvenescida por brotações basais; 3) para aumentar a taxa de propagação e reduzir o tempo para uso comercial.

A juvenilidade alcançada por intermédio do rejuvenescimento *in vitro* resulta em maiores índices de enraizamento. Em espécies e clones de difícil enraizamento, cuja maturação fisiológica ocorre mais cedo, a micropropagação tende a ser mais eficiente no aumento do potencial de enraizamento e, portanto, preferível em relação à miniestaquia. Assim, certos clones com baixa capacidade de enraizamento que seriam descartados quando da utilização de métodos tradicionais, podem ser propagados se derivados de plantas micropropagadas (ASSIS; MAFIA, 2007). Além disso, à medida que sucessivos subcultivos são implementados o potencial de enraizamento aumenta (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Entretanto, de acordo com Assis e Mafia (2007), são poucos os resultados efetivos obtidos com a multiplicação contínua de espécies de *Eucalyptus*, e embora a micropropagação tenha se mostrado tecnicamente viável na clonagem de espécies recalcitrantes, ainda não é viável sob o ponto de vista econômico para uso em larga escala. Porém, foi a partir desta técnica que se desenvolveu a microestaquia e mais tarde, a miniestaquia, as quais se tornaram um marco na evolução dos sistemas de clonagem de *Eucalyptus*.

A origem do material que compõem o jardim clonal é o que diferencia a microestaquia da miniestaquia. Na primeira, as microcepas são oriundas de mudas micropropagadas, enquanto na segunda as minicepas são de mudas propagadas pela estaquia ou mesmo da miniestaquia. Como na micropropagação ocorre o rejuvenescimento, as microcepas apresentam maior grau de juvenilidade, vigor e percentual de enraizamento. Outra vantagem desta técnica é a economia em aplicação de ácido indolbutírico (AIB), um regulador de crescimento. Porém, esta técnica requer estruturas de laboratórios de cultura de tecidos, aumentando o custo

na produção de mudas e por conta disso a miniestaquia tem sido mais utilizada que a microestaquia (ASSIS; MAFIA, 2007; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

Mesmo com limitações, a micropropagação de espécies e híbridos de eucalipto faz parte do processo de produção de mudas em algumas empresas florestais. Normalmente, as mudas advindas da micropropagação são mantidas *in vitro* como fator estratégico no caso de material vegetal superior, ou servem para abastecer o mini/microjardim clonal (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Assim, para que a aplicação da micropropagação na produção de mudas torne-se comercialmente viável e possa competir com os métodos tradicionais de propagação (estaquia, enxertia, mergulhia, etc.), é necessário reduzir os custos de produção como, por exemplo, através do ajuste de certos componentes do meio de cultura (SAHU; SAHU, 2013).

### 2.3.2 Sistemas de micropropagação

Nos esquemas de micropropagação, de acordo com o explante utilizado e sua subsequente manipulação, há duas vias distintas de regeneração: via organogênese e via embriogênese somática. Optar por uma técnica em detrimento de outra varia com a espécie, o domínio da técnica, os objetivos desejados e as disponibilidades estruturais e orçamentárias (XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007).

A organogênese é uma via de desenvolvimento na qual órgãos vegetais como brotos e raízes são induzidos a formar a partir de uma ou várias células, podendo ser direta ou indireta. Na forma direta, o órgão se desenvolve diretamente sem passar pela fase inicial de calo. Já na indireta, há uma fase de proliferação e crescimento de calo, para então ocorrer a indução do órgão vegetal (GAHAN; GEORGE, 2008).

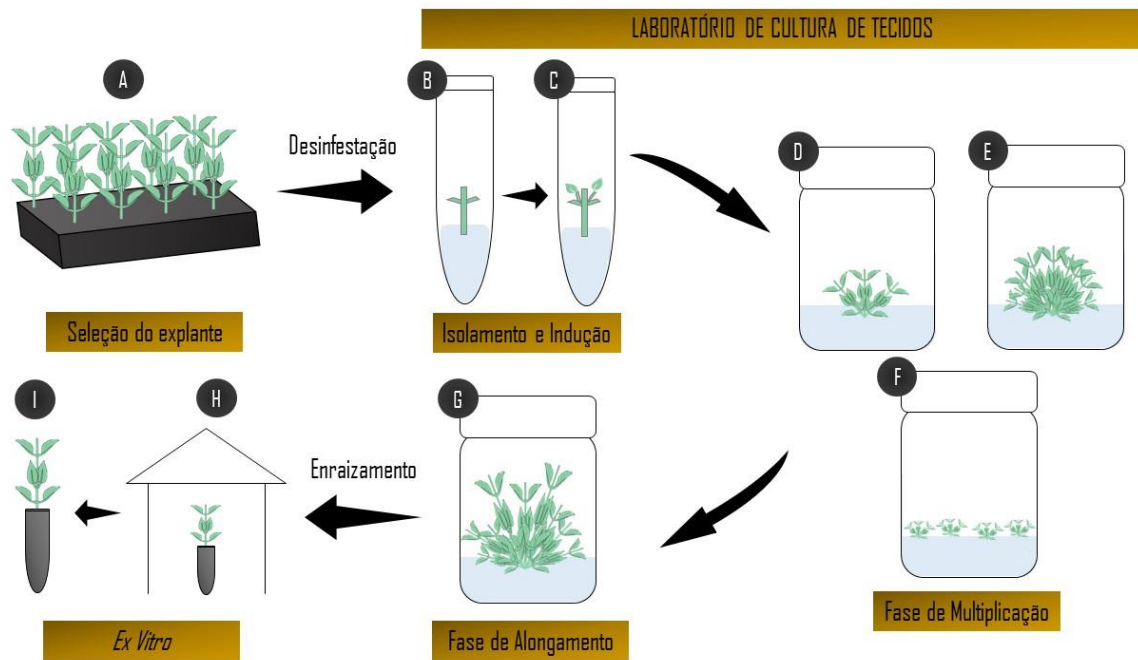
Dentro da organogênese, a micropropagação pela proliferação de gemas axilares é uma técnica considerada mais simples, sendo uma das mais utilizadas com obtenção de sucesso em várias espécies, inclusive *Eucalyptus*, e tem sido empregada com êxito no rejuvenescimento de clones. Além disso a taxa de multiplicação é rápida e as plantas oriundas também apresentam bom desenvolvimento (XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007).

A proliferação de gemas axilares envolve o isolamento *in vitro* de segmentos apicais ou nodais, a partir dos quais gemas axilares são estimuladas a crescer (CARVALHO; VIDAL, 2003) em um meio de cultura na presença de reguladores de

crescimento. O crescimento dá origem a novas partes aéreas (tufos de brotos), com as quais repete-se o mesmo processo quando são subdivididas em conjuntos menores dando origem a novos explantes (etapa de multiplicação) (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A FIGURA 1 ilustra as etapas da micropropagação pela proliferação de gemas axilares.

FIGURA 1 – ESQUEMA DE MICROPROPAGAÇÃO PELA PROLIFERAÇÃO DE GEMAS AXILARES



FONTE: A autora (2020).

LEGANDA: Fase de isolamento, estabelecimento e indução *in vitro*: fonte de explante – minicepas em viveiro (A), explante isolado *in vitro* (B) e explante em indução *in vitro* (C). Fase de multiplicação: gema subcultivada (D); gema multiplicada (E); gemas subcultivadas (F). Fase de alongamento: gema alongada e apta para transferência *ex vitro* (G). Fase *ex vitro*: enraizamento e aclimatização (H), muda micropropagada e enraizada na condição *ex vitro* (I).

### 2.3.3 Etapas da micropropagação

A micropropagação é a técnica mais utilizada e de maior aplicabilidade dentro da cultura de tecidos e de acordo com Dutra, Wendling e Brondani (2009), suas etapas seguem geralmente um procedimento padrão: (1) seleção das plantas matrizes; (2) desinfestação; (3) inoculação no meio de cultura; (4) multiplicação; (5) alongamento; (6) enraizamento; (7) aclimatização.

### 2.3.3.1 Seleção do explante

Explante é todo segmento de tecido ou órgão vegetal utilizado para iniciar o processo de micropropagação (ANDRADE, 2002). As fontes de explantes são amplas, podendo ser oriundas de matrizes cultivadas em ambiente protegido, mini ou microjardim clonal, brotações epicórmicas de árvores adultas, brotações de árvores decepadas ou mesmo de galhos podados (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Ao decidir sobre um explante adequado, alguns fatores devem ser considerados, como: o órgão que deve servir como fonte de tecido; a idade fisiológica ou ontogenética do órgão; a estação em que o explante está sendo obtido; o tamanho do explante; a qualidade geral da instalação na qual as plantas serão obtidas (MURASHIGE, 1974).

