



Revista Agrária Acadêmica

[Agrarian Academic Journal](#)

Volume 2 – Número 6 – Nov/Dez (2019)



doi: 10.32406/v2n62019/118-127/agrariacad

Estabelecimento *in vitro* de dois híbridos de eucalipto sob diferentes concentrações de ágar. *In vitro* establishment of two eucalyptus hybrids under different concentrations of agar

[Ari Medeiros Braga Neto](#)¹, [Lauana Lopes dos Santos](#)^{2*}, [Ramony Cristina Lima](#)¹, [Márcio Takeshi Sugawara](#)³, [Bruno Oliveira Lafetá](#)³, [Alisson José Eufrásio de Carvalho](#)³, [Enilson de Barros Silva](#)¹

1- Departamento de Agronomia/Centro de Ciências Agrárias/Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

2*- Departamento de Agronomia/Centro de Ciências Agrárias/Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM - Diamantina/MG - Brasil - lauanasantos@gmail.com

3- Departamento de Ciência Agrárias/Centro de Ciências Agrárias/Instituto Federal de Minas Gerais, *Campus* São João Evangelista - IFMG, São João Evangelista/MG - Brasil

Resumo

O objetivo deste estudo foi a avaliação do estabelecimento *in vitro* de dois híbridos de eucalipto (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) sob diferentes concentrações de ágar, a fim de obter uma concentração que proporcione melhor desempenho dos híbridos. O estabelecimento *in vitro* foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições, no esquema fatorial 4 x 2, sendo estudado o efeito de quatro concentrações de ágar bacteriológico (0; 3; 6 e 12 g L⁻¹) sobre dois híbridos de eucalipto, em meio de cultura MS. Aos 30 dias após a inoculação, registraram-se a presença de folhas, pecíolo, broto, calo, oxidação do meio, oxidação do explante e as incidências de *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e bactérias. A concentração de ágar que proporcionou melhor estabelecimento dos explantes encontra-se no intervalo entre 7,25 e 7,94 g L⁻¹ de ágar.

Palavras-chave: Explante, micropropagação, meio de cultivo

Abstract

The objective of this work was to evaluate the *in vitro* establishment of two eucalyptus hybrids (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) under different concentrations of agar in order to obtain a concentration that provides better performance of the hybrids. The *in vitro* establishment was performed in a completely randomized experimental design with four replicates, in the factorial scheme 4 x 2, and the effect of four bacteriological agar concentrations (0, 3, 6 and 12 g L⁻¹) on two eucalyptus hybrids, in MS culture medium. At 30 days after inoculation, the presence of leaves, petiole, bud, callus, oxidation of the medium, explant oxidation and the incidence of *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. and bacteria were recorded. The concentration of agar that provided the best establishment of the explants is in the range of 7,25 to 7,94 g L⁻¹ of agar.

Keywords: Explant, micropropagation, growing medium

Introdução

A micropropagação é uma técnica que consiste no cultivo *in vitro*, ou seja, é a propagação de órgãos, tecidos ou células vegetais dentro de tubos de ensaios ou similares de vidro, com a devida assepsia, nutrição e fatores ambientais adequados (TAMBOSI; ROGGE-RENNE, 2010).

Os estádios de desenvolvimento da propagação *in vitro* são constituídos de fases que incluem desde o manejo das plantas matrizes, seleção dos explantes mais adequados, obtenção de uma cultura livre de contaminantes, até a multiplicação de propágulos vegetativos, enraizamento e aclimatação das mudas obtidas na condição *ex vitro* (DUTRA et al., 2009; BORGES et al., 2012).

O estabelecimento *in vitro* é o ponto mais crítico da micropropagação para a maioria das plantas lenhosas, devido à dificuldade de resposta dos propágulos vegetativos à propagação clonal, da oxidação fenólica dos explantes e das maiores taxas de contaminação por fitopatógenos (DUTRA et al., 2009; BORGES et al., 2012; XAVIER et al., 2013). Neste sentido, o sucesso de um protocolo depende claramente do estágio de estabelecimento, visto que, as etapas seguintes e posterior transferência para condições *ex vitro* só podem ser executadas após a garantia de culturas assépticas, com bom vigor vegetativas e com maior número de plantas com gemas axilares pré-existentes no inóculo (GEORGE; DEBERGH, 2008).

Esta forma de cultivo tem grande importância prática na área florestal, e o eucalipto é o gênero florestal que mais possui estudos com essa técnica (DUTRA et al., 2009). Mesmo com suas limitações, a micropropagação dessa espécie tem se mostrado como técnica promissora para viabilizar a clonagem massal de híbridos, assim como auxiliar no processo de produção de mudas em larga escala, livres de doenças, com multiplicação rápida em períodos de tempo e espaço físico reduzido e com grande estabilidade genética (DUTRA et al., 2009; TAMBOSI; ROGGE-RENNE, 2010; BORGES et al., 2012; XAVIER et al., 2013).

Diante do potencial dessa técnica, trabalhos têm sido desenvolvidos no intuito de tornar essa tecnologia acessível e economicamente viável (XAVIER et al., 2013). No entanto, para um bom desenvolvimento do explante *in situ* é necessário que o mesmo seja inoculado em um meio de cultura contendo água e sais suficientes para o seu desenvolvimento, sendo que o mais usado é o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), que contém macronutrientes tais como fósforo, magnésio, e micronutrientes como manganês, cobre e outros. A sacarose também é essencial para o crescimento das plantas, pelo fato dos processos fotossintéticos realizados por plantas mantidas *in vitro* serem limitados (TAMBOSI; ROGGE-RENNE, 2010; LENCINA et al., 2014). Os agentes gelificantes, polissacarídeos de alto peso molecular, são necessários no meio de cultura para dar sustentação aos explantes (LENCINA et al., 2014). Por outro lado, estudos afirmam que os meios líquidos possuem a vantagem de preparo mais rápido e mais barato do que os sólidos, além de favorecerem a absorção de nutrientes e minerais pelas plântulas, viabilizando o crescimento vegetativo (CALDAS et al., 1998; PASQUAL et al., 2008).

A concentração de ágar deve ser otimizada no preparo do meio de cultura, uma vez que ele é o componente com custo mais elevado (PASQUAL et al., 2008), e sua concentração e qualidade afetam as características químicas e físicas do meio, e conseqüentemente as respostas do explante *in vitro* (REZENDE et al., 2008). Altas concentrações dessa substância podem afetar ou até inibir a disponibilidade e a difusão dos demais componentes, além de apresentar efeito marcante sobre o potencial matricial do meio de cultura, tornando o crescimento do explante lento (COUCEIRO et al., 2001; CID; TEIXEIRA, 2010; LENCINA et al., 2014). A ausência ou baixas concentrações de ágar

no meio de cultura também podem limitar a sustentação e desenvolvimento do explante (PAIVA et al., 1999). No entanto, os meios de culturas existentes apresentam-se com formulações fixas, concentrações de componentes pré-estabelecidas independentemente do tipo da cultura e sem levar em conta o custo no cultivo.

Estudos atestam que não há necessidade de uso de produtos solidificantes na composição do meio de cultura para a propagação *in vitro* de algumas cultivares de banana (ANDRADE et al., 2011) e que o meio líquido ou sólido não influencia no desenvolvimento da *Pimpinella anisum* (TAMBOSI; ROGGE-RENNE, 2010). Contudo, o crescimento das mudas de tangerina foi reduzido com o aumento das concentrações dessa substância solidificante (PASQUAL et al., 2002). Por outro lado, em meio MS, foram as altas concentrações de ágar que propiciaram maior desenvolvimento dos eixos embrionários de urucu (*Bixa orellana* L.) (LIMA et al., 2007).

Apesar da identificação da concentração ótima de ágar para o crescimento de plantas estabelecidas *in vitro* ser determinante para a obtenção de protocolos confiáveis de micropropagação, não há referências de estudos com essa abordagem para híbridos de eucaliptos. Nesse sentido, objetivou-se com o presente trabalho, avaliar qual a concentração de ágar mais favorável no estabelecimento *in vitro* de dois híbridos de eucalipto (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*), como forma de obter condições que proporcione melhor desempenho dos híbridos em questão, obtendo-se, assim, um menor custo no cultivo.

Material e métodos

O estudo foi realizado no Instituto Federal de Minas Gerais, *Campus* São João Evangelista (IFMG/SJE), no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais.

Foram obtidas 10 mudas de cada híbrido de eucalipto, *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, produzidas via miniestaquia junto à empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA). As mudas foram transferidas para vasos de polietileno (capacidade de 25 litros) preenchidos com substrato comercial a base de casca de pinus e serragem, sendo mantidas por 60 dias em casa de vegetação coberta com tela de malha para 50 % de sombra, irrigadas por gotejamento (a cada duas horas, por 10 minutos). Após o período em casa de vegetação as mudas foram mantidas a céu aberto no viveiro por 105 dias, sob irrigação por aspersão (a cada duas horas, seis vezes ao dia por 10 minutos, com aspersor de vazão $0,66 \text{ L min}^{-1}$).

Após o período de permanência em céu aberto, as mudas foram levadas para casa de vegetação, onde permaneceram isoladas do ambiente externo por 21 dias, sob irrigação localizada, via regador manual (2 L planta^{-1} , duas vezes ao dia). Ainda neste local, visando a desinfecção inicial do material, aplicou-se uma mistura com $2,4 \text{ g L}^{-1}$ de fungicida Orthocide 500® (Captan, 50,0% de princípio ativo) e 10 ml L^{-1} de óleo mineral Assist®, como descrito por Borges et al. (2012).

A coleta do material propagativo foi feita em mudas sadias, livres de fitopatógenos, com altura entre 1,10 a 1,40 m e diâmetro do colo entre 2 a 3 cm. Com o auxílio de tesouras esterilizadas as brotações foram retiradas das plantas mães e colocados em caixas plásticas devidamente higienizadas, para condução até o laboratório. Cada caixa continha cerca de 20 gotas de água sanitária (2,5 % de cloro ativo) diluídas em 2 litros de água para auxiliar no processo de desinfecção do material.

Fora da câmara de fluxo laminar o material coletado foi transferido para um becker e lavados por cinco vezes em água deionizada. Em seguida, imersos em solução fungicida (Cercobim 700 WP a base de tiofanato -1 g L^{-1}) por 15 minutos, enxaguados com água deionizada por cinco vezes, seguido de imersão em álcool 70 % por 30 segundos.

Já dentro da câmara de fluxo laminar, foi feita a desinfecção do explante com imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1 % + detergente Tween 20 (2 gotas em 100 mL de água) por 15 minutos, seguido de enxague do material em água deionizada e autoclavada por cinco vezes. O material foi deixado em água deionizada até o início dos procedimentos de inoculação para evitar desidratação. No mesmo ambiente, obtiveram-se segmentos caulinares de 1,5 cm de comprimento contendo um nó e uma gema axilar.

O meio de cultivo utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado por 30 g L⁻¹ sacarose, 800 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona30 (PVP-30), 100 mg L⁻¹ de Mio-inositol, de 0,50 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,3 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) conforme Dutra et al. (2009). O meio de cultura teve seu pH ajustado para 5,75 ± 0,05 com NaOH (0,1 mol L⁻¹) e HCl (0,1 mol L⁻¹) e distribuído em tubos de ensaio de 15 ml. Em seguida, os mesmos foram autoclavados por 20 minutos à temperatura de 121°C e pressão de 1 atm. A inoculação foi feita na câmara de fluxo laminar, sendo um segmento caulinar por tubo de ensaio, seguido de vedação com papel alumínio e filme plástico. Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de cultura por sete dias no escuro, seguido de fotoperíodo de 16 horas luz a 25 ± 2 °C.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, no esquema fatorial 4 x 2, sendo estudado o efeito das quatro concentrações de ágar no estabelecimento *in vitro* de dois híbridos de eucalipto (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*). Cada unidade experimental foi constituída por 8 tubos de ensaio (20 x 150 mm), contendo cerca de 15 ml do meio de cultura por tubo. As concentrações de ágar empregadas foram distribuídas da seguinte forma: tratamento 1 (T1): meio de cultura MS com concentração de 0 g L⁻¹; tratamento 2 (T2): meio de cultura MS com concentração de 3 g L⁻¹; tratamento 3 (T3): meio de cultura MS com concentração de 6 g L⁻¹ e tratamento 4 (T4): meio de cultura MS com concentração de 12 g L⁻¹.

Aos 30 dias após a inoculação, as plântulas foram avaliadas quanto ocorrência ou não de folhas, pecíolo, broto, calo, oxidação do meio, oxidação do explante e quanto a presença ou não dos fungos *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp., e de bactérias.

