

KELLEN CRISTINA GATTI

**FOTOAUTOTROFIA E OZONIZAÇÃO DE BIORREATORES NA
MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES DE *Eucalyptus* spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

G263f
2018 Gatti, Kellen Cristina, 1976-
Fotoautotrofia de ozonização de biorreatores na
micropropagação de clones de *Eucalyptus* spp. / Kellen Cristina
Gatti. – Viçosa, MG, 2018.
xii, 87 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Aloisio Xavier.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Micropropagação. 2. Fotoautotrofia.
3. Ozonização. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Engenharia Florestal. Programa de
Pós-Graduação em Ciência Florestal. II. Título.

CDO adapt. CDD 22. ed. 634.918151

KELLEN CRISTINA GATTI

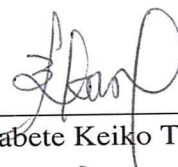
**FOTOAUTOTROFIA E OZONIZAÇÃO DE BIORREATORES NA
MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES DE *Eucalyptus* spp.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 12 de julho de 2018.



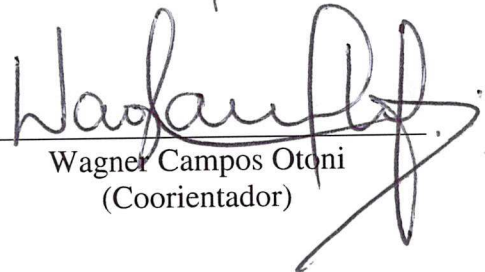
Eduardo Euclides de Lima e Borges



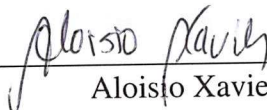
Elizabete Keiko Takahashi



Edgard Augusto de Toledo Picoli



Wagner Campos Otoni
(Coorientador)



Aloisio Xavier
(Orientador)

*À minha família e
principalmente a meu filho, Juan Felipe,
pelo incentivo, amor e orações.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar, cuidar e proteger durante toda vida e nunca deixar abandonar meus sonhos e metas.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal e ao Laboratório de Cultura de Tecidos II (BIOAGRO), pela realização do curso de doutorado e deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro ao trabalho desenvolvido.

À empresa CMPC – Celulose Riograndense, localizado no município de Guaíba – RS, pelos clones fornecidos na utilização dessa pesquisa e apoio financeiro.

Ao meu orientador Aloisio Xavier pelos ensinamentos, paciência, amizade e confiança ao longo destes anos. Muito obrigada!

Ao meu coorientador Wagner Campos Otoni por todos os ensinamentos, amizade e por estar sempre disposto a ajudar. Muito obrigada!

À professora Leda D'Antonino Faroni, Lucas Prates e Fernanda Heleno pela contribuição, apoio incondicional e discussões na realização do trabalho com ozônio.

Aos meus pais, irmãos, cunhada, sobrinhos por sempre estarem ao meu lado, por todas as orações, amor e apoio. À minha sogra, cunhadas e sobrinhos pelas orações, carinho e apoio.

Ao meu esposo Juan Carlos Carrascal Velasquez, pelo amor e por estar ao meu lado ajudando, incentivando e cuidando sempre. Ao meu filho Juan Felipe Carrascal Gatti, por ser meu maior incentivo e amor, por você sempre irei lutar para ser melhor. Sem vocês dois isto não seria possível!

Aos grandes amigos de Viçosa, em especial ao grupo de silvicultura com os quais compartilhei as realizações e preocupações dessa etapa, obrigada pela amizade, apoio e carinho. Aos meus amigos da pós-graduação e do Laboratório de Cultura de Tecidos II – Bioagro/UFV.

À Natane pelo apoio e amizade em todos os momentos, por ter sempre uma palavra amiga e ajudar sempre que precisei. Obrigada!

Aos estagiários Vinicius, Matheus, Roger, Larissa e Suellen e ao grupo de pesquisa em Silvicultura Clonal, pela ajuda com o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos da empresa Copener Florestal, muito obrigada pela amizade e apoio.

A todas as pessoas que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para minha vida profissional.

BIOGRAFIA

KELLEN CRISTINA GATTI, filha de Guerino Gatti e de Regina Dal Col Gatti, nasceu em 28 de fevereiro de 1976, em Colatina, Espírito Santo.