Hartney (1980) destaca que a utilização de árvore adulta como planta matriz é mais difícil de obter resultados positivos, pois há dificuldades de descontaminação, adaptação e menor juvenildade de tecidos maduros. De acordo com Andrade (2002), uma folha em senescência já perdeu grande parte de seus nutrientes e está em degeneração, por isso não seria uma boa fonte de explante. De modo geral utiliza-se tecidos jovens e em crescimento.

### 2.3.3.2 Estabelecimento da cultura asséptica

De acordo com Dutra, Wendling e Brondani (2009), os explantes oriundos de material vegetal do campo precisam passar pelo processo de limpeza e desinfestação antes de serem inoculados no meio de cultura.

O objetivo desta etapa é obter uma cultura de tecido asséptica da planta em questão, eliminando-se os microrganismos como bactérias e fungos. A presença destes organismos é prejudicial, pois além de competirem por nutrientes, alguns deles produzem toxinas que influenciam a propagação (ANDRADE, 2002). Portanto, é necessário que a cultura esteja livre de microrganismos externos e que uma proporção adequada de explantes sobreviva à cultura (MURASHIGE, 1974).

Vários produtos e procedimentos têm sido utilizados para a desinfestação de explantes, sendo principalmente o álcool 70% e o hipoclorito de sódio 0,5 a 1%, durante 5 a 20 minutos, seguido da lavagem em água destilada. As concentrações, tempo e modo de desinfestação podem ser variados (ANDRADE, 2002).

Após a limpeza do material, os explantes são inoculados em meio de cultura, onde podem permanecer de 20 a 30 dias. Entretanto, oxidações e contaminações podem ser vistas logo na primeira semana de cultivo. Por isso é indicada a inoculação dos explantes em tubos de ensaio, a fim de ficarem individualizados e assim se evitar contaminações generalizadas (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

#### 2.3.3.3 Multiplicação de propágulos

No estágio de multiplicação, o objetivo é um rápido aumento de órgãos e outras estruturas que podem finalmente dar origem a plantas (MURASHIGE, 1974). De acordo com Dutra, Wendling e Brondani (2009), nesta fase objetiva-se a proliferação dos explantes oriundos da fase de estabelecimento, que são inoculados em meio de cultura contendo combinações de auxinas e citocininas que dependem da espécie. O fitorregulador mais utilizado para proliferação de gemas em eucalipto tem sido o 6-benzilaminopurina (BAP).

O tempo e o número de subcultivos necessários nesta fase da micropropagação depende, em cada cultura, dos objetivos pretendidos para que os estádios vegetativos sejam alcançados. Inúmeros subcultivos podem ocorrer até atingir um número de brotações que serão enraizadas. Por exemplo, se o objetivo é o rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus* para melhorar o enraizamento, Xavier, Otoni e Penchel (2007) recomendam a realização de pelo menos 12 subcultivos. Já o período de cada subcultivo varia entre 20 a 30 dias (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

As taxas de multiplicação bastante altas obtidas nesta fase do processo caracterizam uma das principais vantagens da micropropagação (SAHU; SAHU, 2013).

#### 2.3.3.4 Alongamento

Preferencialmente, é desejável que a multiplicação e o alongamento das brotações ocorram ao mesmo tempo. Porém, eventualmente no caso de genótipos de difícil propagação *in vitro*, é necessária uma fase de alongamento em meio de cultura próprio, normalmente acrescido de giberelina (GA<sub>3</sub>) ou diversas combinações entre BAP, ANA, AIB e GA<sub>3</sub> (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). Esta etapa tem por

objetivo a obtenção de brotações com tamanho adequado para a fase de enraizamento (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

#### 2.3.3.5 Enraizamento

Esta fase do processo pode ocorrer tanto de forma *in vitro*, quanto de forma *ex vitro*. Xavier, Otoni e Penchel (2007) citam que para otimizar a micropropagação de algumas espécies e em determinadas situações, a fase de enraizamento *in vitro* pode ser substituída pelo enraizamento de brotos alongados diretamente na condição *ex vitro*. Desta forma, há vantagens como o desenvolvimento de um sistema radicial mais completo e funcional e elimina-se uma etapa da micropropagação.

O meio de cultura desta fase deve conter substâncias rizogênicas para iniciação da raiz. Para tal, o enraizamento de *Eucalyptus* é estimulado com o fornecimento de AIB (FRANCLET; BOULAY, 1982).

#### 2.3.3.6 Aclimatização

Após ser retirada do cultivo *in vitro*, a aclimatização é o processo de adaptação da planta às condições ambientais, antes do transplante para o local definitivo (QUISEN; ANGELO, 2008).

De acordo com Murashige (1974), este estágio tem por objetivo preparar os propágulos para sua transferência bem-sucedida ao solo, envolvendo o aumento da resistência ao estresse hídrico e a certos patógenos e a conversão das plantas do estado heterotrófico para o autotrófico.

### 2.4 FATORES QUE INTERFEREM NA MICROPROPAGAÇÃO

De acordo com Andrade (2002), existem três fatores que afetam a regeneração da planta *in vitro*: o genótipo (espécie, cultivar ou variedade); a fonte de explantes (folha, raiz, meristema, caule, etc.) e a condição da cultura (como meio de cultura, luz, temperatura e recipiente). Assim, o estabelecimento correto destes fatores irá determinar o sucesso da multiplicação *in vitro*.

### 2.4.1 Meio de cultura

A composição do meio de cultura é tida como um dos fatores que influenciam no êxito da cultura de tecidos (CARVALHO; VIDAL, 2003). Com a função de suprir com nutrientes os tecidos e órgãos cultivados *in vitro*, o meio de cultura e sua composição física e química são fatores determinantes para a iniciação e o desenvolvimento das culturas (GEORGE; KLERK, 2008).

Segundo George (2008), um meio geralmente consiste em uma solução de sais que fornecem os macro e micronutrientes necessários para o crescimento de plantas que *in vitro* possuem metabolismo heterotrófico, juntamente com vitaminas, aminoácidos, reguladores e fontes de energia.

Os elementos mais requeridos (em quantidades milimolares) pelas células vegetais que devem compor o meio de cultura são chamados macronutrientes e são fornecidos na forma de sais, contendo nitrogênio, potássio, fósforo, cálcio, enxofre e magnésio. Em concentrações micromolares, são requeridos os micronutrientes: ferro; manganês; zinco; boro; cobre e molibdênio. O cobalto e o iodo também são importantes no meio de cultura. A concentração ótima de cada nutriente para alcançar taxas de crescimento máximas varia dependendo da espécie (QUISEN; ANGELO, 2008).

Outro fator importante destacado por Quisen e Angelo (2008) é que em ambiente natural as plantas sintetizam as vitaminas necessárias para seu desenvolvimento. Como no cultivo *in vitro* essas substâncias podem ser limitantes, é necessário fornecê-las, sendo mais frequentemente usadas: tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), ácido nicotínico (niacina), piridoxina e vitamina B<sub>6</sub>.

Quanto aos reguladores de crescimento, a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido a mais utilizada nos meios de cultura para promover a proliferação de gemas axilares na propagação *in vitro* de espécies de eucalipto, em combinação com as auxinas ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB) (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Dentre os vários meios de cultura existentes, o mais amplamente utilizado é o formulado por Murashige e Skoog (1962) denominado MS (CARVALHO; VIDAL, 2003).

De acordo com Sahu e Sahu (2013), a composição dos meios de cultura com o uso de produtos químicos como fontes de carbono, agentes gelificantes,

suplementos orgânicos e inorgânicos e reguladores de crescimento tornam a técnica da micropropagação cara. A sacarose, geralmente usada como fonte de carbono, e o ágar, como agente gelificante, juntos constituem os componentes mais caros dos meios de cultura.

#### 2.4.1.1 Concentração de sacarose

De acordo com Quisen e Angelo (2008), algumas células, tecidos e plântulas cultivadas *in vitro* não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO<sub>2</sub>, e podem não apresentar teor de clorofila suficiente para realizar fotossíntese que sustente o crescimento. Por isso essas células heterotróficas precisam de uma fonte externa de energia, os carboidratos, sendo mais comum a incorporação de sacarose no meio de cultura, normalmente usada em concentrações entre 2% a 4%.

A sacarose fornece energia e carbonos precursores para a biossíntese de componentes estruturais e funcionais, como oligossacarídeos e aminoácidos (MENDES et al., 2015).