Os dados foram expressos em porcentagem e transformados em “arcseno ($\sqrt{x}/100$)” para atender às premissas de normalidade e homogeneidade de variâncias segundo os testes de Lilliefors e Cochran, respectivamente. A análise estatística foi realizada com auxílio do *software* SISVAR, procedendo-se a ANOVA ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$), as médias correspondentes as concentrações de ágar comparadas pelo teste de Tukey e seus efeitos, quando pertinente, analisados por regressão.

Resultados

Aos 30 dias após a inoculação, as mudas dos dois híbridos apresentaram cerca de quatro a cinco pares de folhas definitivas e de três a quatro centímetros de altura, mostrando um bom desempenho das mesmas.

Houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os híbridos de eucalipto e as concentrações de ágar para a presença de folhas e pecíolos. Diferenças significativas entre os tipos de híbridos foram observadas para as oxidações do meio e do explante, além dos brotos e calos. Estes dois últimos e a proliferação de *Fusarium* sp. foram influenciadas pelas concentrações do produto solidificante. Os tratamentos em estudo não interferiram nas proliferações de *Aspergillus* sp. e bacteriana (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância dos atributos avaliados durante o estabelecimento *in vitro* de dois híbridos de eucalipto sob diferentes concentrações de ágar após 30 dias de inoculação.

F.V.	G.L.	Q.M.				
		Folha	Pecíolo	Ox. Meio	Ox. Explante	Fusarium
Híbridos (H)	1	3866,50*	3866,50*	888,21*	971,87*	423,05 ^{ns}
Ágar (A)	3	1013,38*	1013,38*	57,33 ^{ns}	461,84 ^{ns}	556,29*
H x A	3	467,93*	467,93*	70,92 ^{ns}	233,60 ^{ns}	56,55 ^{ns}
Resíduo	24	112,71	112,71	173,46	169,42	118,81
CV _{exp} (%)		66,20	66,20	30,91	70,56	123,69
		<i>Aspergillus</i>	Bactéria	Broto	Calo	
Híbridos (H)	1	120,57 ^{ns}	13,40 ^{ns}	2859,97*	4131,19*	
Ágar (A)	3	49,12 ^{ns}	13,40 ^{ns}	2267,78*	1015,75*	
H x A	3	49,12 ^{ns}	13,40 ^{ns}	337,88 ^{ns}	111,01 ^{ns}	
Resíduo	24	31,26	13,40	129,79	151,56	
CV _{exp} (%)		288,03	565,69	45,68	54,36	

CV_{exp} = coeficiente de variação experimental. H – Híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. A – Concentrações de ágar (0; 3; 6 e 12 g L⁻¹). Ox – Oxidação. *significativo a 5 % de probabilidade. ^{ns} não significativo.

Na Tabela 2 pode-se observar que a presença de folhas e pecíolos no híbrido 1 foram superiores em relação ao híbrido 2. Maior capacidade de estabelecimento *in vitro* do híbrido 1 também é verificado na Tabela 3 que mostra maior formação de brotos e calos, mesmo na presença de oxidação do meio e do explante.

Em geral, os atributos avaliados, folhas, pecíolos, broto, calo, oxidação do meio e do explante, mostraram-se maiores no híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* em comparação ao *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (Tabela 2 e 3).

Tabela 2. Percentagem (%) de folhas e pecíolos de dois híbridos de eucaliptos (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus*. e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) em função de diferentes concentrações de ágar na fase de estabelecimento *in vitro* 30 dias após a inoculação.

Híbrido	Ágar (g L ⁻¹)			
	0	3	6	12
	Folhas (%)			
1	0,00 a	31,25 a	40,63 a	34,38 a
2	0,00 a	0,00 b	6,25 b	9,38 b
	Pecíolo (%)			
1	0,00 a	31,25 a	40,63 a	34,38 a
2	0,00 a	0,00 b	6,25 a	9,38 a

1 - *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus*. 2 - *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade

Tabela 3. Percentagem (%) de oxidação do meio e do explante de dois híbridos de eucalipto (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus*. e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) na fase de estabelecimento *in vitro* 30 dias após a inoculação.

Híbrido	Oxidação do meio	Oxidação do explante	Broto	Calo
1	53,13 a	20,31 a	38,28 a	35,16 a
2	37,50 b	10,16 b	12,50 b	8,59 b

1 - *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus*, 2 - *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade

A percentagem de folhas e pecíolos aumentou no híbrido 1 com o aumento das concentrações de ágar, atingindo o máximo de desempenho na concentração de 7,94 g L⁻¹, havendo, a partir desta concentração, redução da percentagem dos mesmos (Figura 1).

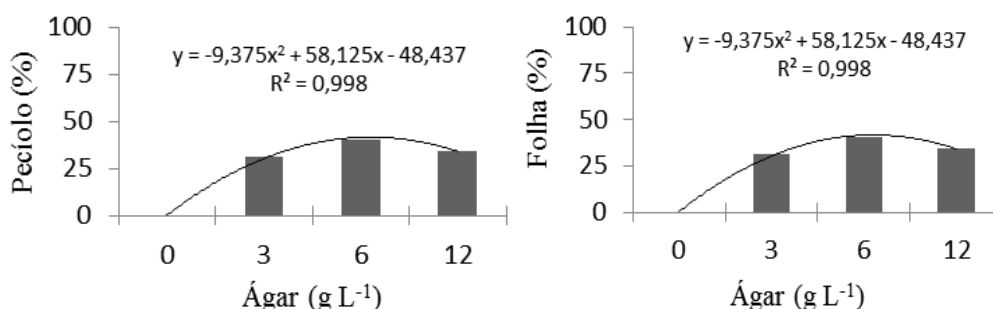


Figura 1. Percentagem e ajuste de regressão da presença de pecíolo e folhas no híbrido 1 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus*), estabelecido *in vitro* sob as diferentes concentrações de ágar 30 dias após a inoculação.

No híbrido 2 não foi observada regressão significativa para a presença relativa de folhas e pecíolo em função das concentrações de ágar.

As maiores percentagens de brotos ocorreram na concentração 7,94 g L⁻¹ de ágar, e de calos em 8,53 g L⁻¹ de ágar (Figura 2).

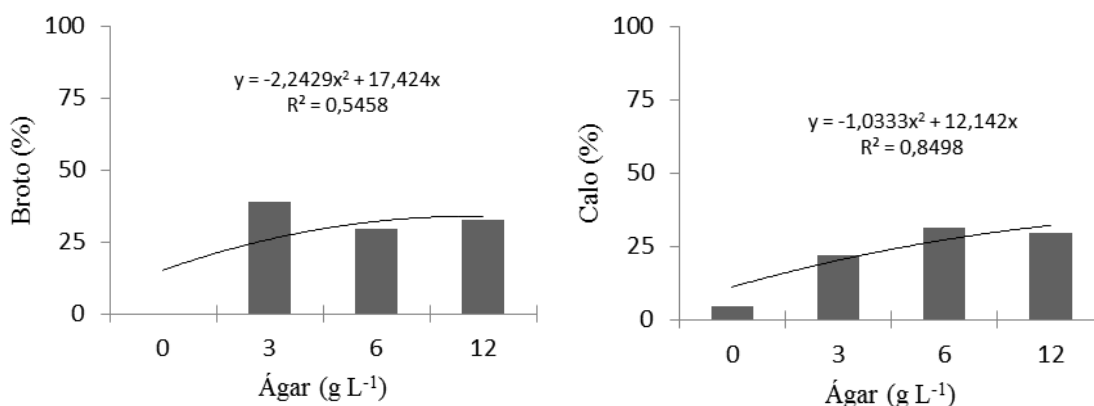


Figura 2. Percentagem e ajuste de regressão da presença de broto e calo no estabelecimento *in vitro* dos híbridos (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*), sob diferentes concentrações de ágar 30 dias após a inoculação.

Não houve infestação de *Fusarium* sp. entre as concentrações de 6 a 8 g L⁻¹ de ágar, sendo que, o valor mínimo estimado de infestação ocorreu na concentração de 7,25 g L⁻¹ de ágar (Figura 3) que é um valor próximo do encontrado para o maior desenvolvimento dos explantes (Figuras 1 e 2). Vale ressaltar que ainda na Figura 3, a utilização da concentração de ágar, acima ou abaixo desse intervalo de 6 a 8 g L⁻¹, apresentou baixa infestação (inferior a 25 %) dos híbridos, no estabelecimento *in vitro*.

Revista Agrária Acadêmica está em Diamantina. 2 min ·

Curtir Página

Estabelecimento in vitro de dois híbridos de eucalipto sob diferentes concentrações de ágar.

