

Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus benthamii* usando diodos de emissão de luz (LEDs)

Establishment and multiplication in vitro of clones of Eucalyptus dunnii and Eucalyptus benthamii using light-emitting diodes (LEDs)

Ramon Silveira Andrade¹, Gabriel Kohler^{1*}, Márcio Carlos Navroski¹, Mariane de Oliveira Pereira¹, Carolina Moraes¹, Thalia Schilisting¹

¹Laboratório de Propagação e Melhoramento Florestal, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Campus de Ciências Agroveterinárias, Lages-SC, Brasil.

*Autor para correspondência: gabriel.kohler@edu.udesc.br

RESUMO

A cultura de tecidos tem se apresentado como uma das principais técnicas de propagação vegetativa, tendo importância as medidas de controle e prevenção de contaminação. O uso dos diodos emissores de luz (LEDs), e diferentes colorações dos mesmos, pode se destacar como auxílio para o estabelecimento e multiplicação de explantes desinfestados. O presente capítulo teve como objetivos específicos a desinfestação de explantes de diferentes clones de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus benthamii* submetidos a diferentes tempos de imersão e concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl), variando entre 0,5 a 1,5% e 10 a 20 minutos respectivamente. E também o estabelecimento dos explantes visando sua multiplicação *in vitro*, utilizando LEDs de coloração azul, vermelha e mista com ambas. O uso de NaOCl a concentração de 1,5% com imersão por 10 minutos se mostrou o método mais eficaz de desinfestação do material. Quanto ao estabelecimento e multiplicação dos explantes, o uso de LEDs de luz azul acarretou em maior taxa de brotação durante o estabelecimento e maior aparecimento de calos (não houve brotação nesta fase), durante a multiplicação.

Palavras-chave: Micropropagação. Eucalipto. Desinfestação.

ABSTRACT

Tissue culture has been presented as one of the main techniques in vegetative propagation, highlighting the importance of measures in controlling and preventing contamination. The use of light-emitting diodes (LEDs), and certain colors, can be highlighted as an aid for the establishment and multiplication of disinfested explants. The specific objectives of the present chapter had were the disinfestation of explants belonging to different clones

Realização:



Apoio:



of *Eucalyptus dunnii* and *Eucalyptus benthamii* submitted to different immersion times and concentrations of sodium hypochlorite (NaOCl), ranging from 0.5 to 1.5% and 10 to 20 minutes respectively. Also the establishment of explants aiming for their multiplication *in vitro*, using LEDs of blue, red and mixed coloration. The use of NaOCl at a concentration of 1.5% with immersion for 10 minutes proved to be the most effective method of disinfesting the material. As for the establishment and multiplication of explants, the use of blue light LEDs resulted in a higher rate of sprouting during establishment and a greater appearance of calluses (no sprouting at this stage) during multiplication.

Keywords: Micropropagation. Eucalyptus. Disinfestation.

1 INTRODUÇÃO

A micropropagação é um método cada vez mais utilizado para produção de plantas em larga escala, possibilitando a propagação de espécies difíceis de clonar através de técnicas de propagação mais convencionais, permitindo também entre outras vantagens, assegurar o estado fitossanitário dos propágulos mantidos em condições assépticas. (CANHOTO, 2010)

A micropropagação é uma das principais aplicações de cultura de tecidos vegetais, definida como uma técnica de propagação vegetativa utilizando pequenos propágulos (TRUEMAN *et al.*, 2018). Esta técnica visa clonar espécies ou híbridos com altas taxas de crescimento, tolerância a baixas temperaturas e salinidade, e resistência a pragas e doenças (WENDLING *et al.*, 2014). A possibilidade de obter muitas microestacas clonais em um curto espaço de tempo e em área reduzida, levou a um aumento da uso comercial da micropropagação (HARTMANN *et al.* 2011).

Através do presente trabalho, se objetivou avaliar o efeito de diferentes tempos de imersão e concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl), na desinfestação de explantes de clones de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii*, avaliar o estabelecimento e multiplicação *in vitro* de explantes vindos dos clones, utilizando LEDs de coloração azul, vermelha e mista.