A concentração de açúcar tem efeito marcante sobre a multiplicação e o crescimento das culturas. Concentrações abaixo da faixa mais comum de 2 a 4% podem resultar em clorose generalizada e, acima dessa faixa, pode ocorrer problemas com potencial osmótico e levar a uma deterioração das culturas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A concentração de sacarose possui um papel importante no desempenho dos propágulos após cultivo *in vitro*. Sabe-se que a propagação *in vitro* tradicional impede o crescimento normal das plântulas quando levadas diretamente para condições de campo, por isso a aclimatização é necessária. Nesse caso, as plântulas *ex vitro* são expostas a condições de estresse, havendo baixo controle da perda de água e reduzida competência fotossintética, o que leva a uma elevada mortalidade (PENCHEL; OTONI; XAVIER, 2007). Para tanto, podem ser realizadas alterações na composição química do meio de cultura e no intercâmbio de gases com o meio externo (aumento da concentração de CO<sub>2</sub> e redução de O<sub>2</sub> *in vitro*). A redução do teor de sacarose ou sua eliminação por completo, por exemplo, melhora o crescimento e a competência fotossintética de várias espécies. Com isso, pode-se reduzir ou mesmo eliminar a necessidade de aclimatização, etapa de alto custo, que exige muito tempo

e que em geral resulta em alta mortalidade (ZIV, 1995 apud PENCHEL; OTONI; XAVIER, 2007).

O cultivo *in vitro* sem sacarose e sob condições que promovem a fotossíntese é chamada micropropagação fotoautotrófica. Esta técnica, além de aumentar o crescimento dos explantes *in vitro*, também minimiza os riscos de contaminação microbiana, reduz os custos de produção, melhora as características fisiológicas da planta e facilita sua aclimatização *ex vitro* (AFREEN; ZOBAYED; KOZAI, 2002).

Além disso, de acordo com Kozai e Kubota (2001), a presença de sacarose no meio de cultura potencializa a contaminação microbiana e conseqüentemente pode ocorrer a perda significativa de plantas.

#### 2.4.1.2 Consistência do meio de cultura

O material vegetal pode ser cultivado em um meio que foi parcialmente solidificado (semissólido) ou em um meio líquido, dependendo do tipo da cultura e dos objetivos (GEORGE, 2008). No primeiro caso, frequentemente se utiliza o ágar como substância gelificante, um polissacarídeo obtido de algas marinhas que dá consistência ao meio e suporte às plantas (QUISEN; ANGELO, 2008).

As culturas cultivadas em meio semissólido são mantidas estáticas e apenas a superfície inferior do explante, órgão ou tecido está em contato com o meio. Assim, ao longo do processo de cultivo podem ocorrer gradientes de nutrientes e produtos residuais do metabolismo entre o meio e os tecidos (GEORGE, 2008).

O nutriente líquido pode ser fornecido de várias maneiras no cultivo *in vitro* (MURASHIGE, 1974). De acordo com George (2008), órgãos muito pequenos podem ser cultivados flutuando no topo do meio líquido. Órgãos maiores também podem ser cultivados satisfatoriamente em uma camada rasa de líquido não agitado onde parte do órgão se projeta acima da superfície. Porém, para pedaços de tecidos que afundariam abaixo da superfície de um meio estático e morreriam por falta de aeração, é necessário adotar algum método de suporte. Já outros tecidos também crescem bem sem suporte em um meio líquido desde que seja arejado por agitação ou movimento.

Segundo Penchel, Otoni e Xavier (2007), o sistema de produção de mudas micropropagadas tem evoluído para um sistema de cultura de alto volume e eficiência

utilizando meio de cultura líquido com o emprego de equipamentos denominados de biorreatores.

O crescimento de células e tecidos submersos em meio líquido, como nos biorreatores, pode ser retardado e o desenvolvimento afetado pela privação de oxigênio e hiper-hidratação. Isto pode ser contornado aumentando-se a concentração de oxigênio do meio ou deixando a planta em contato direto com o ar, por meio do uso de um meio semissólido ou suportes (GEORGE, 2008). Murashige (1974) cita como exemplo de suporte o papel filtro, lã de vidro ou outro similar.

## 2.5 BIORREATORES

A micropropagação tradicional de plantas via ágar muitas vezes é dificultada pela alta demanda em número de recipientes, várias câmaras de fluxo laminar, espaço para cultivo e mão de obra na fase de multiplicação, o que torna o método questionável do ponto de vista comercial (PENCHEL; OTONI; XAVIER, 2007).

Assim, a necessidade de minimizar custos na micropropagação fez com que os pesquisadores buscassem desenvolver novas tecnologias e estratégias, visando também automatizar o processo. Já existe, por exemplo, alternativa de mecanização dos procedimentos rotineiros de preparo de meio de cultura e novas tecnologias de propagação em meio líquido, visando principalmente facilitar o manuseio em laboratório (PENCHEL; OTONI; XAVIER, 2007).

De acordo com Penchel, Otoni e Xavier (2007), dentre as alternativas mais promissoras para produção em larga escala estão os biorreatores, técnica na qual toda a superfície da cultura está sempre em contato com o meio nutritivo líquido, usada em substituição à micropropagação tradicional em meio semissólido.

Segundo a Takayama e Akita (1994), algumas das vantagens desta técnica são o uso de meio nutritivo líquido, o que aumenta a eficiência do processo; o manuseio mais simples da cultura; a economia de mão de obra; a redução de tempo e a aeração forçada, o que estimula o crescimento.

Porém, como desvantagens dos biorreatores estão a hiperhidricidade, a contaminação microbiana e a existência de espécies recalcitrantes para esse método, o que tem sido o principal entrave limitando seu uso para várias culturas de interesse comercial (PENCHEL; OTONI; XAVIER, 2007).

## 2.6 CLOROFILA

A técnica tradicional de multiplicação *in vitro* utiliza recipientes fechados, que dificultam as trocas gasosas entre ambiente interno e externo. Assim, a rápida queda na concentração de CO<sub>2</sub> no recipiente, aliado a outros fatores, culmina na baixa capacidade fotossintética (PENCHEL; OTONI; XAVIER, 2007).

De acordo com Netto et al. (2005), a determinação do teor de clorofila em folhas pode ser usada como uma ferramenta para diagnosticar a integridade do aparelho fotossintético em plantas sujeitas às adversidades ambientais.

A clorofila é o pigmento que absorve a luz e é produzido nos cloroplastos, a organela citoplasmática onde ocorre a fotossíntese (KLUG et al., 2012). A fotossíntese é um processo físico-químico característico de organismos clorofilados, por meio do qual substâncias orgânicas (glucose, sacarose e amido) são sintetizadas a partir de CO<sub>2</sub>, água e na presença de luz, principalmente entre comprimento de onda 400 e 600 nm (CID; TEIXEIRA, 2017).

Existem vários tipos de clorofilas denominadas, por exemplo, *a*, *b* e *c* (CID; TEIXEIRA, 2017). A clorofila *a* está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica, sendo o pigmento utilizado para realizar o primeiro estágio do processo fotossintético, a fase fotoquímica. Já os demais pigmentos, chamados de acessórios, auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação. Os principais pigmentos acessórios também incluem outros tipos de clorofilas, como a clorofila *b* (TAIZ; ZEIGER, 2004) que nas plantas é geralmente 1/3 da quantidade de clorofila *a* e seu papel está mais ligado à transferência de fótons para a clorofila *a*, pelo qual é importante em momentos de baixa luminosidade (CID; TEIXEIRA, 2017).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Florestal, do Departamento de Ciências Florestais, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.

As análises de clorofilas foram realizadas no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.

#### 3.2 CONDIÇÕES GERAIS DE CULTURA *IN VITRO*

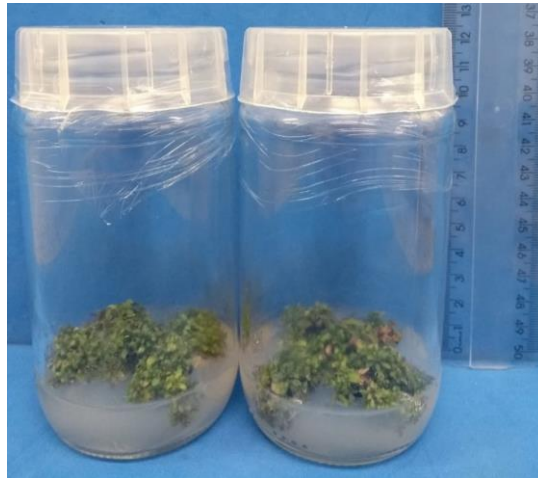
Todas as culturas foram mantidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo fotossintético de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### 3.3 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

##### 3.3.1 Instalação do experimento

Os explantes utilizados na realização do experimento foram obtidos de culturas *in vitro* de *Eucalyptus saligna* Sm. já estabelecidas, oriundas de plantas matrizes de jardim clonal mantidas em casa de vegetação em fase de subcultivo em torno da quinta repicagem (FIGURA 2). Foram utilizados frascos de vidro de 300 mL contendo 50 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) e vedados com plástico filme PVC.