Concluiu o 1º grau em 1990 no Colégio Marista, em Colatina- ES, e o 2º grau em 1993, Colégio Nacional, em Vitória - ES.

Em 2000, diplomou-se Engenheira Florestal pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa - MG.

Em agosto de 2000, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, concluindo os requisitos necessários à obtenção do título de *Magister Scientiae* em agosto de 2002.

Em março de 2014, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, concluindo os requisitos necessários à obtenção do título de *Doctor Scientiae* em julho de 2018.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Biorreatores: Definições, vantagens e desvantagens.....	2
2.2. Aplicação de biorreatores para a propagação de mudas em larga escala.....	4
2.3. Produção de espécies lenhosas em biorreatores	5
3. BIBLIOGRAFIA	7
EFEITO DO MEIO DE CULTURA SEMI-SÓLIDO E LÍQUIDO NA MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES DE <i>Eucalyptus</i> spp.....	12
1. Introdução.....	12
2. Material e Métodos.....	14
2.1. Material vegetal.....	14
2.2. Tratamentos: meio semi-sólido e líquido.....	15
2.3. Avaliações experimentais e análise dos dados.....	16
3. Resultados	16
4. Discussão.....	19
5. Conclusões	22
6. Bibliografia.....	22
SELEÇÃO GENÉTICA DE CLONES DE <i>Eucalyptus</i> spp. EM AMBIENTE DE TROCAS GASOSAS <i>in vitro</i> VIA MICROPROPAGAÇÃO.....	25
1. Introdução.....	25
2. Material e Métodos.....	27
2.1. Material vegetal e condições <i>in vitro</i>	27
2.2. Trocas gasosas na multiplicação <i>in vitro</i> de clones de <i>Eucalyptus</i> spp.	28
2.3. Trocas gasosas no alongamento <i>in vitro</i> de clones de <i>Eucalyptus</i> spp.	29
2.4. Avaliações experimentais.....	29
3. Resultados	30
4. Discussão.....	35
5. Conclusões	37
6. Bibliografia.....	37
SACAROSE E LUZ NO CULTIVO <i>in vitro</i> DE CLONES DE <i>Eucalyptus</i> <i>benthamii</i> E <i>Eucalyptus dunnii</i> VIA MICROPROPAGAÇÃO.....	40
1. Introdução.....	40

2. Material e Métodos	42
2.1. Material vegetal.....	42
2.2. Sacarose e condições luminosas	43
2.3. Avaliações experimentais e análise dos dados.....	44
3. Resultados	45
3.1. Multiplicação.....	45
3.2. Alongamento	46
4. Discussão.....	48
5. Conclusões	49
6. Bibliografia.....	50
OZÔNIO NA ESTERILIZAÇÃO DE BIORREADORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA NA MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES DE <i>Eucalyptus</i> spp. ..	
1. Introdução.....	55
2. Material e Métodos.....	57
2.1. Material vegetal e biorreator utilizado	57
2.2. Obtenção e quantificação do ozônio (O ₃)	59
2.3. Arranjo experimental	60
2.4. Avaliações experimentais.....	60
2.5. Análise estatística.....	611
3. Resultados	622
4. Discussão.....	63
5. Conclusões	65
6. Bibliografia.....	65
EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA COM OZÔNIO E DA SACAROSE NA MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> DE CLONES DE <i>Eucalyptus</i> spp. EM BIORREADORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA	
1. Introdução.....	70
2. Material e Métodos.....	73
2.1. Biorreator	73
2.2. Material vegetal e condições de cultivo <i>in vitro</i>	74
2.3. Obtenção e quantificação do ozônio (O ₃)	74
2.4. Arranjo experimental	75
2.5. Avaliações experimentais.....	77
3. Resultados	77
3.1. Experimento 1	77
3.2. Experimento 2	78
4. Discussão.....	79
5. Conclusões	82

6. Bibliografia.....	82
3. CONCLUSÕES GERAIS	86

RESUMO

GATTI, Kellen Cristina, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Fotoautotrofia e ozonização de biorreatores na micropropagação de clones de *Eucalyptus* spp.** Orientador: Aloisio Xavier. Coorientador: Wagner Campos Otoni.

Os avanços do melhoramento genético e da biotecnologia florestal estão acompanhados por mudanças e desafios na clonagem plantas. Durante muitos anos o uso da miniestaquia tem sido o método de clonagem mais utilizado pelo setor florestal. Porém, o uso do cultivo *in vitro* vem tornando-se, cada ano, mais importante. As dificuldades apresentadas pelo processo *ex vitro* de produção de mudas, aumenta a necessidade de protocolos e sistemas eficientes de propagação em laboratório. Com isso, muitos conceitos do cultivo *in vitro* convencional como meio de cultivo, tipo de recipiente, sistema de produção, heterotrofia estão mudando. Os estudos relacionados aos sistemas fotoautotróficos, jardins clonais *in vitro* e a automatização dos sistemas vem crescendo e sendo fundamental para o futuro da clonagem de plantas. Estes buscam tornar mais acessível e eficiente o processo de produção de plantas *in vitro*. Assim, objetiva-se nesse trabalho avaliar o potencial de sistemas fotoautotrófico, a seleção de materiais com maior competência a micropropagação e o uso da esterilização com ozônio na produção de *Eucalyptus* spp. em biorreatores. Analisou-se o uso do meio semi-sólido e líquido, buscando entender o crescimento de clones de *Eucalyptus* spp. em sistemas de meio líquido como os utilizados em biorreatores. Foi verificado no estudo que o uso de meio líquido proporcionou maior incremento de massas fresca e seca dos explantes, taxa de multiplicação e tamanho da maior brotação. Além das diferenças constatadas no crescimento do material, observou-se respostas diferenciadas entre os clones em relação ao meio de cultivo utilizado (semi-sólido e líquido) para a maioria das características mensuradas. Para avaliação do crescimento de genótipos de *Eucalyptus* spp., em ambientes de trocas gasosas quanto a multiplicação e alongamento *in vitro*, testou-se dois ambientes e 10 clones por fase *in vitro*. O ambiente sem trocas gasosas foi mais favorável para a propagação *in vitro* dos genótipos testados. Além das diferenças observadas entre ambientes, constatou-se efeito do fator genético sobre as características, o que possibilita a seleção de clones para propagação sob as condições analisadas. Em relação às características avaliadas,

os clones de *E. benthamii* apresentaram melhor desempenho em comparação com os demais clones estudados. Aliados a trocas gasosas, outros fatores como redução de sacarose e luz foram estudados visando estabelecer clones de *Eucalyptus* spp. em sistemas fotoautotróficos em biorreatores. Todas as qualidades e intensidades lumínicas pesquisadas proporcionaram bom desenvolvimento dos clones de *E. benthamii* e *E. dunnii* cultivados *in vitro*. O uso de LED branca promoveu valores de clorofila total e de carotenoide mais próximos aos encontrados *ex vitro* para os clones testados. O uso de sacarose, adicionado no meio de cultivo *in vitro*, foi importante para estimular a produção na multiplicação e alongamento, bem como aumentar as taxas de clorofila total e de carotenoides. Visando sistemas alternativos de esterilização dos biorreatores e meio de cultura, diferentes tempos e concentrações de ozônio (O₃) foram utilizados. O O₃ pode ser utilizado em substituição à autoclavagem, realizando a ozonização primeiro os biorreatores vazios, com a exposição a 50 mg L⁻¹ de O₃ por 15 min em fluxo constante de 0,5 L min⁻¹ e, posteriormente, a ozonização do meio de cultura líquido por 90 min com concentração de 50 mg L⁻¹ de O₃ e fluxo de 0,5 L min⁻¹. Novos estudos devem ser conduzidos buscando otimizar os resultados de multiplicação, alongamento, aclimação *ex vitro*, assim como buscar protocolos e tecnologias que aliadas ao ozônio, viabilize econômica e operacionalmente, em larga escala, os biorreatores como estratégia para microjardins clonais.

ABSTRACT

GATTI, Kellen Cristina, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Photoautotrophy and ozonization of bioreactors in clonal micropropagation of *Eucalyptus* spp.** Advisor: Aloisio Xavier. Co-advisor: Wagner Campos Otoni.