3 METODOLOGIA

Experimento 1 – Clones e desinfestação com NaClO no estabelecimento in vitro

Realização:



Apoio:



Após a aplicação dos tratamentos de desinfestação, os explantes foram lavados três vezes com água estéril. Os frascos identificados e levados a sala de crescimento usando somente luzes brancas do tipo LED.

Trinta dias após a inoculação dos explantes foram avaliadas a percentagem de sobrevivência dos explantes, contaminação e oxidação, determinadas mediante avaliação visual da presença de fungos e/ou manchas de oxidação no meio de cultura e/ou no explante.

Experimento 2 – Clones e luzes LED no estabelecimento in vitro

Após a inoculação dos explantes, os frascos foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes de cores branca, azul, vermelha e mista de azul e vermelha.

Trinta dias após a inoculação dos explantes foi realizada a avaliação do estabelecimento *in vitro* (aparecimento de brotações em cada explante) da oxidação fenólica (escurecimento dos explantes) e da contaminação fúngica (aparecimento de bolor e estruturas fúngicas sobre o meio ou explantes), registrados por meio de percentagem.

Experimento 3 – Clones e luzes LED na multiplicação in vitro

Para a fase de multiplicação *in vitro*, foram utilizadas brotações provenientes de explantes de clones de *E. benthamii* e *E. dunnii* previamente estabelecidos *in vitro*.

Após a inoculação dos explantes, os frascos foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes de cores branca, azul, vermelha e mista de azul e vermelha.

Trinta dias após a inoculação dos explantes foi avaliada a quantidade de brotações indicando multiplicação, porém, como não houve nenhum sinal de brotação, foi avaliado então, em percentagem, a ocorrência de calos nos explantes.

Análise estatística

Após testar a normalidade dos dados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov os dados foram submetidos à análise de variância. Quando o valor de “F” foi significativo,

Realização:



Apoio:



dados de tratamentos qualitativos tiveram as médias comparadas por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. O programa estatístico SISVAR foi utilizado para a análise estatística dos dados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 – Clones e desinfestação com NaClO no estabelecimento in vitro

Não foi observada interação significativa entre os fatores clones e NaOCl na desinfestação in vitro. Porém, obteve-se efeito significativo para o fator NaOCl (concentração e tempo de imersão) (Tabela 1). Foi observado que o tratamento utilizando 1,5% de NaOCl e 10 minutos de imersão, resultou em maior sobrevivência, com 68% dos explantes sobrevivendo ao processo. Os demais tratamentos envolvendo uso de hipoclorito não diferenciaram entre si, e a testemunha, resultou em menor média (nenhum explante sobrevivendo).

Tabela 1- Sobrevivência (%), contaminação (%) e oxidação fenólica (%) em diferentes clones e desinfestação com NaClO no estabelecimento in vitro de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii*.

Tratamento	% de sobrevivência	% de contaminação	% de oxidação
Testemunha	0% c*	100% d	0% d
0,5% - 20 min	31% b	63% c	5% ab
1% - 10 min	35% b	56% bc	9% ab
1% - 20 min	34% b	46% abc	20% bc
1,5% - 10 min	68% a	26% a	7% ab
1,5% - 20 min	32% b	34% ab	33% c

*Tratamentos com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de erro.

Para contaminação fúngica (Tabela 1), também foi observada diferença significativa entre os tratamentos com influência do NaOCl, mas não houve efeito entre os clones. O tratamento com 1,5% de NaOCl e 10 min de imersão apresentou menor percentual de contaminação (26%), porém não diferenciou estatisticamente do tratamento com 1,5% e 20 min de imersão e tratamento com 1% e 20 min de imersão. O tratamento testemunha demonstrou maior percentagem de contaminação, sendo que todos seus explantes acabaram sendo contaminados.

Experimento 2 – Clones e luzes LED no estabelecimento in vitro

Não houve interação significativa entre os fatores testados nestes experimentos.

Realização:



Apoio:



Em nenhuma das três variáveis avaliadas houve variação significativa entre os clones, somente entre os diferentes espectros de luz utilizados. Em relação ao surgimento de brotos nos explantes (Tabela 2), houve efeito significativo entre as diferentes colorações de LEDs, mas não entre os diferentes clones. Os explantes submetidos a luz azul, em geral obtiveram maior porcentagem de brotação (64%). As demais cores, e testemunha de luz branca não diferenciaram estatisticamente entre si.