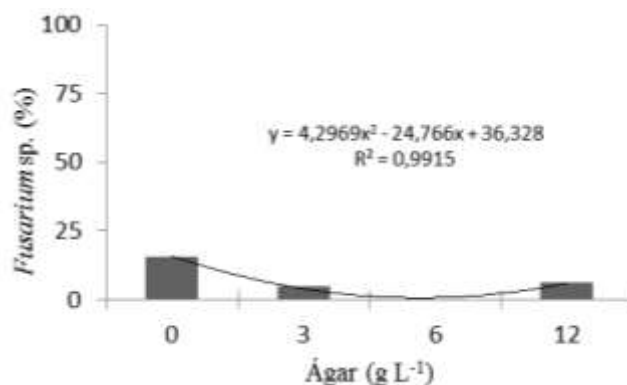


Figura 3. Percentagem e ajuste de regressão da presença de *Fusarium* sp. no estabelecimento *in vitro* dos híbridos (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*), sob diferentes concentrações de ágar 30 dias após a inoculação.

Discussão

O maior desempenho do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* em comparação ao *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (Tabela 2 e 3) indica a diversidade de resposta dos híbridos em relação ao meio de cultivo e concentrações de ágar, mostrando a importância do material genético na propagação vegetativa. O maior desempenho do híbrido 1 pode estar relacionado às características herdadas da espécie *Eucalyptus globulus*, que apresenta menor teor de lignina em sua composição, o que facilita o processo de estabelecimento *in vitro* devido ao aspecto mais tenro.

O híbrido 1, apesar de apresentar melhor desempenho *in vitro*, foi o que apresentou maior percentual de oxidação comparado com o híbrido 2 (Tabela 3). Diferentes tipos de fenóis presentes nos tecidos, ao entrarem em contato com o oxigênio, sofrem reações de oxidação, cujos produtos resultantes são tóxicos, oxidando consequentemente o explante (RODRIGUES et al., 2003). O controle dessa oxidação no cultivo *in vitro*, geralmente é feito através do uso de substâncias antioxidantes, tais como ácido ascórbico, PVP (polivinilpirrolidona), ácido cítrico e DIECA (dietilditiocarbamato), além de menor concentração de sais no meio de cultura (RODRIGUES et al., 2003).

O aumento do número de folhas e pecíolos até a concentração de 7,94 g L⁻¹ de ágar, atingindo o máximo de desempenho, seguido de decréscimo dessas variáveis a partir desta concentração (Figura 1), seguem a mesma tendência dos resultados com embriões imaturos de tangerina ‘Poncã’ em meio MS, obtidos por Pasqual et al. (2002). Possivelmente, o aumento da concentração de ágar promoveu a elevação do potencial osmótico do meio, dificultando a difusão dos nutrientes para os explantes, consequentemente, reduzindo seu desenvolvimento, como observado em embriões de *Coffea arabica* por Rezende et al. (2008).

O máximo desempenho dos explantes na concentração de 7,94 g L⁻¹ de ágar (Figura 2), pode indicar que essa concentração de ágar proporcionou uma superfície mais consistente do meio de cultura e um equilíbrio do potencial osmótico, o que facilitou a difusão dos nutrientes até o explante, e maior percentagem de folhas e pecíolos. Efeitos semelhantes foram observados na concentração de 10 g L⁻¹ de ágar, na germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pêra (*Pyrus calleryana*) (CHAGAS et al., 2010) e em eixos embrionários de urucu (*Bixa orellana* L.) (LIMA et al., 2007). No entanto, o estabelecimento *in vitro* da espécie florestal grábia (*Apuleia leiocarpa*) foi melhor na concentração de ágar 4,0 g L⁻¹ (LENCINA et al., 2014) e para mudas de bananeira Prata-anã concentrações de ágar entre 2,3 a 4,0 g L⁻¹ (COUCEIRO et al., 2001). Diferentes concentrações de ágar não afetaram o estabelecimento da cultura do Crisântemo *in vitro* (PAIVA et al. (1999) e de plântulas de *Pimpinella*

anisum (TAMBOSI; ROGGE-RENNE, 2010). Entretanto, é bom enfatizar que meios líquidos e semi-sólidos apresentam como limitação, a sustentação do explante, ocasionando a formação de brotos invertidos e necessidade de uso de pontes de Heller para a sustentação dos explantes, aumentando a necessidade de mão-de-obra para o cultivo. Já nas concentrações muito elevadas dificulta a penetração do explante devido à rigidez do meio (PAIVA et al., 1999).