FIGURA 2 – EXPLANTES DE *Eucalyptus saligna* NA QUINTA FASE DE SUBCULTIVO UTILIZADOS NA INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

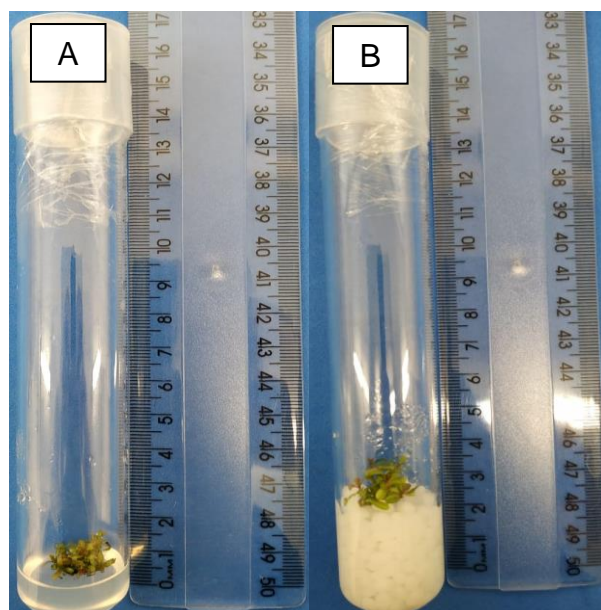


FONTE: A autora (2020).

O processo de introdução foi realizado em câmara de fluxo laminar e utilizou-se dos seguintes materiais: pinças, bisturi e placas de petri autoclavados e lamparina para flambagem dos instrumentos.

Os explantes, preparados em número de 4 a 6 brotações, foram introduzidos individualmente em tubo de ensaio de 50 mL vedado com plástico filme PVC, contendo 4 mL de meio de cultura MS (FIGURA 3).

FIGURA 3 – EXPLANTES DE *E. saligna* INOCULADOS EM TUBO DE ENSAIO CONTENDO MEIO DE CULTURA SEMISSÓLIDO (A) E LÍQUIDO COM SUPORTE (B)



FONTE: A autora (2020).

Na formulação do meio, acrescentou-se 4  $\mu\text{M}$  de BAP e 2  $\mu\text{M}$  de ANA. A sacarose foi acrescentada conforme os tratamentos descritos no item 3.3.3. Para atingir a consistência semissólida dilui-se 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar, enquanto para o meio líquido utilizou-se cerca de 7 g de um suporte sólido no formato esférico que é inerte e reutilizável após autoclavagem, preenchendo 3 cm de altura do tubo (FIGURA 4). O pH foi regulado em 5,8 antes da autoclavagem por 20 minutos a 1,0 kgf/cm<sup>2</sup> e temperatura a 120°C.

FIGURA 4 – SUPORTE SÓLIDO EM FORMATO ESFÉRICO UTILIZADO CONJUNTAMENTE AO MEIO LÍQUIDO NO EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*



FONTE: A autora (2020).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento, conforme as especificações do item 3.2. Após 30 dias de cultivo *in vitro* foram avaliadas a sobrevivência, a contaminação fúngica e bacteriana, a taxa de multiplicação, o comprimento médio dos brotos e o teor de clorofila *a*, *b* e total.

### 3.3.2 Metodologia de avaliação

O experimento foi avaliado 30 dias após a implantação, quando se avaliaram as seguintes variáveis:

- Sobrevivência;
- Mortalidade;
- Contaminação fúngica;
- Contaminação bacteriana;

- Número de brotos por explante (taxa de multiplicação);
- Comprimento médio dos brotos;
- Teor de clorofila *a*, *b* e total.

A sobrevivência, contaminação fúngica e bacteriana foram avaliados de forma visual. Consideraram-se como vivos aqueles explantes com maior proporção de brotações verdes, enquanto aqueles oxidados foram considerados mortos. Para a contaminação fúngica e bacteriana, contabilizou-se a presença ou ausência do microrganismo.

O número de brotações foi obtido através da contagem manual. Já o comprimento médio dos brotos foi medido com auxílio de régua.

### 3.3.3 Delineamento experimental

No experimento de multiplicação *in vitro* foram avaliadas quatro concentrações de sacarose (0, 15, 30 e 45 g L<sup>-1</sup>) e duas consistências de meio de cultura (semissólido e líquido com suporte) combinados em fatorial. Os oito tratamentos são descritos na TABELA 1.

TABELA 1 – TRATAMENTOS REALIZADOS NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *E. saligna*

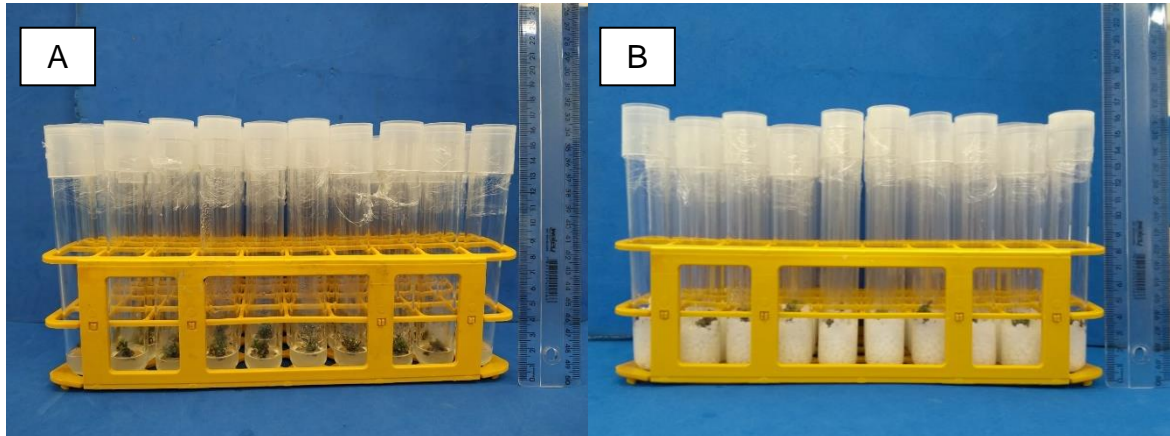
Tratamento	Consistência do meio de cultura	Concentração de sacarose (g L <sup>-1</sup> )
1	Semissólido	0
2	Semissólido	15
3	Semissólido	30
4	Semissólido	45
5	Líquido	0
6	Líquido	15
7	Líquido	30
8	Líquido	45

FONTE: A autora (2020).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por dez tubos de ensaio contendo um explante, totalizando 320 amostras do material.

A imagem a seguir (FIGURA 5) ilustra duas grades (tratamentos) de meio semissólido e meio líquido após a montagem do experimento.

FIGURA 5 – EXEMPLO DOS TRATAMENTOS COM CONSISTÊNCIA DE MEIO SEMISSÓLIDA (A) E LÍQUIDA (B) APÓS MONTAGEM DO EXPERIMENTO DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*



FONTE: A autora (2020).

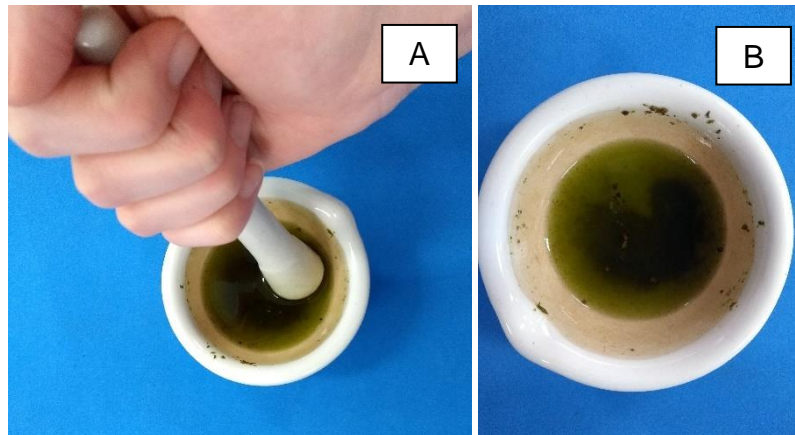
Quanto à análise estatística, os dados foram submetidos ao teste de Bartlett, seguido da análise de variância ANOVA e comparação das médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Utilizou-se para o processamento dos dados o programa de assistência estatística ASSITAT versão 7.7 (SILVA, 2014).

### 3.4 TEOR DE CLOROFILA

Os explantes vivos foram armazenados em freezer para sua conservação até a realização do teste de clorofila.

O material verde de cada tratamento foi dividido em três amostras aproximadamente iguais, das quais obteve-se o peso em balança analítica. Cada amostra foi macerada em almofariz acrescentando-se 15 mL de acetona 80% (FIGURA 6).