Tabela 2- Sobrevivência (%), contaminação (%) e oxidação fenólica (%) em diferentes clones e colorações de LEDs no estabelecimento in vitro de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii*.

Tratamento	% de brotação	% de contaminação	% de oxidação
Testemunha (Luz Branca)	26% b*	15% ab	59% b
Luz Azul	64% a	11% a	26% a
Luz Vermelha	34% b	21% ab	46% b
Luz Mista	31% b	25% b	45% b

*Tratamentos com letras iguais não diferem entre si de acordo com Tukey a 95% de confiança.

Em termos numéricos, se nota benefício no uso de todas as LEDs coloridas em relação a luz branca da testemunha, sendo que a taxa de brotação foi elevada em todos os casos, porém, o uso de LED azul é recomendado, em comparação ao vermelho ou mesmo ao misto das duas colorações. A taxa de brotação dobrou sob essa coloração quando comparada as outras duas.

A luz azul também foi superior nas demais variáveis analisadas, sendo que suas taxas de contaminação fungica e oxidação ficaram abaixo dos demais tratamentos avaliados, o fato de ser mais próxima da luz verde no espectro de luzes pode ter ajudado.

A luz azul realiza uma série de funções morfogenéticas, além de regular processos metabólicos, influenciar a produção e o crescimento vegetal, influenciar positivamente o desenvolvimento de cloroplastos e a biossíntese de moléculas de clorofila (TAIZ; ZEIGER, 2013; LAZZARINI *et al.*, 2017).

Experimento 3 – Clones e luzes LED na multiplicação in vitro

Não houve resposta morfológica neste experimento para a multiplicação, não sendo observado nenhuma emissão de novas brotações. Para a ocorrência de calos, não houve diferença significativa entre os fatores de estudos (Tabela 3). A formação de calos variou entre 13% na luz mista (vermelha/azul) e 25% na luz azul.

Realização:



Apoio:



Tabela 3- Aparecimento de calos (%) em diferentes clones e colorações de LEDs no estabelecimento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii*.

Tratamento	Aparecimento de calos
Testemunha (Luz Branca)	19% a*
Luz Azul	25% a
Luz Vermelha	19% % a
Luz Mista	13% a

*Tratamentos com letras iguais não diferem entre si de acordo com Tukey a 95% de confiança.

4 CONCLUSÃO

O efeito dos LEDs no estabelecimento dos explantes pode ser considerado significativo, principalmente do espectro de coloração azul, que resultou em maior taxa de brotação.

Não houve sucesso na fase de multiplicação como se esperava, apenas surgimento de calos em certos explantes, sem particular diferença entre as luzes utilizadas.

REFERÊNCIAS

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 19-25, 2010.

CANHOTO, J.M. **Biotechnology vegetal - da clonagem de plantas à transformação genética**. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, p. 44-103, 2010.

HARTMANN, H.T. *et al.* **Hartmann & Kester's Plant propagation: principles and practices**. 8ª edition, Ed. Prentice Hall, New Jersey. 928 p. 2011.

IACONA, C.; MULEO, R. Light quality affects *in vitro* adventitious rooting and *in vitro* performance of cherry rootstock colt. **Scientia Horticulturae**, v.125, p.630-636, 2010.

MÜLLER, D. *et al.* Establecimiento *in vitro* de *Zephyranthes* spp. **Biotecnología Vegetal**, v. 17, n. 1, p. 19–24, 2017.

PELIZZA, T. R. *et al.* Establecimiento *in vitro* de mirtilheiro: cultivares Bluecrop, Duke e Misty. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 9, n. 1-2, p. 17-23, 2013.

STEFANEL, C. M. *et al.* Diodos emissores de luz (LEDS) no cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 40, e201901930, p. 1-5, 2020.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artamed, 2013. 820 p.

TRUEMAN, S.J.; HUNG, C.D.; WENDLING, I. Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, v. 9 n. 2, 84 p., 2018.

Realização:



Apoio:



WENDLING, I.; TRUEMAN, S.J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry part I: concepts, regulation and consequences of phase change. **New Forests**, v. 45, p. 449-471, 2014.

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

Realização:



Apoio:

