III CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS COINTER - PDVAGRO 2018

DESINFESTAÇÃO E INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE *EUCALYPTUS*

IN VITRO DISINFESTATION AND INTRODUCTION OF *EUCALYPTUS* EXPLANTS

Apresentação: Pôster

Tarcísio Tomás Cabral de Sousa¹; Lucas Guilherme Moura Oliveira²; Vinícius
Emanoel Carvalho³; Miranda Titon⁴

DOI: <https://doi.org/10.31692/2526-7701.IIICOINTERPDVAGRO.2018.00424>

Introdução

O gênero *Eucalyptus* foi introduzido no Brasil em 1903, por Edmundo Navarro de Andrade, para a produção dormentes de estradas férreas. Hoje, este gênero representa o mais importante para o país, devido a suas grandes importância econômica e seu grande potencial como matéria prima para as indústrias (BRISOLAL & DEMARCO, 2011).

No Brasil, o eucalipto é a principal fonte de madeira e celulose, sendo seus plantios afetados por inúmeras fatores abióticos e bióticos. Uma forma de controlar e evitar a disseminação destas doenças é através da propagação vegetativa (MAFIA *et al.*, 2012).

A micropropagação *in vitro* se destaca na propagação de espécies de maior interesse econômico e científico, apresentando inúmeras vantagens (OLIVEIRA *et al.*, 2011). É uma alternativa de técnica para espécies de plantas que apresentam baixa capacidade de enraizamento. Além de contribuir para qualidade sanitária dos clones e conservação do banco germoplasma de espécies exóticas e nativas (MACHADO *et al.*, 2013).

O sucesso da micropropagação *in vitro* depende da qualidade do material utilizado, para que se obtenha produtos assépticos e com vigor vegetativo (BORGES *et al.*, 2012).

Por isso, a micropropagação constitui uma alternativa economicamente adequada para melhoramento florestal via clonagem de genótipos superiores, proporcionando a obtenção de

¹ Doutorando em Ciência Florestal, UFVJM- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, tarcisiocox@hotmail.com

² Mestrando em Ciência Florestal, UFVJM- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, lucasguilhermemo@hotmail.com

³ Mestrando em Zootecnia, UFVJM- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, viniciusemanoel12@gmail.com

⁴ Doutora, UFVJM- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, mirandatiton@gmail.com

plantas assépticas e melhorando (OLIVEIRA *et al.*, 2013). O cultivo *in vitro* requer estudos mais específicos e metodologias que atendam o controle sanitário dos explantes (PINHAL *et al.*, 2011). Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de fungicida combinado com concentrações de hipoclorito de sódio na desinfestação de explantes de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

Fundamentação Teórica

Um dos grandes problemas da produção *in vitro* em escala comercial é a contaminação por fungos e bactérias. Esses microrganismos se estabelecem no meio de cultura ou no material vegetativo, competindo com os explante em nutrientes, além de produzir substâncias tóxicas que impede o desenvolvimento dos mesmos (SOUSA *et al.*, 2007). As taxas de contaminação, principalmente na fase inicial do cultivo *in vitro* são elevadas, porém a desinfecção dos explantes oriundos de ambientes protegidos é fácil (BORGES *et al.*, 2012). Nos ambientes protegidos, as plantas matrizes são pré tratadas afim de manter os microrganismos internos em níveis mais baixos possíveis, enquanto os externos devem ser totalmente eliminados. Isto auxilia a produção *in vitro* (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Para evitar o ataque de certos microrganismos, são empregados fungicidas e antibióticos, mas seu uso tem sido limitado devido a sua toxicidade para as plantas (LONDE *et al.*, 2007). O uso de fungicidas foliar sistêmico a base de benomyl, não apresenta problemas de toxicidade para as plantas, desde que respeite as recomendações de uso (LONDE *et al.*, 2007).

Outra forma prevenir o ataque destes microrganismos é com a utilização de hipoclorito de sódio. O hipoclorito de sódio reage com a água liberando ácido hipocloroso, que penetra na célula dos microrganismos liberando oxigênio, no qual oxida componentes do protoplasma, levando a morte deste microrganismo indesejável (RUI *et al.*, 2011). Pereira *et al* (2011) avaliando a desinfestação e o estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeiras “Grande Naine” em diferentes concentrações de hipoclorito, obtiveram redução na contaminação de bactérias e fungos. Já Almeida *et al* (2008), avaliando a desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus Dunnii* visando estabelecimento *in vitro*, observou uma menor contaminação de bactérias e fungos após a desinfecção. No mesmo trabalho, observou-se uma maior porcentagem de sobrevivência dos explantes nas concentrações de 1,5 e 2% de hipoclorito de sódio. Isto demonstra o potencial de utilização do hipoclorito de sódio na desinfestação de explantes.

