

**DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS DE *EUCALYPTUS*
*DUNNIIVISANDO ESTABELECIMENTO IN VITRO***

**DISINFESTATION OF NODAL SEGMENTS OF *EUCALYPTUS DUNNII*
AIMING AT ESTABLISHMENT *IN VITRO***

Juliana Rodrigues de Almeida¹, Carlos Roberto Martins² e Leonardo Ferreira Dutra³

RESUMO

A espécie *Eucalyptus dunnii* apresenta potencial econômico e técnico de exploração na metade sul do Rio Grande do Sul. Esta espécie tem como característica produzir poucas sementes, o que dificulta sua propagação. A cultura de tecidos oferece grande potencial para a propagação *in vitro* de espécies lenhosas. A micropropagação só pode ocorrer se o processo de desinfestação obtiver sucesso. O objetivo deste trabalho foi avaliar e adequar o processo de desinfestação de segmentos nodais pertencentes à espécie *Eucalyptus dunnii*. Foram realizados tratamentos com hipoclorito de sódio (NaClO) á 0%; 0,5%; 1,0%; 1,5% e 2,0% de cloro ativo. As avaliações nos tratamentos foram em relação as contaminações fúngicas e bacterianas; oxidações; sobrevivência e o estabelecimento dos explantes. Observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos, porém, os níveis de contaminações diminuíram quando submetidos nas diferentes variações de concentração de (NaClO) em relação ao tratamento testemunha. Pode-se verificar que os explantes submetidos nas concentrações de 1,5% e 2,0% de (NaClO), obtiveram melhores resultados quando comparados aos demais tratamentos.

Palavras-chave: micropropagação, assepsia, eucalipto.

ABSTRACT

The species *Eucalyptus dunnii* presents economic potential and technician of exploration in the south half of Rio Grande do Sul. This species has as characteristic to produce few seeds, what it makes it difficult its propagation. The fabric culture offers to great potential for the propagation *in vitro* of woody species. The micropropagation alone can occur

¹. Acadêmica, Ciências Biológicas, FAFIUR, PUCRS-Campus Uruguaiana, E-mail: juliana_bios@yahoo.com.br

². Eng" Agr" Dr. Pro!", FZVA, PUCRS-Campus Uruguaiana, E-mail: carlos.martins@pucrs.br

³. Pesquisador, Embrapa Floresta. Colombo- PR, E-mail: leo@cnpf.embrapa.br

if the disinfection process to get success. The objective of this work was to evaluate and to adjust the process used for the disinfection of nodal segments pertain the species *Eucalyptus dunnii*. Had been carried through treatments varying the concentration of hypochlorite of sodium (NaClO) 0%, 0,5%; 1,0%; 1,5% and 2,0% of active chlorine. The evaluations in the treatments had been in relation the fungal and bacterial contaminations; oxidations; survival and the establishment of the explantes. It was observed that it did not have significant difference between the treatments, however the levels of contaminations had diminished when submitted in the different variations of concentration of (NaClO) in relation to the treatment it testifies. It can be verified that the explantes submitted in the concentrations of 1,5% and 2,0% of (NaClO), had gotten better resulted when comparative to the too much treatments.

Key Words: micropropagation, asepsis, eucalipto.

INTRODUÇÃO

Tendo em vista, o crescente uso dos recursos naturais florestais, é cada vez mais premente a necessidade de se buscar novas alternativas de madeira para abastecimento das indústrias do setor madeireiro (NISGOSKI *et al.*, 1998). A cultura do eucalipto está sendo muito utilizada no Brasil, principalmente na região Sul, onde seu plantio já é bastante intensificado (ALFENAS *et al.*, 2004; SILVICULTURA DO EUCALIPTO, 2006).

As características florestais da espécie *Eucalyptus dunnii* vêm mostrando-se promissora para o cultivo de eucaliptos na metade sul do Rio Grande do Sul, devido esta espécie suportar áreas com geadas intensas e severas, e também por apresentar baixo potencial de bio-invasão, pois produz poucas sementes o que dificulta sua propagação aleatória (SOUZA *et al.*, 2003;

BILLARD & LALLANA, 2005). A característica de produzir poucas sementes praticamente dificulta seu cultivo, pelo custo oneroso na obtenção de sementes e propagação da espécie.

O cultivo *in vitro* é um método viável para propagação clonal e massal de diversas espécies florestais. No entanto, um dos maiores entraves no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas, está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminações provocadas por fungos e bactérias e ainda por oxidações provocadas por compostos fenólicos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; THORPE *et al.*, 1991).

A micropropagação, baseia-se no fenômeno da totipotência das células vegetais, ou seja, cada célula possui a capacidade de gerar uma nova planta quando essa for submetida a condições eSpeCiaIS, permitindo deste modo à

manutenção plena das características da planta-mãe, de modo uniforme, de rápido crescimento e matéria-prima homogênea, uma vez que é possível obter várias cópias geneticamente idênticas de um mesmo indivíduo, livre de contaminações (GAMBORG & SHYLUCK, 1981; CALDAS *et al.*, 1990).

A desinfestação de segmentos nodais em espécies lenhosas é a primeira etapa a ser considerada para a realização de ótimo estabelecimento *in vitro* (PIERIK, 1990). Os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo. No entanto, mesmo as plantas submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação são fontes potenciais de microorganismos, que podem tomar-se limitantes aos procedimentos de cultivo *in vitro* (MEDEIROS, 1999).

Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar e adequar o processo de desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* visando seu estabelecimento *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e

Agronomia da PUCRS Campus Uruguaiana.

A partir das plantas matrizes mantidas em estufa climatizada, foram retirados os explantes, e só então aplicados os processos de assepsia.

Seguindo a metodologia de TEIXEIRA (2001), inicialmente os explantes foram colocados em água corrente durante trinta minutos; depois, colocados em hipoclorito de sódio (NaClO) por dez minutos, adicionados por três gotas Twenn, ao final lavados em água destilada esterilizada por quatro vezes. Essa etapa foi realizada dentro da câmara de fluxo laminar para que fosse evitado que algum tipo de contaminação pudesse ocorrer durante o processo. Foram realizados tratamentos variando a concentração de hipoclorito de sódio a 0%; 0,5%; 1,0%; 1,5% e 2,0% de cloro ativo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 24 repetições perfazendo 120 explantes. As avaliações foram realizadas ao final de 30 dias e avaliadas as contaminações fúngicas e bacterianas, determinadas por avaliação visual da presença de fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante. A oxidação foi avaliada partir da visualização de tecidos oxidados. A sobrevivência foi avaliada pela análise visual dos explantes sadios. O estabelecimento dos explantes foi determinado naqueles que apresentaram

condições visuais de multiplicação.

Os dados foram submetidos ao Teste Qui-quadrado (X^2) com auxílio do pacote *proc genmod* do programa SAS. Para melhor visualização dos resultados, os dados originais foram transformados em porcentagens.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* foi fundamental para evitar e/ou reduzir as contaminações provocadas por fungos e bactérias (Figuras 1 e 2). Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998) e CORRÊA *et al.* (2005), o processo de desinfestação dos explantes é fator fundamental para as demais etapas do estabelecimento *in vitro*.

Pode-se observar na Figura 1, que as diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO) utilizadas, promoveram menor nível de contaminação bacteriana em relação ao TI (0% de hipoclorito de sódio). Não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações utilizadas de (NaClO) na contaminação bacteriana.

Em relação às contaminações fúngicas, as concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO) também não apresentaram diferenças significativas nas porcentagens de contaminação. Porém no tratamento

testemunha houve maior contaminação fúngica (Figura 2).