A concentração de ágar de 7,94 g L⁻¹ proporcionou maior brotação, assim como a de 8,53 g L⁻¹ proporcionou maior desenvolvimento de calos nos híbridos de eucalipto, com decréscimo à medida que aumenta a concentração de ágar (Figura 2). Em cultivares de *Prunus* sp. foi o meio MS, contendo 5,5 g L⁻¹ de ágar que proporcionou maior número de brotações (RODRIGUES et al., 2003). A redução da porcentagem de brotos à medida que aumentam as concentrações de ágar ocorre provavelmente devido à menor difusão de reguladores de crescimento e de nutrientes no meio, uma vez que concentrações mais elevadas dificultam o contato do explante com o meio (PASQUAL et al., 2008). Por outro lado, na fase de multiplicação, diferentes concentrações de ágar não influenciaram o número de brotações de explantes bananeira Prata-anã (COUCEIRO et al., 2001).

Em geral, a ausência do ágar no meio de cultura dificultou o desenvolvimento dos explantes (Figura 1 e 2). Tal comportamento pode indicar que plantas provenientes de híbridos de eucalipto encontram dificuldade para se desenvolver em meios líquidos (ausência de ágar) ou com baixa concentração de ágar. Os meios líquidos possuem a vantagem de preparo mais rápido e propiciam menor custo do que os sólidos, são mais homogêneos, favorece a absorção de nutrientes minerais e de reguladores de crescimento pelas plântulas, devido ao maior contato do explante com o meio, viabilizando o crescimento vegetativo dos mesmos (CALDAS et al., 1998; PASQUAL et al., 2008; REZENDE et al., 2008). Além disso, qualquer exsudato proveniente do explante é mais facilmente diluído em meio líquido do que em meio com mais solidificado, evitando, o acúmulo de compostos tóxicos (REZENDE et al., 2008). Por outro lado, a concentração de ágar entre 5 a 8 g L⁻¹ é considerada adequada para o crescimento da maioria das espécies (REZENDE et al., 2008), como observado no estabelecimento *in vitro* dos explantes no presente estudo (Figura 1 e 2).

Por se tratar de eventos biológicos, a ocorrência de variações nas respostas das culturas em relação às concentrações de ágar em cultivo *in vitro* é normal acontecer. Essas variações podem estar associadas a outros componentes do meio de cultivo. Normalmente a consistência do meio de cultura depende não só da concentração, mas também da qualidade de ágar utilizado, do pH, do tipo de explante, da concentração de sais e da presença de outras substâncias como o carvão ativado, concentrações de BAP e ANA, os quais interferem no grau de gelificação (PASQUAL et al., 2002; PASQUAL et al., 2008).

Na Figura 4 é possível observar que não houve infestação de *Fusarium* sp. entre as concentrações de 6 a 8 g L⁻¹ de ágar, com a mínima estimada ocorrendo na concentração de 7,25 g L⁻¹ de ágar. O fato do maior desenvolvimento dos explantes ter coincidido com as menores infestações de *Fusarium* sp., pode indicar que o bom vigor dos explantes tenha impedido o desenvolvimento do fungo, que se caracteriza por apresentar um hábito saprófita. Nas menores concentrações de ágar o excesso de umidade pode ter contribuído para uma maior taxa de proliferação do fungo. Em concentrações mais elevadas o meio de cultura já endurecido não proporcionou condições para um bom estabelecimento dos híbridos o que pode ter resultado em morte e início de decomposição dos explantes, sendo esta uma condição ideal para a frutificação e estabelecimento de fungos do gênero *Fusarium* sp. Fungos endofíticos são comuns em explantes vegetais, sobretudo aqueles obtidos de matrizes oriundas de ambientes não protegidos, o que torna a assepsia fundamental para a obtenção de cultura livre de contaminantes e adaptável às condições *in vitro* (BORGES et al., 2012).

Ainda na Figura 3, é possível observar, que em geral, a proliferação do fungo *Fusarium* sp., no explantes foi baixa (inferior a 25 %). Essa baixa proliferações do fungo *Fusarium* sp., e a ausência de *Aspergillus* sp. e bactéria no meio de cultura (Tabela 1) pode ser um indicativo que o assepsia utilizada durante o processo de desinfecção foi suficiente para eliminar esses microorganismos em questão.

Em termos gerais, os resultados do presente estudo sugerem que o protocolo adotado no estabelecimento *in vitro* dos híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* foi satisfatório, com produção de brotações livres de contaminação por fungos e bactérias e aptas para as próximas fases da micropropagação.

Conclusões

O híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* apresenta melhor desempenho no estabelecimento *in vitro* em relação ao híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. A melhor concentração de ágar no estabelecimento *in vitro* dos híbridos de eucalipto empregando um método direto de regeneração se encontra no intervalo entre 7,25 e 7,94 g L⁻¹ de ágar.

Referências bibliográficas

- ANDRADE, R. A.; MARQUES, T. F.; JASPER, S. P.; DAMATTO JUNIOR, E. R.; FUZITANI, E. J. E NOMURA, E. S. Micropropagação de mudas de bananeira em meio líquido. **Comunicata Scientiae**, Piauí, v.2, n.3, p.156-159, 2011.
- BORGES, S. R. XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; LOPES, A. P.; OTONI, W. C. TAKAHASHI, E. K. e MELO, L. A. Estabelecimento *in vitro* de Clones Híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n.3, p.605-616, 2012.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Ed. EMBRAPA, 1998, 132 p.
- CHAGAS, E. A.; PIO, R.; CHAGAS, P. C.; PASQUAL, M. e BETTIOL NETO, J. E. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta –enxertos de pereira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.2, p.261-266, 2010.
- CID. L.P.B.; TEIXEIRA. J.B. Cultura *in vitro* de plantas. Brasília, DF: **Embrapa Informações Tecnológica**, 2010, 303 p.
- COUCEIRO, M. A.; SIQUEIRA, D. L. e PEREIRA, W. E. Crescimento *in vitro* de explantes da bananeira prata anã em função de marca e concentrações de ágar. **Revista Ceres**. 48(280), p.671-680, 2001.
- DUTRA, L. F.; WENDLING, I. e BRONDANI, G. A micropropagação do eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.58. p.49-59, 2009.
- GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G.-J. **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3 Ed. Dordrecht: Springer, 2008, 29-64p.
- LENCINA, K. H.; BISOGNIN, D. A.; KIELSE, P.; PIMENTEL, N. e FLEIG, F. F. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plantas de grábia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.6, p.1025-1030, 2014.
- LIMA, R. V.; LOPES, J. C.; SCHMILDT, E. R. e MAIA, A. R. Germinação *in vitro* de urucu. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.29, n.1, p.171-177, 2007.

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

PAIVA, P. D. O; PASQUAL, M. e PAIVA, R. Efeito de concentrações de ágar e níveis de pH na propagação *in vitro* de crisântemo. **Revista Ceres**, Lavras, 46(264), p.141-148, 1999.

PASQUAL, M.; ALVES, G. P.; DUTRA, L. F.; FINOTTI, D. R.; CHAGAS, E. A. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina ‘poncã’ em função de pH e da concentração de ágar. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, n.3, p.199-202, 2002.

PASQUAL, M. SANTOS, F. C.; FIGUEIREDO, M. A.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C. e FERREIRA, E. A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, Vitoria da Conquista, 26, p.45-49, 2008.

REZENDE, J.C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, S.P.; PEREIRA, A. R. e VILLA, F. Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.9, n.1, p.21-26, 2008.

RODRIGUES, A. C.; SILVEIRA, C. A. P.; FORTES, G. R. L.; FACHINELLO, J. C. e SILVA, J. B. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Prunus* sp. em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.1, p.131-133, 2003.

TAMBOSI, G. e ROGGE-RENNER, G. D. Avaliação de métodos de esterilização, concentração de ágar e composição de meio de cultura para propagação *in vitro* de *Pimpinella anisum* (Linn.) – Apiaceae. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.31, n.2, p.189-194, 2010.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; e SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Ed. UFV, 2 ed., 2013, 279 p.

Recebido em 23 de outubro de 2019

Aceito em 25 de novembro de 2019



Facebook



Instagram



LinkedIn



Twitter

Compartilhar



Agrária Acadêmica

Mídias/Notícias/Publicações

Use um leitor de QR code ou acesse
<https://app.volagrariaacad> pelo celular