FIGURA 6 – MACERAÇÃO DAS AMOSTRAS (A) E CONTEÚDO RESULTANTE (B) NA PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA O TESTE DE CLOROFILA



FONTE: A autora (2020).

O conteúdo líquido resultante da maceração foi transferido para tubos de centrifuga de 10 mL, para posterior centrifugação em centrífuga Sigma 3K30 a 12.000 rpm por dez minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para cubeta de vidro 10 mm e então realizou-se a leitura da absorbância nos comprimentos de onda 645 e 663 nanômetros em espectrofotômetro digital UV-VIS 190 a 1000 nm UV-M51.

Os teores de clorofila foram calculados conforme metodologia de Arnon (1949) através das fórmulas:

$$\text{Clorofila } a = \left( \frac{12,7 * \text{abs}663 - 2,69 * \text{abs}645}{1000 * \text{MF}} \right) * V \quad (1)$$

$$\text{Clorofila } b = \left( \frac{22,9 * \text{abs}645 - 4,68 * \text{abs}663}{1000 * \text{MF}} \right) * V \quad (2)$$

$$\text{Clorofila total} = \left( \frac{8,02 * \text{abs}663 + 20,2 * \text{abs}645}{1000 * \text{MF}} \right) * V \quad (3)$$

onde:

Clorofila *a* = teor de clorofila *a* em mg g<sup>-1</sup> de matéria fresca

Clorofila *b* = teor de clorofila *b* em mg g<sup>-1</sup> de matéria fresca

Clorofila total = teor de clorofila total em mg g<sup>-1</sup> de matéria fresca

abs663 = absorbância a 663 nm

abs645 = absorbância a 645 nm

V = volume final do extrato (mL)

MF = massa fresca de material utilizado no extrato (g)

Os valores de clorofila foram transformados em  $\log_{10}$  e submetidos aos testes estatísticos conforme o item 3.3.3.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

De acordo com Xavier, Otoni e Penchel (2007) a contaminação do material por microrganismos está entre os principais problemas da técnica de micropropagação pela proliferação de gemas axilares, sendo uma séria limitação no estabelecimento de culturas. No entanto, neste trabalho, após 30 dias de cultivo *in vitro* praticamente não se observou contaminação fúngica e bacteriana, apenas porcentagens muito baixas (2,5%) nos tratamentos 1, 2 e 3 (TABELA 2).

A baixa contaminação por agentes contaminantes pode ser em razão do material utilizado advir de condições controladas, ou seja, culturas *in vitro* já estabelecidas, além dos cuidados para evitar nova contaminação durante a instalação dos experimentos.

TABELA 2 – CONTAMINAÇÃO FÚNGICA, BACTERIANA E SOBREVIVÊNCIA DE EXPLANTES DE *Eucalyptus saligna* MULTIPLICADOS *IN VITRO* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E CONSISTÊNCIAS DO MEIO DE CULTURA

Tratamento	Contaminação fúngica (%)	Contaminação bacteriana (%)	Sobrevivência (%)
T1 (MS semissólido; 0 g L <sup>-1</sup> sacarose)	2,50 a	0,00 a	60,00 bc
T2 (MS semissólido; 15 g L <sup>-1</sup> sacarose)	2,50 a	0,00 a	100,00 a
T3 (MS semissólido; 30 g L <sup>-1</sup> sacarose)	0,00 a	2,50 a	95,00 a
T4 (MS semissólido; 45 g L <sup>-1</sup> sacarose)	0,00 a	0,00 a	100,00 a
T5 (MS líquido; 0 g L <sup>-1</sup> sacarose)	0,00 a	0,00 a	32,50 d
T6 (MS líquido; 15 g L <sup>-1</sup> sacarose)	0,00 a	0,00 a	30,00 d
T7 (MS líquido; 30 g L <sup>-1</sup> sacarose)	0,00 a	0,00 a	37,50 cd
T8 (MS líquido; 45 g L <sup>-1</sup> sacarose)	0,00 a	0,00 a	77,50 ab
<b>CV (%)</b>	<b>409,41</b>	<b>565,69</b>	<b>15,41</b>

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto à sobrevivência dos explantes, observa-se na TABELA 2 que as médias foram bastante baixas nos tratamentos com meio de cultura líquido, entre 32,50% a 37,50%, sobressaindo-se apenas o tratamento com maior concentração de sacarose, o qual apresentou 77,50% das plantas vivas.

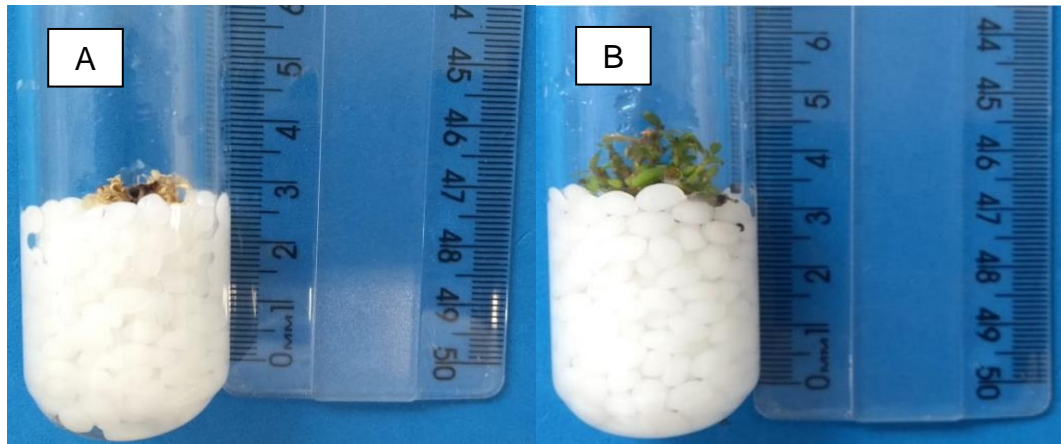
A maior sobrevivência foi observada na consistência semissólida do meio de cultura. Os tratamentos T2 e T4 obtiveram sobrevivência de 100,00%, entretanto não diferem estatisticamente do tratamento T3 (95,00%). Este resultado possivelmente seja reflexo tanto da consistência do meio de cultura quanto da concentração de sacarose, já que quando nas mesmas condições de consistência de meio e na ausência de sacarose, a sobrevivência caiu para 60,00%.

Sabe-se que uma das práticas empregadas para reduzir os custos de produção é a eliminação total da sacarose do meio de cultura (KOZAI; KUBOTA, 2001). Porém, quando plantas são cultivadas *in vitro* nesta condição, há a necessidade de se aumentar a intensidade luminosa e a difusão de CO<sub>2</sub> e da umidade (vapor da água) em volta da planta (KOZAI; NGUYEN, 2003), para promover a fotossíntese, a transpiração e o acúmulo de matéria seca (ERIG; SCHUCH, 2005). Por isso os tratamentos com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose resultaram em menor sobrevivência de 60,00% no meio com ágar e 32,50% no meio líquido.

Os resultados evidenciam que o material testado como suporte no meio líquido não foi eficiente para a sobrevivência. Observou-se que o suporte não forneceu um bom contato do explante com o meio de cultura que se depositava no fundo do tubo de ensaio, comprometendo o suprimento das plantas com sua fonte nutritiva, o que culminou em uma grande mortalidade. A maior sobrevivência entre os tratamentos de meio líquido ocorreu na maior concentração de sacarose, o que pode ter contribuído para tal fato.

A FIGURA 7 ilustra a sobrevivência e a mortalidade dos explantes após 30 dias de cultivo *in vitro*.

FIGURA 7 – EXPLANTE MORTO (A) E EXPLANTE VIVO (B) DE *Eucalyptus saligna* APÓS 30 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO DE CULTURA MS LÍQUIDO COM SUPORTE



FONTE: A autora (2020).

Para a variável número de brotações por explante (taxa de multiplicação), de forma geral os tratamentos em meio líquido obtiveram médias inferiores aos tratamentos em meio semissólido (TABELA 3).