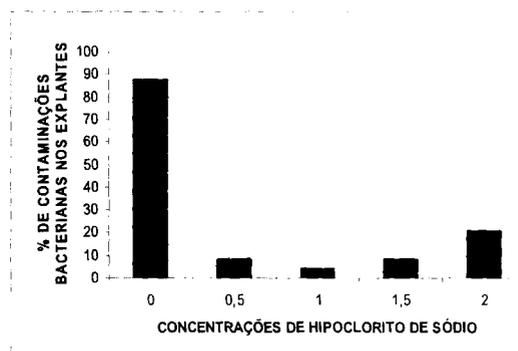


Figura 1 - Porcentagem de contaminações bacterianas presentes nos explantes, sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.

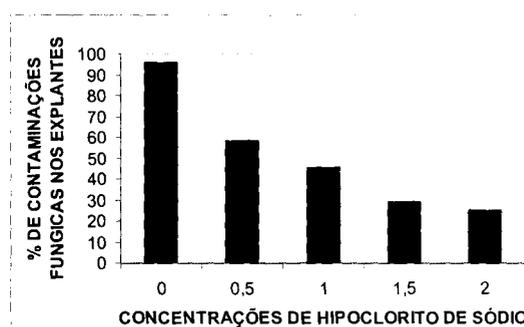


Figura 2 - Porcentagem de contaminações fúngicas presentes nos explantes, sob diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.

Os resultados das altas porcentagens de contaminações bacterianas e fúngicas para o TI, estão de acordo com os autores TEIXEIRA (2001) e ALFENAS *et al.* (2004), que recomendam o processo de desinfestação com hipoclorito de sódio em concentrações de 0,5% a 2,0% dependendo da espécie, para combater contaminações fúngicas ou bacterianas provenientes da planta matriz.

Em relação à oxidação, observa-se uma variação nos explantes de *Eucalyptus dunnii* oxidados em função dos tratamentos. Onde os tratamentos com 0% e 1% de hipoclorito de sódio apresentaram maiores porcentagens de oxidações. Enquanto os demais tratamentos não evidenciaram diferenças significativas. Possivelmente, os fatores que podem ter contribuído para esta variação são os procedimentos de manuseio de forma lenta com os explantes dentro do fluxograma (Figura 3).

De acordo com GEORGE, (1993) a concentração e o tempo de exposição aos desinfetantes dependem do material vegetal e diferentes partes da planta apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos. Uma desinfestação eficiente elimina os microorganismos e não causa danos ou morte aos tecidos.

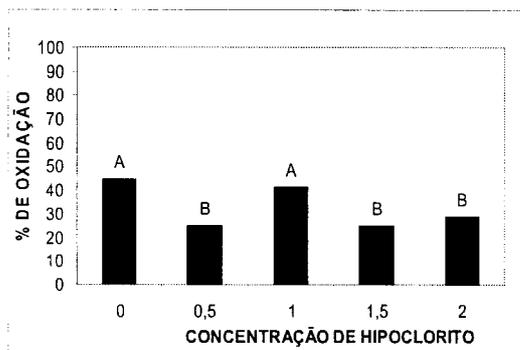


Figura 3 - Porcentagem de oxidação nos explantes em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. (letras A e B representam a variação nos tratamentos).

Segundo ERIG & SCHUCH (2005) a sobrevivência dos segmentos nodais é

indicada pela coloração verde do explante. Entretanto, a alta porcentagem de sobrevivência dos segmentos nodais nem sempre podem ser usadas como indicativo de que haverá o estabelecimento de plantas a partir destes explantes. Muitas vezes os tecidos dos segmentos nodais continuam vivos (de coloração verde), no entanto, não emitem folhas ou brotos, isto é, não se estabelecem *in vitro*, o que pode ser justificado pelo grau de desenvolvimento da gema do explante. Neste experimento, a porcentagem de sobrevivência também deu lugar à porcentagem de estabelecimento, quando foram submetidos aos tratamentos com 1,5% e 2,0% de concentração de hipoclorito de sódio (Figura 4).

Nas concentrações de 1,5% e 2,0% de (NaClO), foram visíveis a sobrevivência e o estabelecimento dos segmentos nodais (Figuras 5 e 6).

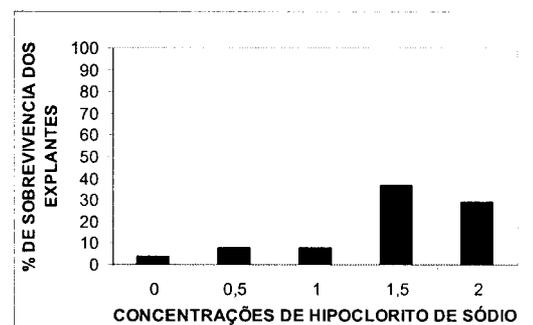


Figura 4 - Porcentagem de sobrevivência dos explantes nas diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.



Figura 5 - Sobrevivência do explante.

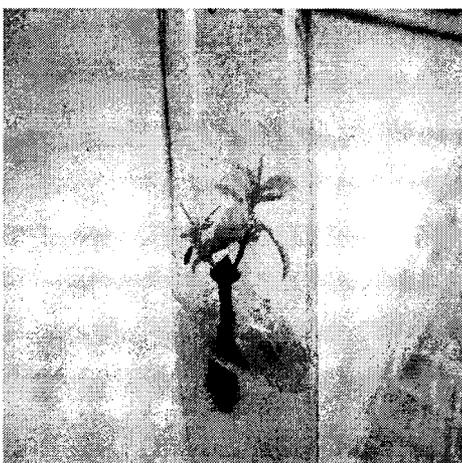


Figura 6 - Estabelecimento sadio dos segmentos nodais.

CONCLUSÕES

Verificou-se que o processo de desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* apresentou melhores resultados nas concentrações de 1,5% e 2,0% de hipoclorito de sódio (NaClO), onde obtiveram-se maiores porcentagens de explantes estabelecidos.

REFERENCIAS

ALFENAS, X.C.; ZUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa, MG, UFV, p.20-157, 2004.

BILLARD, C.S., LALLANA, V.H. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. Ciencia, Docência y Tecnologia, n. 30, Ano XVI, mayo 2005.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCPT, EMBRAPA-CNPQ 1990. p. 37-70.

CORRÊA, L.R.; PAIM, O.C., SCHW AMBACH, J.; NETTO, A.G. Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus* Labill. Plant Growth Regulations, p.63 -73,2005.

ERIG, X.C., SCHUCH, M.W. Estabelecimento *in vitro* de Mirtilo a partir de segmentos nodais. Scientia Agrária, v.6, n.I-2, p.91-96, 2005.

GAMBORG, L.; SHYLUCK, J.P. Nutrition, media and charateristics of plant ceil and tisse cultures In: THORPE, T.O. Plant tisse culture methods and
Revista da FZVA.
Uruguaiiana, v.15, n.I, p. 54-60. 2008

aplications in agriculture. New York: Academic Press, p.21-44, 1981.

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, I, p. 183-260.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: the teehnology.** Edington: Exegetics Limited, 1993.574 p. (v. 1).

MEDEIROS, C.P.c. **Indução *in vitro* de respostas morfogênicas em explantes nodais de eajazeira (*Spondias mombin* L.).** 1999. 79f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

NISGOSKI, S.; MUNIZ, G.I.B.; KLOCK, U. Caracterização Anatômica da Madeira de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. **Ciência florestal**, Santa Maria, v.8, n.1, p.67-76, 1998.

PIERIK, R.L.M. Vegetative propagation. **In: *In vitro* culture of higher plants.** [S.l.]: Intenational Association for Plant Tissue Culture, 1990. p.183-230.

Silvicultura do eucalipto (*Eucalyptus* ssp).

Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=/florestal/index.html&conteudo=/florestal/eucalipto.html#c>>

Acesso em: 2 mar. 2006.

SOUZA, L.J.B.; SOARES, R.V.;BATISTA, AC. **Modelagem do material combustível em povoamentos de *Eucalyptus dunnii*, em Três Barras, Se. Cerne**, Lavras, v.9, n.2, p.231-245, jul./dez.2003.

TEIXEIRA, IB. **Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhos as.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, simpósios, 2001.

THORPE, T.A; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. **In:** DEBERGH, P.c.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and aplication.** Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.