

DOSES DE SACAROSE EM MICROPROPAGAÇÃO FOTOAUTOTRÓFICA DE EUCALIPTO

**Nayara M. SILVA¹; Leandro F. SANTOS²; Ariane B. FIGUEIREDO³; Wellington
M. BARBOSA⁴**

RESUMO

A micropropagação é amplamente difundida e apresenta inúmeras vantagens em relação aos métodos tradicionais de propagação, porém, seu emprego em escala comercial na produção de mudas é limitado, devido aos altos custos. A micropropagação fotoautotrófica surge como uma possibilidade potencial de aumentar a eficiência da micropropagação e auxiliar na redução dos custos, tornando-a viável comercialmente. Dessa forma, procurou-se avaliar aspectos relacionados à micropropagação fotoautotrófica de eucalipto com a utilização de luz natural e diferentes concentrações de sacarose. A espécie utilizada foi *Eucalyptus urograndis*, com a coleta das brotações laterais. A inoculação de segmentos nodais foi realizada individualmente em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura MS. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3x4, sendo eles: três ambientes (interno, externo e interno/externo), quatro concentrações de sacarose (0, 15, 30 e 40 g.L⁻¹) com dez repetições cada. Concluiu-se que o ambiente externo difere na produção de biomassa e, conseqüentemente, na eficiência nutricional, sendo identificados maior número de folhas. Em relação à oxidação e à contaminação, os ambientes não diferiram, o que indica que o ambiente e a concentração de sacarose não interferiram diretamente na quantidade de materiais oxidados e/ou contaminados.

¹ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Câmpus Machado. Machado/MG, email: nayaramds@hotmail.com;

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Câmpus Machado. Machado/MG, email: felix.le@hotmail.com;

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Câmpus Machado. Machado/MG, email: ariane.borges@ifsuldeminas.edu.br;

⁴ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Câmpus Machado. Machado/MG, email: wambarbosa@hotmail.com.

INTRODUÇÃO

Sabe-se que a micropropagação apresenta inúmeras vantagens em relação aos métodos tradicionais de propagação, porém, seu emprego em escala comercial na produção de mudas é limitado. Os altos custos de produção se devem, em grande parte, às perdas causadas por contaminação *in vitro*; por desordens fisiológicas e morfológicas nas plantas; à baixa percentagem de sobrevivência das plantas no estágio de aclimatização às condições *ex vitro*; à necessidade de mão de obra especializada (KURATA e KOZAI, 1992; KOZAI e KUBOTA, 2001); e, principalmente, ao elevado custo de funcionamento e manutenção das salas de crescimento com luz artificial e temperatura controlada, onde as culturas *in vitro* são incubadas (STANDAERT DE METSENAERE, 1991; KODYM e ZAPATA-ARIAS, 1999).

A micropropagação fotoautotrófica (produção de micropropágulos sem adição de sacarose ao meio de cultura e sob condições ambientais que favorecem a fotossíntese) surge como uma possibilidade potencial de aumentar sua eficiência e auxiliar na redução dos custos, devido ao uso de luz natural, tornando viável comercialmente (KUBOTA e TADOKORO, 1999).

Em associação à luz natural, a micropropagação proporciona vantagens quando comparada ao método convencional, incluindo aumento do crescimento das plantas, redução do risco de contaminação microbiana, melhoria das características fisiológicas devido às condições ambientais de cultivo serem mais naturais, redução do estresse da planta durante a aclimatização, aumentando a porcentagem de sobrevivência das mudas (HEMPEL, 1994; ZOBAYED et al., 2000, 2001; AFREEN et al., 2002; KOZAI et al., 2003), eliminação e, ou redução dos custos com iluminação e com reparos e manutenção, e ainda, possibilidade de utilização de instalações simplificadas reduzindo os custos das construções (KODYM e ZAPATA-ARIAS, 1999).

Na micropropagação convencional, as plantas normalmente crescem em uma condição heterotrófica, dependendo de uma fonte externa de energia. Nesse sentido, os meios de cultura compõem-se de uma fonte de carboidrato, que fornece energia e esqueletos de carbono utilizados na biossíntese de polissacarídeos, aminoácidos e proteínas. Dentre as fontes de carboidratos mais comuns em meios de cultura, a sacarose é a mais utilizada (XAVIER et al., 2009).

Uma das práticas empregadas para promover o crescimento fotoautotrófico das plantas *in vitro* e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção é a eliminação total da sacarose do meio de cultura (KOZAI e KUBOTA, 2001; ARIGITA et al., 2002). No entanto, em alguns estudos, houve efeito significativo da interação de concentração de sacarose em micropropagação fotoautotrófica.

A espécie Urograndis GG 100 foi produzida por meio de propagação clonal. É uma espécie altamente comercializada no mercado principalmente pelo rápido crescimento na produção de lenha, carvão e escoramento para a construção civil. Sua madeira é menos densa, porém com alta produtividade⁵.

Pesquisas utilizando a luz natural na micropropagação fotoautotrófica e uso parcial ou não da sacarose ainda são muito escassas, apesar da grande disponibilidade de luz natural ao longo do ano, no Brasil. Há ainda a necessidade de novas tecnologias para o setor de produção de mudas. Assim, esse estudo visou avaliar aspectos relacionados à micropropagação fotoautotrófica de eucalipto com a utilização da luz natural; a capacidade da cultura em realizar a fotossíntese *in vitro*; a viabilidade do uso da sacarose como fonte parcial de energia, buscando a otimização de recursos, economia e maior produtividade; a procura de um método de produção de mudas comercialmente viável.