Metodologia

Os propágulos utilizados foram oriundos de minijardim clonal do clone AEC1528 (híbrido controlado de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*), cedidos pela empresa APERAM bioenergia, localizada na cidade de Itamarandiba – MG e que foram conduzidas Laboratório de Melhoramento Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), situado no município de Diamantina, Minas Gerais, as mesmas possuíam aproximadamente 13 cm de altura, com aproximadamente 3 segmentos nodais com as gemas axilares. Realizou-se a desinfestação, os explantes foram separados em dois lotes, onde, um lote foi submetido a imersão em solução contendo o fungicida Cuprocarb 500[®] na concentração 1 g L⁻¹, durante 15 minutos e o segundo lote foi submetido a imersão em água destilada e autoclavada. Posteriormente, o primeiro lote passou por enxágue com água destilada e autoclavada (3x). Em seguida, os explantes dos dois lotes foram submersos em álcool 70% por 30 segundos. Com tudo, os explantes dos dois lotes foram fracionados a metade, onde receberam um tratamento adicional, que consistiu na imersão em solução de hipoclorito de sódio nas concentrações 2,5% e 5%, ambas durante um período de 5 minutos, sendo adicionadas 4 gotas detergente Tween 20 para cada 100 ml de solução, a fim de quebrar a tensão superficial. Logo em seguida, os explantes foram lavadas com água destilada e autoclavada (6x).

Os explantes foram inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), após a introdução, os explantes foram acondicionados em condição de escuro por um período de 7 dias e após este período foram transferidos para sala de crescimento, com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 2, sendo com o uso ou não do fungicida Cuprocarb 500[®] combinado com duas concentrações de hipoclorito de sódio (2,5% e 5%), com 3 repetições e 12 explantes por repetição, com um explante por tubo de ensaio. Foi-se avaliado, o nível de contaminação dos explantes, variando de 1 (explantes isentos de contaminação) à 5 (explantes totalmente contaminados), e a emissão de brotações que ocorreram após 14 dias de inoculação. A análise estatística foi realizada por meio do software R 3.5.0. Para fins de validação da análise de variância, foi verificado o atendimento das pressuposições (independência dos resíduos, normalidade dos resíduos e homogeneidade dos resíduos), verificado as pressuposições e caso

válidas, realizou-se a análise de variância com os possíveis desdobramentos, e testes de médias utilizando o pacote ExpDes.pt aquietado por Ferreira *et al.*, 2018.

Resultados e Discussões

Os resultados obtidos, mostram-se insatisfatórios quanto a redução da contaminação dos explantes e que a mesma, de modo geral foi alta, de acordo com a análise de variância (Tabela 1), houve efeito significativo para a interação entre os tratamentos com fungicida e concentrações de hipoclorito de sódio, e para o fator fungicida isoladamente, porém não existindo diferenças significativas entre as concentrações de hipoclorito. O resultado do teste de médias para as variáveis estudadas estão apresentados na (Tabela 2).

Tabela 1 – Análise de variância dos níveis de contaminação de explantes de *Eucalyptus* em função dos tratamentos com fungicida e hipoclorito de sódio.

Quadro de análise de variância					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
trat	1	11.674	116.736	125.154	0.000548*
hipo	1	2.007	20.069	21.517	0.144658 ^{ns}
trat*hipo	1	3.674	36.736	39.385	0.049147*
Residuo	140	130.583	0.9327		
Total	143	147.937			
CV (%):	21.56				

(*) Valores de F significativos para alfa igual a 5% de probabilidade. (^{ns}) Valores de F não significativos para alfa igual a 5% de probabilidade. trat: Tratamentos; hipo: Hipoclorito de sódio.

Tabela 2 - Médias dos níveis de contaminação fúngica e bacteriana, de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* com 14 dias de cultivo *in vitro*, analisados pelo teste de Tukey a 5% para os tratamentos com fungicida e sem fungicida nos níveis de hipoclorito de sódio (2,5% e 5%).

	hipo 2,5%	hipo 5%
Com fungicida	4,47 aA	3,91 bB
Sem fungicida	4,72 aA	4,80 aA

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

Os resultados obtidos, nos mostram que mesmo havendo uma significativa contaminação dos explantes, ainda existe diferenças entre os tratamentos. Desta forma o tratamento sem o fungicida Cuprocarb (1g/L), como esperado, não contribuiu

significativamente com a redução da contaminação. Porém, com a utilização do fungicida, associado à concentração de 2,5% e 5% houve uma pequena redução da contaminação. Observa-se que a utilização do fungicida com 2,5% de hipoclorito, não diferiu estatisticamente do tratamento onde não há a presença do fungicida.