TABELA 3 – TAXA DE MULTIPLICAÇÃO (NÚMERO DE BROTOS / EXPLANTE) E COMPRIMENTO DOS BROTOS DE EXPLANTES DE *Eucalyptus saligna* MULTIPLICADOS *IN VITRO* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E CONSISTÊNCIAS DO MEIO DE CULTURA

Tratamento	Taxa de Multiplicação	Comprimento brotos (mm)
T1 (MS semissólido; 0 g L <sup>-1</sup> sacarose)	7,39 b	6,01 a
T2 (MS semissólido; 15 g L <sup>-1</sup> sacarose)	18,28 a	6,48 a
T3 (MS semissólido; 30 g L <sup>-1</sup> sacarose)	19,97 a	5,95 a
T4 (MS semissólido; 45 g L <sup>-1</sup> sacarose)	23,95 a	4,73 a
T5 (MS líquido; 0 g L <sup>-1</sup> sacarose)	6,21 b	6,81 a
T6 (MS líquido; 15 g L <sup>-1</sup> sacarose)	8,98 b	6,92 a
T7 (MS líquido; 30 g L <sup>-1</sup> sacarose)	7,67 b	6,13 a
T8 (MS líquido; 45 g L <sup>-1</sup> sacarose)	7,41 b	5,75 a
<b>CV (%)</b>	<b>20,77</b>	<b>16,55</b>

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com os quatro tratamentos em meio semissólido foi obtida uma média de 17,40 brotos por explante contra a média de 7,57 nos tratamentos com meio líquido. Mais uma vez, atribui-se o baixo desempenho à ineficiência do suporte em promover contato adequado do explante com o meio de cultura líquido.

Resultados que condizem com este trabalho foram encontrados por Correia et al. (1995) quando testaram o efeito da consistência do meio no crescimento *in vitro* de gemas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Neste caso, o uso de um suporte de manta acrílica para sustentação do explante em meio líquido promoveu menores médias de massa fresca e massa seca do que o meio semissólido aos 42 dias de cultivo.

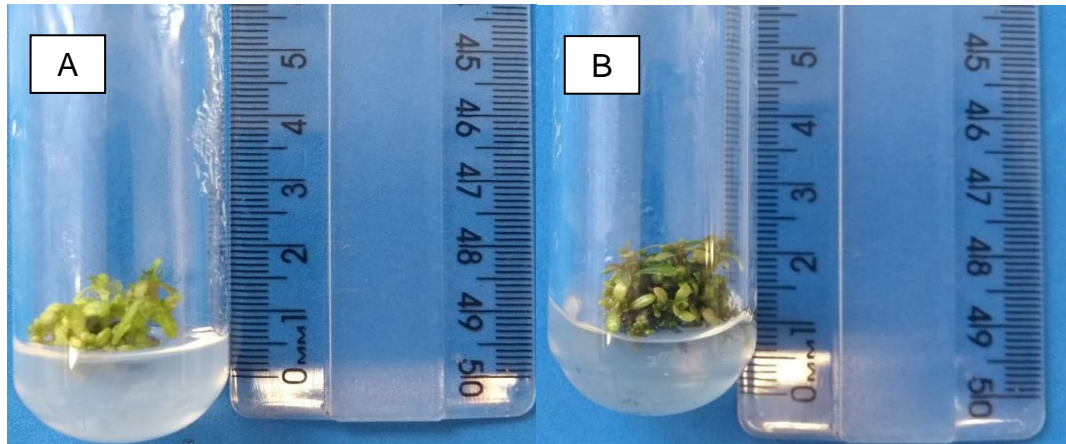
Mesmo frente ao baixo desempenho demonstrado no experimento com meio líquido, isto não significa que a micropropagação de eucalipto nesta consistência de meio seja inviável. Correia (1993) concluiu que o cultivo de clones de *E. grandis* em meio de cultura líquido com suporte confeccionado de fibro-espuma apresentou maiores médias de massa fresca (1177,3 mg) do que em meio semissólido (995,6 mg).

Oliveira et al. (2011) concluíram que o cultivo de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreator RITA<sup>®</sup> (meio líquido) foi superior ao meio semissólido em todas as características de crescimento avaliadas, obtendo cerca de 30 brotos por explante contra 15, respectivamente. Correia (2011) constatou também que o biorreator RITA<sup>®</sup> promoveu maiores ganhos em número de brotos e massa fresca em comparação com o meio de cultura semissólido, na micropropagação de híbridos de *E. globulus*. Nestes casos, o cultivo em meio líquido mostrou vantagens em comparação ao cultivo semissólido, sendo um dos motivos a rápida absorção de nutrientes, já que as plantas estão banhadas pelo meio nutritivo (GUPTA; TIMMIS, 2005).

Thorpe et al. (2008) citam outros suportes que já foram utilizados com sucesso: membrana flutuante de polipropileno no topo de um meio líquido para cultivar células e protoplastos de aspargos; papéis filtro colocados sobre almofadas de espuma de poliuretano saturadas com meio; lã de poliéster para apoiar culturas de abeto; espuma de poliuretano e vermiculita. Os autores destacam que entre outros materiais já testados, ao contrário do utilizado neste trabalho, estão principalmente substâncias porosas.

A maior taxa de multiplicação de 23,95 foi apresentada pelo T4, em meio semissólido e na maior concentração de sacarose testada. Entretanto, este resultado se equivale estatisticamente às taxas de multiplicação dos tratamentos com 15 e 30 g L<sup>-1</sup> (FIGURA 8) de sacarose em meio semissólido, respectivamente 18,28 e 19,97.

FIGURA 8 – EXEMPLO DA MULTIPLICAÇÃO DE EXPLANTES DE *E. saligna* APÓS 30 DIAS DE CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS SEMISSÓLIDO SUPLEMENTADO DE 0 g L<sup>-1</sup> (A) E 30 g L<sup>-1</sup> (B) DE SACAROSE



FONTE: A autora (2020).

Oliveira et al. (2011) ao cultivarem um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em meio MS semissólido acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose encontraram cerca de 10 brotos por explante aos 28 dias de cultivo.

De forma geral, principalmente em meio de cultura semissólido, o aumento da taxa de multiplicação acompanhou o incremento em sacarose. Assim, pode-se dizer que o carboidrato adicionado no meio de cultura forneceu energia metabólica e esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos, proteínas, polissacarídeos e compostos orgânicos necessários para o crescimento (MENDES et al., 2015). Este fato é observado também por outros autores.

Mendes et al. (2015) também notificaram a importância da sacarose no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro havendo aumento de brotações com o aumento da concentração e praticamente nenhuma formação de brotos na ausência desta. Skrebsky, Nicoloso e Ferrão (2004) notificaram que o maior crescimento de *Pfaffia glomerata* é proporcionado pelas concentrações de 45 e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Faria et al. (2004) também obtiveram resultados semelhantes no cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile*, quando a maior taxa de multiplicação ocorreu na maior concentração de sacarose testada (60 g L<sup>-1</sup>).

Souza et al. (2020), ao avaliarem a influência da sacarose no cultivo *in vitro* de *Jacaranda brasiliiana*, uma espécie arbórea da Mata Atlântica brasileira, também relataram sucessivo aumento do número de folhas à medida que se aumentou a quantidade do carboidrato.

Logo, no contexto desse trabalho, constata-se por meio dos resultados que a concentração de sacarose foi importante para a multiplicação de brotos de *E. saligna*, havendo incorporação de carboidrato e aumento da energia disponível para os explantes *in vitro*.

Para a variável comprimento dos brotos obteve-se uma média geral entre todos os tratamentos de 6,10 mm. Estatisticamente todos os tratamentos são iguais, mas via de regra, à medida que se aumentou a concentração de sacarose, o comprimento dos brotos diminuiu, de forma que nas duas consistências de meio o menor comprimento foi apresentado na concentração de 45 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Os maiores valores foram observados nas concentrações de 15 g L<sup>-1</sup> dessa substância.

Lemes et al. (2016) também observaram no cultivo *in vitro* de *Miltonia flavescens* em meio MS ½ que à medida que a concentração de sacarose se elevou, a altura das plantas foi reduzida. Besson et al. (2010), para a mesma espécie, verificaram que a suplementação com 45 e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose prejudicou o comprimento da parte aérea em relação à concentração de 30 g L<sup>-1</sup>. Souza et al. (2020) obtiveram para *Handroanthus impetiginosus* (Ipê) maior comprimento da parte aérea na concentração de 0 g L<sup>-1</sup> do que nas concentrações de 15 e 30 g L<sup>-1</sup>.

Penchel, Otoni e Xavier (2007) citam os altos níveis de açúcar no meio como uma das razões para a redução do crescimento das plantas no sistema de cultivo *in vitro*, além da baixa capacidade fotossintética e baixa irradiância.

Entretanto, estatisticamente não houve diferença entre os valores de comprimento de brotos, demonstrando que baixas concentrações de sacarose podem ser utilizadas.

Realizar alterações na composição química do meio de cultivo e no intercâmbio de gases com o meio externo podem promover a rustificação já *in vitro*. Com isso haveria melhoras na competência fotossintética e nas relações hídricas, conseqüentemente reduzindo a necessidade de aclimatização *ex vitro* (PENCHEL; OTONI; XAVIER, 2007).

A ideia de reduzir a suplementação de sacarose no meio para melhorar o desempenho das plântulas na aclimatização, reduzindo assim os custos de produção, é bastante citada na literatura. Correia et al. (2012) encontraram resultados condizentes para a espécie *Cattleya labiata*, indicando que a ausência de sacarose, em relação a adição de 30 g L<sup>-1</sup> no meio de cultura, favorece o desenvolvimento da

parte aérea e radicular, além da maior porcentagem de sobrevivência na aclimatização.

No entanto Franceschi, Dutra e Hansel (2007) concluíram que quanto maior a concentração de sacarose na pré-aclimatização, melhor é a taxa de sobrevivência no enraizamento *ex vitro* de *Eucalyptus benthamii*. Os mesmos resultados foram encontrados por Franceschi et al. (2009), quando altos teores de sacarose influenciaram positivamente a sobrevivência e desenvolvimento de raízes de *E. benthamii ex vitro*.

#### 4.2 TEOR DE CLOROFILA

A determinação dos teores de clorofilas em plantas cultivadas *in vitro* fornece informações importantes sobre o estado fotossintético durante a micropropagação, visto que podem influenciar na sobrevivência das plantas durante a aclimatização (YADAV; IBAKARI; GUPTA, 2010; SOUZA et al., 2020).

A TABELA 4 traz os resultados obtidos nos testes de clorofila dos explantes de *Eucalyptus saligna* micropropagados nas condições de cada tratamento adotado.

TABELA 4 – TEOR DE CLOROFILA *a*, *b* E TOTAL EM EXPLANTES DE *Eucalyptus saligna* MULTIPLICADOS *IN VITRO* SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE E CONSISTÊNCIAS DO MEIO DE CULTURA

Tratamento	Clorofila <i>a</i> (mg g <sup>-1</sup> )	Clorofila <i>b</i> (mg g <sup>-1</sup> )	Clorofila total (mg g <sup>-1</sup> )
T1 (MS semissólido; 0 g L <sup>-1</sup> sacarose)	0,248 b	0,140 b	0,388 b
T2 (MS semissólido; 15 g L <sup>-1</sup> sacarose)	0,098 bc	0,045 cd	0,144 bc
T3 (MS semissólido; 30 g L <sup>-1</sup> sacarose)	0,129 b	0,110 bc	0,238 b
T4 (MS semissólido; 45 g L <sup>-1</sup> sacarose)	0,047 c	0,032 d	0,079 c
T5 (MS líquido; 0 g L <sup>-1</sup> sacarose)	1,631 a	1,184 a	2,815 a
T6 (MS líquido; 15 g L <sup>-1</sup> sacarose)	0,114 bc	0,060 bcd	0,174 bc
T7 (MS líquido; 30 g L <sup>-1</sup> sacarose)	2,478 a	1,089 a	3,566 a
T8 (MS líquido; 45 g L <sup>-1</sup> sacarose)	1,437 a	0,687 a	2,124 a
<b>CV (%)</b>	<b>39,08</b>	<b>56,36</b>	<b>39,88</b>

FONTE: A autora (2020).

NOTA: Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados dos teores de clorofila variaram em função da concentração de sacarose. Nos tratamentos em meio semissólido, os maiores teores de clorofila *a*, *b* e

total ocorreram na concentração de 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose, seguido da concentração de 30 g L<sup>-1</sup>. Já o tratamento com maior concentração do carboidrato resultou na menor quantidade dos pigmentos fotossintéticos.

A presença de sacarose no meio de cultura de tecidos inibe a formação de clorofila e a fotossíntese, tornando o crescimento autotrófico menos viável (THORPE et al., 2008). Isto explica por que na maior concentração de sacarose testada em meio semissólido obteve-se o menor teor de clorofila.

Mendes et al. (2015) obtiveram resultados semelhantes ao ajustar a concentração de sacarose para o melhor desenvolvimento *in vitro* do aparelho fotossintético de plântulas de abacaxizeiro, quando os teores de clorofila *a*, *b* e total foram significativamente maiores no tratamento com 0 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Células cultivadas com sacarose por períodos prolongados podem perder permanentemente a capacidade de sintetizar clorofila, pois os plastídios são convertidos em amiloplastos cheios de amido e isso pode alterar a expressão do DNA dos plastídios (THORPE et al., 2008), que são organelas como o cloroplasto presentes nas células de plantas e que desempenham funções biossintéticas e metabólicas essenciais (KLEFFMANN et al., 2007).

Khan et al. (2002) estudaram o crescimento e taxas fotossintéticas líquidas de *Eucalyptus tereticornis* sob condições fotomixotróficas e diversas condições de micropropagação fotoautotrófica. Como resultado os autores obtiveram taxa fotossintética negativa para os explantes cultivados em meio MS gelificado com ágar, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, fluxo fotossintético de 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e concentração de CO<sub>2</sub> entre 400-450  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ . Nas mesmas condições, apenas elevando-se o fluxo fotossintético para 125  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e suprimindo-se a sacarose, a taxa fotossintética foi positiva. Inoue, Graça e Correa (1998) também concluíram que plântulas de *E. tereticornis* cultivadas com sacarose exibiram uma fotossíntese significativamente menor que aquelas cultivadas na ausência desse carboidrato.

Silva et al. (2012) evidenciaram que para o abacaxizeiro, na multiplicação em condições de alta irradiância (luz natural), não é necessário o emprego de altas concentrações de sacarose, mas já em condições de luz artificial, o fator sacarose é limitante.

Porém, a sacarose pode atuar como um sinal negativo e positivo, influenciando os níveis de proteínas fotossintéticas e a capacidade fotossintética em plantas (FURBANK; PRITCHARD; JENKINS, 1997).

Souza et al. (2020), ao estudarem a multiplicação *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus* e *Jacaranda brasiliiana*, verificaram que a supressão da sacarose no meio de cultivo influenciou significativamente na redução dos teores de clorofila total em ambas as espécies.

Já os resultados apresentados pelos tratamentos em meio líquido não seguiram a mesma tendência, e, no geral, foram superiores à outra consistência de meio testada. Mesmo os tratamentos com maior concentração de sacarose apresentaram alto teor de clorofila. Uma explicação pode ser em virtude da característica do sistema meio líquido e suporte que pode ter impedido o contato das plantas com o carboidrato, assim se comportando da mesma forma que os tratamentos na ausência de sacarose.

Em meio de cultura sem açúcar as plântulas são forçadas a desenvolver seu aparelho fotossintético durante o cultivo *in vitro* (AFREEN; ZOBAYED; KOZAI, 2002). Culturas clorofiladas possuem capacidade fotossintética relativamente alta, com consequências positivas sobre o crescimento e o percentual de sobrevivência *ex vitro* (PENCHEL; OTONI; XAVIER, 2007). Seguindo este ponto de vista, os explantes oriundos do meio líquido teriam uma vantagem na fase *ex vitro*.

Obter um maior desenvolvimento da capacidade autotrófica de plântulas ainda *in vitro* através de tratamentos que permitem aumentar a fotossíntese se faz necessário para possibilitar uma maior sobrevivência durante a transferência para a casa de vegetação (INOUE; GRAÇA; CORREA, 1998).

## CONCLUSÕES

Conclui-se que o aumento na concentração de sacarose influencia positivamente na sobrevivência e na multiplicação de explantes de *Eucalyptus saligna* Sm.

Na condição de ausência de sacarose, a sobrevivência e o número de brotações são menores, principalmente na consistência de meio semissólida.

O material sólido em formato esférico utilizado como suporte em meio líquido não promove taxas satisfatórias de sobrevivência e multiplicação. De forma geral, tais parâmetros são superiores em meio semissólido.

Os teores de clorofila foram superiores no meio líquido, e, no meio de cultura semissólido, a supressão de sacarose resulta em maior teor total do pigmento avaliado, seguido da concentração de 30 g L<sup>-1</sup>.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O material utilizado como suporte em meio líquido não foi capaz de promover alta sobrevivência dos explantes de *Eucalyptus saligna* Sm., nas condições deste trabalho, e resultou em baixas taxas de multiplicação, comparado ao meio semissólido. Sugere-se testar outros materiais como suporte que sejam principalmente porosos, visto que resultados positivos já foram encontrados em outros trabalhos. Além disso, a reposição do meio a cada dez dias, por exemplo, pode ser uma alternativa para não faltar nutrientes à planta, ou mesmo dosar um maior volume de meio.

A adição de sacarose no meio de cultura influenciou positivamente na emissão de brotos de *E. saligna*, evidenciando a importância desta substância para a multiplicação *in vitro* em condições fotomixotróficas.

A suplementação de sacarose também teve efeito no teor de clorofila, sendo este significativamente menor na maior concentração do carboidrato em meio com ágar.

Os resultados evidenciam que é possível ajustar o meio de cultura com uma concentração mais baixa de sacarose mantendo ainda a produtividade e possivelmente melhorando as condições fotossintéticas das plântulas.

Com a adoção de práticas como estas, seria possível economizar com insumos como a sacarose, além de facilitar o processo de aclimatização *ex vitro* através do incremento nas taxas fotossintéticas. Com isso haveria maior sobrevivência *ex vitro* e redução de custos no processo produtivo de mudas de *E. saligna*, fator este que tem inviabilizado a utilização da micropropagação em escala comercial.

Entretanto, a fim de confirmar essas hipóteses, faz-se necessário outros testes e sugere-se conduzir os mesmos tratamentos nas fases de enraizamento e aclimatização *ex vitro*.

## REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF). **Anuário estatístico ABRAF 2013 ano base 2012**. Brasília, 2013.
- AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A.; KOZAI, T. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. **Annals of Botany**, London, v. 90, p.11-19, mar. 2002.
- ANDRADE, S. R. M. de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. 1. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 1-15, jan. 1949.
- ASSIS, T. F. Melhoramento genético de *Eucalyptus*: desafios e perspectivas. In: 3º ENCONTRO BRASILEIRO DE SILVICULTURA, 3, 2014, Campinas. **Anais...** 2. ed. Curitiba: Malinovski, 2016. p. 113-133.
- ASSIS, T. F.; ABAD, J. I. M.; AGUIAR, A. Melhoramento do eucalipto. In: SCHUMACHER, M. V.; VIEIRA, M. (Org.). **Silvicultura do eucalipto no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2016. p. 225-247.
- ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.) **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: [s.n.], 2007. p. 93-121.
- BESSON, J. C. F. et al. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 9-13, jan./mar. 2010.
- BOLAND, D. J. et al. **Forest trees of Australia**. 5. ed. Austrália: CSIRO Publishing, 2006.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 6. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2013.
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. 1. ed. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2003.
- CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. **Fisiologia vegetal: definições e conceitos**. 1. ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2017.
- CORREIA, A. C. G. **Micropropagação em biorreatores de imersão temporária e enraizamento de miniestacas e microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus***. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp. *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido.** 113 f. Tese (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

CORREIA, D. et al. 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**, [S.I.], n. 48/49, p. 107-116, jan./dez. 1995.

CORREIA, D. et al. Otimização da produção de mudas de *Cattleya labiata*: efeito da sacarose no crescimento *in vitro* e na aclimatização. **Circular Técnica Embrapa**, Fortaleza, n. 38, out. 2012.

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. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, jul./ago. 2005.

FARIA, R. T. et al. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 780-783, out./dez. 2004.

FERREIRA, M.; SANTOS, P. E. T. dos. Melhoramento genético florestal dos *Eucalyptus* no Brasil: breve histórico e perspectivas. In: CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS - IUFRO, 1997, Salvador. **Proceedings**. Colombo: Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, 1997. p.14-34.

FONSECA, S. M. da. et al. **Manual prático de melhoramento genético do eucalipto.** Viçosa, MG: Editora UFV, 2010.

FRANCESCHI, C. R. B. et al. Luz e sacarose como condicionantes *in vitro* para o enraizamento *ex vitro* de plântulas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage. In: VIII ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 2009, Colombo. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2009.

FRANCESCHI, C. R. B.; DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A. Concentração de sacarose na sobrevivência de plântulas de *Eucalyptus benthamii* Maid e Camb. durante o enraizamento *ex vitro*. In: VI ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA FLORESTAS, 2007, Colombo. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas, 2007.

FRANCLET, A.; BOULAY, M. Micropropagation of frost resistant eucalypt clones. **Australian Forestry Research**, [S.I.], v. 13, n. 1, p. 83-89, 1982.

FURBANK, R. T.; PRITCHARD, J.; JENKINS, C. L. D. Effects of exogenous sucrose feeding on photosynthesis in the C3 plant tobacco and the C4 plant *Flaveria bidentis*. **Australian Journal of Plant Physiology**, [S.I.], v. 24, p. 291-299, 1997.

GAHAN, P. B.; GEORGE, E. F. Adventitious regeneration. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrech: Springer, 2008. p. 355-402.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure – background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. (Ed.). **Plant Propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrech: Springer, 2008. p. 1-28.

GEORGE, E. F.; KLERK, G-J. The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. (Ed.). **Plant Propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrech: Springer, 2008. p. 65-114.

GRATTAPAGLIA, F.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 533-568.

GUPTA, P.K.; TIMMIS, R. Mass propagation of conifer trees in liquid cultures - progress towards commercialization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, n. 3, p. 339-346, 2005.

HARTNEY, V. J. Vegetative propagation of eucalypts. **Australian Forestry Research**, Canberra, v. 10, p. 191-211, 1980.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBÁ). **Relatório 2019**. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf>>. Acesso em: 19 jul. 2020.

INOUE, M. T.; GRAÇA, M. E. C.; CORREA, G. Capacidade fotossintética de plântulas micropropagadas e de mudas de *Eucalyptus tereticornis* SM. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 36, p. 71-77, jan./jun. 1998.

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS (IPEF). ***Eucalyptus saligna* Sm.** Disponível em: <<https://www2.ipef.br/identificacao/cief/especies/saligna.asp>>. Acesso em: 19 jul. 2020.

KHAN, P. S. S. V. et al. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [S.l.], v. 71, p. 141–146, 2002.

KLEFFMANN, T. et al. Proteome dynamics during plastid differentiation in rice. **Plant Physiology**, [S.l.], v. 143, p. 912-923, fev. 2007.

KLUG, W. S. et al. **Concepts of genetics**. 10. ed. Boston: Pearson, 2012.

KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T. Photoautotrophic micropropagation of woody and tropical plants. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 757-781.

KOZAI, T; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, [S.l.], v. 114, p. 525-537, 2001.

LEMES, C. S. R. et al. Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia flavescens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 3, p. 499-505, mar. 2016.

LORENZI, H. et al. **Árvores exóticas no Brasil**: madeireiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2003.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. In:\_\_\_\_\_. **Plant cell culture protocols**, methods in molecular biology. New Jersey: Humana Press, 2018. p. 3-13.

MENDES, P. S. et al. Cultivo *in vitro* de plântulas de abacaxizeiro com uso de filtros, ventilação artificial e sacarose. **Revista Agro@ambiente On-line**, [S.l.], v. 9, n. 2, p. 202-207, abr./jun. 2015.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual review of plant physiology**, [S.l.], n. 25, p. 135-166, 1974.

OLIVEIRA, M. L. de. et al. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 39, n. 91, p. 309-315, set. 2011.

PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: BORÉM, A. (Ed). **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: [s.n.], 2007. p. 75-92.

QUEIRÓZ, M. A. Melhoramento genético no Brasil - realizações e perspectivas. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento - Plantas**. 1. ed. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 1-28.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008.

SAHU, J.; SAHU, R. K. A review on low cost methods for *in vitro* micropropagation of plant through tissue culture technique. **UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences**, [S.l.], v. 1, p. 38-41, 2013.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Cultura de tecidos aplicada ao melhoramento genético de plantas. In: AMABILE, R. F.; VILELA, M. S.; PEIXOTO, J. R. (Ed.). **Melhoramento de Plantas**: variabilidade genética, ferramentas e mercado. Brasília: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2018.

SILVA, A. B. da. et al. Luz natural, sacarose e fitorreguladores na anatomia foliar e crescimento *in vitro* de abacaxizeiro micropropagado. **Plan Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.8, n.1-2, p.1-9, 2012. p. 77-94.

SILVA, F. A. S. **ASSISTAT: Versão 7.7 beta**. DEAG-CTRN-UFCG. 2014.

SKBREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34., n. 5, p. 1471-1477, set./out. 2004.

SOUZA, L. M. et al. Influência da sacarose no crescimento e no perfil de pigmentos fotossintéticos em duas espécies arbóreas cultivadas *in vitro*. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 1, p.1916-1926, jan. 2020.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAKAYAMA, S.; AKITA, M. The types of bioreactor used for shoot and embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [S.I.], v. 39, p. 147-156, 1994.

THORPE, T. et al. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrech: Springer, 2008. p 115-173.

TONELLO, K. C. Melhoramento de essências florestais. **Revista da Madeira**, [S.I.], v. 83, p. 60-62, 2004.

NETTO, A. T. et al. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, v. 104, p. 199-209, 2005.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed). **Biotechnologia Florestal**. Viçosa, MG: [s.n.], 2007. p. 55-74.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. da. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2009.

XAVIER, S.; SILVA, R. L. da. Evolução da silvicultura clonal de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**, [S.I.], v. 34, n. 1, p. 93-98, 2010.

YADAV, S. P.; IBAKARI, Y.; GUPTA, S. D. Estimation of the chlorophyll content of micropropagated potato plants using RGB based image analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [S.I.], v. 100, p. 183-188, 2010.