MATERIAL E MÉTODOS

A espécie utilizada foi a Urograndis GG 100 (*Eucalyptus urograndis*). Foram adquiridas 50 mudas de viveirista local. As matrizes foram levadas ao IFSULDEMINAS – Câmpus Machado e pulverizadas em solução de 0,5 g do produto Cercobin 70%, em 500 mL de água. Em seguida foram transferidas para vasos plásticos com substrato e fertilizante de liberação controlada (macro e micro nutrientes) e armazenadas em Casa de Vegetação, em condições de luz e temperatura naturais. O controle fitossanitário foi feito a cada 15 dias.

Das plantas matrizes, após 3 meses, foram coletadas as brotações laterais. Estas foram deixadas sob água corrente por 20 minutos, e posteriormente desinfestadas em álcool 70% durante 2 minutos, hipoclorito de sódio 0,5% durante 20 minutos e enxaguadas por três vezes com água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar. Em seguida foram cortados os segmentos nodais contendo

⁵ Site Nativo Florestal. Disponível em: <http://nativoflorestal.blogspot.com.br/p/eucalipto.html>. Acesso em: 20/08/2014.

uma gema lateral, que foram inoculados individualmente em tubos de ensaio, contendo 15 mL do meio de cultura MS. O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,8, e solidificados com 6 g L⁻¹ de ágar e autoclavados a 121°C, a 1,2 atm.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com dez repetições, no arranjo fatorial 3x4, sendo eles: três ambientes (interno em sala de crescimento a 25 °C e fotoperíodo de 16 h; externo em mini estufa montada à sombra com fotoperíodo natural, e interno por 30 dias e posteriormente transferidos para ambiente externo) e quatro concentrações de sacarose (0, 15, 30 e 40 g L⁻¹). A troca de CO₂ foi determinada através de furos na tampa e vedação dos frascos com algodão e micropore.

As avaliações visuais foram realizadas 30 e 60 dias após a inoculação, sendo avaliadas a oxidação, a contaminação e o número de folhas.

Os dados coletados foram analisados utilizando o *software* Biostat 5.3. Para número de folhas, utilizou-se o teste ANOVA e para dados com diferença estatística utilizou-se o teste de Tukey comparando as médias. Para a variável oxidação foi utilizado o teste Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. Já para a variável contaminação empregou-se o teste G.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença significativa para o parâmetro número de folhas entre os ambientes, sendo que a resposta mais satisfatória foi o externo, tanto aos 30 quanto aos 60 dias (Tabelas 1 e 2). O cultivo nos ambientes interno e interno/externo não diferiram entre si (Tabela 1).

Tabela 1 – Número médio de folhas por explante após 30 dias de inoculação cultivados em diferentes ambientes.

Ambiente	Médias
Externo	2,1 A
Interno/Externo	0,75 B
Interno	0,67 B

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,01$).

Em relação à concentração de sacarose, para o ambiente externo e para o ambiente interno/externo os tratamentos 0, 15, 30 e 40 g L⁻¹ não diferem entre si ($P= 0,9931$ e $0,0778$, respectivamente). Isso indica que as diferentes doses de sacarose não interferiram no crescimento dos explantes, podendo ser usado de 0 até 40 g L⁻¹.

Tabela 2 – Número médio de folhas por explante após 60 dias de inoculação cultivados em diferentes ambientes.

Ambiente	Médias
Externo	3,52 A
Interno/Externo	1,75 B

Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,01$).

Em relação à concentração de sacarose, para o ambiente externo e para o ambiente interno/externo os tratamentos 0, 15, 30 e 40 g L⁻¹ não diferem entre si ($P= 0,9931$ e $0,0778$, respectivamente). Isso indica que as diferentes doses de sacarose não interferiram no crescimento dos explantes, podendo ser usado de 0 até 40 g L⁻¹.

Para as demais variáveis analisadas (contaminação e oxidação), não houve diferença estatística entre os três ambientes usados para o experimento, podendo-se dizer que o ambiente e a concentração de sacarose não interferiram diretamente na quantidade de materiais oxidados e/ou contaminados.

CONCLUSÕES

O cultivo de segmentos nodais de eucalipto Urograndis GG 100 em tubos de ensaio mantidos em ambiente externo à sombra com fotoperíodo natural, difere na produção de biomassa, sendo identificadas diferenças no número de folhas, mostrando-se mais eficiente que os demais ambientes.

A sacarose não influenciou o crescimento de folhas nos explantes nos três ambientes avaliados.

Em relação à oxidação e à contaminação, os ambientes não diferiram, indicando que, nesse caso, o ambiente e a concentração de sacarose não interferiram diretamente na quantidade de materiais oxidados e/ou contaminados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFREEN, F. et al. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. **Annals of Botany**, London, v.90, p.11-19, 2002.

ARIGITA, L. et al. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.115, p.166-173, 2002.

HEMPEL, M. From micropropagation to microponics (part II). **Practical Hydroponics & Greenhouses**, May/June, p.17-20, 1994.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v.55, p.141-145, 1999.

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

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

KUBOTA, C.; TADOKORO, N. Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, New York, v.35, p.296-298, 1999.

KURATA, K.; KOZAI, T. (eds). **Transplant production systems**. Dordrecht : Kluwer Academic, 1992. 299p.

STANDAERT DE METSENAERE, R.E.A. Economic considerations. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (eds). **Micropropagation**. Dordrecht : Kluwer Academic, 1991. p.131-140.

ZOBAYED, S.M.A. et al. Quality biomass production via photoautotrophic micropropagation. **Acta Horticulturae**, The Hague, v.530, p.377-386, 2000.

ZOBAYED, S.M.A. et al. Physiology of Eucalyptus plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, New York, v.37, p.807-813, 2001.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal**: princípios e técnicas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 272p.