O tratamento fitossanitário preventivo assume grande importância no que diz respeito a redução da contaminação dos explantes *in vitro*, pois possui como objetivo manter os possíveis contaminantes exógenos e endofíticos em baixos níveis, assim tornando a etapa de desinfestação em laboratório menos onerosa e favorecendo uma maior assepsia do material vegetativo. Grattapaglia e Machado (1998) ressaltam que a não adequação de um protocolo de desinfestação, não o invalida, desta forma torna-se necessário a utilização de diferentes concentrações. Outra maneira, a fim de reduzir a contaminação seria a utilização das mesmas substâncias em outras fases do processo, como no acondicionamento pós coleta, transporte, além do aumento das concentrações e do tempo de imersão dos explantes à essas substâncias.

A emissão de brotação foi considerada baixa. Do total de 144 explantes, apenas 1,38% emitiram brotações e apenas 2,08% não apresentaram contaminações, ressalta-se que os explantes que emitiram brotações, todos estavam com um certo nível de contaminação, desta forma, observa-se que a contaminação não se configura como o único agente inibidor da formação de brotações. Uma outra explicação para a alta contaminação dos explantes, pode ser devido ao fungicida e ao hipoclorito atuarem apenas externamente (contato), desta forma não promovendo uma desinfestação no interior dos explantes, como alguns outros fungicidas sistêmicos.

Conclusões

Os tratamentos empregados neste trabalho não se mostraram eficientes para promover uma assepsia adequada para segmentos nodais de *E. grandis* x *E. urophylla* a fim de se estabelecer um cultivo *in vitro*, os que forma tratados com fungicida e hipoclorito na concentração de 5% apresentou maior controle da contaminação.

Se faz necessário a utilização de outros métodos a fim de se estabelecer uma cultura *in vitro* utilizando segmentos nodais de *E. grandis* x *E. urophylla*.

Referências

ALMEIDA, J. R.; MARTINS, C. R.; DUTRA, L. F. Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunni* visando estabelecimento *in vitro*. *Revista da FZVA*, v. 15, n. 1, p. 54-60, 2008.

BORGES, S. R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; LOPES, A. P.; OTONI, W. C.; TAKAHASHI, E. K.; MELO, L. A. Estabelecimento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. *Ciência Florestal*, 22(3): p. 605-616, 2012.

BRISOLAL, S. H.; DEMARCO, D. Análise anatômica do caule de *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* e *E. grandis* x *urophylla*: desenvolvimento da madeira e sua importância para a indústria. *Sci. For.*, Piracicaba, v. 39, n. 91, p. 317-330, set. 2011.

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.

LONDE, L. N.; SOUSA, C. S.; VIEIRA, C. U.; BONETTI, A. M.; KERR, W. E. Efeito de benomyl e identificação de fitopatógenos em meio MS para controle da contaminação na micropropagação de *Anacardium humile* (Anacardiaceae). *Bioscience Journal*, 23(3): p. 94-100, 2007.

MACHADO, M. P.; DESCHAMPS, C.; BIASI, L. A. Application of IBA on *in vitro* and *ex vitro* rooting microcutting of *Lavanda angustifolia* Miller. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 4(2): p.153-161, 2013.

MAFIA, R. G.; MARCHESI, H. P.; AUN, C. P. Avaliação de clones de eucalipto para resistência à ferrugem em condições de micropropagação. *Revista Árvore*, 36(5): p. 843-849, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. v.15, n.3, p.473-497, 1962.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, v.33, n. 76, p. 445-460, out./dez. 2013.

OLIVEIRA, M. L.; XAVIER, A.; PENCHEL FILHO, R. M.; OTONI, W. C.; TEIXEIRA, J. B. Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária. *Revista Árvore*, 35(6): p. 1207-1217, 2011.

PEREIRA, G. A.; CORREA, L. S.; BOLIANI, A. C. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de explantes de bananeira ‘Grande Naine’ em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. 222-226, Outubro de 2011.

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em frutíferas do Cerrado. *Ciência Rural*, 41(7): p. 1136-1142, 2011.

RUI, B. R.; ANGRIMANI, D. S. R.; CRUZ, L. V.; MACHADO, T. L.; LOPES, H. C. Principais métodos de desinfecção e desinfetantes utilizados na avicultura: revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. Paraná. Número 16, Periódicos Semestral, Janeiro de 2011.

SOUSA, G. C.; CLEMENTE, P. L.; ISAAC, V. L. R.; FARIA, S. P.; CÁSSIA CAMPOS, M. R. C. Contaminação Microbiana na Propagação *in vitro* de *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crista*. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 405-407, jul. 2007.