Advances in genetic improvement and forest biotechnology are linked to changes and challenges in cloning. For many years the use of mini-cutting has been the method of cloning used by the forestry sector, but the use of *in vitro* cultivation has become more important each year. The challenges posed by the seedling *ex vitro* production increase the necessity for efficient protocols and propagation systems in laboratory. With this, many concepts of conventional *in vitro* culture such as culture medium, container type, production system, heterotrophy are changing. An ever increasing growth of studies related to photoautotrophic systems applied to *in vitro* clonal gardens and systems automation has been seen, and becoming instrumental for the future of plant cloning strategies. The objective is to make the *in vitro* plant production process more accessible and efficient. The aim of this work was to evaluate the potential of photoautotrophic systems, the selection of materials with greater competence in micropropagation and the use of ozone (O₃) sterilization on bioreactors-based production of *Eucalyptus* spp. Solid and liquid media were evaluated in genotypes of *Eucalyptus* spp., to better understand the growth of this species in liquid medium systems in bioreactors. The use of liquid medium resulted in a greater increase of fresh and dry mass of the explants, multiplication rate and size of the elongated shoots. In addition to the differences observed in the growth of the material, varying responses were observed among the clones regarding the culture medium used (solid and liquid) for most of the characteristics evaluated. Aiming at evaluating if the gas exchange environments favored *in vitro* growth, multiplication and elongation genotypes of *Eucalyptus* spp., two environments and 10 clones per phase were tested. In general, the absence of gas exchange was the most favorable environment for the *in vitro* propagation. In addition to the observed differences between environments, it was verified the effect of the genetic factor on the characteristics, which allows the selection of clones for propagation under the conditions analyzed. *Eucalyptus benthamii* clones reached better performance compared to the other clones studied. In addition to gas exchange, other factors such

as reduction of sucrose and light were studied in order to establish clones of *Eucalyptus* spp. grown under photoautotrophic conditions in bioreactors. According to the results, *Eucalyptus benthamii* and *E. dunnii* clones had good development in all light qualities and intensities tested. The use of white LED promoted values of total chlorophyll and carotenoid closer to those found *ex vitro*. The use of sucrose in the *in vitro* culture medium was important to stimulate production in multiplication and elongation, as well as increase the rates of total chlorophyll and carotenoids. Aiming at alternative systems of sterilization of bioreactors and culture medium, different times and concentrations of ozone (O₃) were tested. It has been found that, ozone can be used to replace autoclaving, first ozonization of empty bioreactors with exposure to 50 mg L⁻¹ of O₃ for 15 minutes at a constant flow of 0.5 L min⁻¹ and subsequent to ozonization of liquid culture medium for 90 min with concentration of 50 mg L⁻¹ O₃ and flow of 0.5 L⁻¹ min. Further studies should be conducted to optimize the results for multiplication, elongation, *ex vitro* acclimatization, as well as to search for protocols and technologies that used with O₃ sterilization, improve economically and operationally bioreactors as a strategy for mini-clonal hedge.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A silvicultura clonal nas últimas décadas e, particularmente nos últimos anos, tem sido considerada como o grande avanço do setor florestal brasileiro, principalmente para o gênero *Eucalyptus*. A clonagem tem permitido avanços rápidos no melhoramento genético através da seleção e multiplicação vegetativa de genótipos selecionados resistentes ou tolerantes a pragas e doenças, fatores abióticos, ou simplesmente aumento de produtividade e homogeneidade da plantação.

A produção de mudas comerciais para atendimento aos programas de silvicultura clonal tem sido realizada por meio da propagação vegetativa de clones em viveiros florestais; no viveiro a miniestaquia e a microestaquia são as técnicas mais utilizadas. A primeira utiliza como fonte de propágulos plantas produzidas pelas técnicas de macroestaquia ou miniestaquia, já na segunda estes propágulos são produzidos em laboratório de cultura de tecidos, através da micropropagação.

No setor florestal, os usos mais comuns da micropropagação tem sido a limpeza clonal, o revigoramento/rejuvenescimento de clones selecionados, bancos de germoplasma, intercâmbio de material genético a nível nacional e internacional, a indução de poliploidia artificial, assim como base para outras técnicas de biotecnologia, tais como a transgenia.

A cultura de tecidos permite a rápida propagação de árvores selecionadas em florestas clonais comerciais. A micropropagação e a preservação *in vitro* contribuem para fornecer materiais para as plantações comerciais no mundo todo (Trueman et al., 2018) através de bancos de germoplasma e multiplicação massal de genótipos. As condições climáticas são mais controladas e assépticas, não sendo assim afetada pelas atuais mudanças climáticas e sazonalidade observadas nos viveiros florestais na condição *ex vitro*, produzindo assim plantas livres de microrganismos e vigorosas.

Por vezes, o custo das plantas espécies florestais micropropagadas em nível comercial, em relação ao das plantas produzidas em viveiros florestais, tem sido restritivo, o que têm estimulado e desafiado os pesquisadores na busca por alternativas viáveis tecnicamente, economicamente e operacionalmente de produção *in vitro*.

Novos sistemas de micropropagação têm sido desenvolvidos na aquisição de melhorias do processo de produção vegetal buscando reduzir custos e resolver as limitações atuais dos viveiros *ex vitro*. Entre os novos sistemas de interesse na

biotecnologia visando à automatização e larga escala, encontra-se o sistema de biorreatores (Penchel et al., 2007). A produção de plantas em biorreator em meio líquido, tem sido estudada e testada nos últimos anos como alternativa, mais ainda carecem de ajustes técnicos como operacionais viáveis para atender a uma demanda em larga escala no setor florestal (Ahmadian et al., 2017; Arencibia et al., 2017; Businge et al., 2017).

O estabelecimento de biorreatores em sistemas fotoautotróficos com melhores taxas de multiplicação, alongamento e aclimação, aliado a menores custos é uma tendência atual em relação às condições de cultivo *in vitro*. Nesse contexto, os objetivos específicos deste estudo foram: 1) verificar o efeito do meio líquido na produção *in vitro* de *Eucalyptus* spp.; 2) verificar o efeito de trocas gasosas na produção *in vitro* de *Eucalyptus* spp.; 3) verificar o efeito de concentrações de sacarose e luz na micropropagação de *Eucalyptus* spp.; 4) determinar a eficiência da esterilização química com ozônio em biorreatores na condição *in vitro*; e 5) estimar o efeito da esterilização química do meio, sacarose e a taxa de produção de *Eucalyptus* spp. em biorreatores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biorreatores: Definições, vantagens e desvantagens

Biorreatores podem ser conceituados como equipamentos para cultivo sob imersão temporária ou permanente de células, gemas, embriões ou qualquer tipo de propágulo que possa ser utilizado na micropropagação (Teixeira, 2002).

Um biorreator é um recipiente esterilizado e projetado para cultivos em grande escala, ciclos frequentes e proporcionar o máximo de oportunidades para monitoramento e controle das condições ambientais, tais como a agitação, aeração e temperatura (Watt, 2012; Georgiev 2014).

Os biorreatores têm apresentado vantagens em relação à micropropagação convencional, que incluem o aumento da taxa de multiplicação, o crescimento mais rápido e de maior qualidade da cultura, uso de meio líquido, a redução no custo médio de energia, mão de obra e espaço de laboratório (Penchel et al., 2007; Dutra et al., 2009; Teixeira et al., 2010; Furusaki e Takeda, 2011; Gerald e Lee, 2011). O cultivo de plantas em biorreatores, se conduzido de forma correta, possibilita um

menor estresse gasoso e mecânico, com reflexos positivos no crescimento, vigor e aclimação das mudas *ex vitro*. Apresentando também melhor resposta morfo genética em decorrência das melhores condições de cultivo, quando comparadas com a produção de plantas *ex vitro* e a produção tradicional *in vitro*.

Dentro das desvantagens do sistema de biorreatores podemos citar as relacionadas ao processo de micropropagação: dependência de um laboratório de cultura de tecidos, cuja manutenção implica em altos custos, exigência de mão-de-obra altamente especializada; elevada possibilidade de contaminação; variação de condições entre e dentro de clones; dificuldade de encontrar o meio adequado para a espécie desejada; e possibilidade de ocorrência de mutações (Dutra et al., 2009). Outras desvantagens dos biorreatores são o alto custo inicial de implantação do sistema, as desordens fisiológicas (principalmente hiperhidricidade) e a falta de processos alternativos para esterilização do material (Teixeira et al., 2010).

Diante das suas limitações, vários tipos de biorreatores foram desenvolvidos e têm sido utilizados em cultivo de gemas, embriões e plantas (Watt, 2012; Steingroewer et al., 2013). Diante da morfologia complexa do tecido da planta e órgãos, exige o desenvolvimento de biorreatores com um desenho sofisticado, capaz de proporcionar um microambiente específico, a fim de assegurar o crescimento e a integridade fisiológica das culturas. Dependendo do ambiente, os biorreatores podem ser divididos em quatro tipos: de fase líquida, em fase gasosa, biorreatores híbridos e o sistema de imersão temporária (BIT) (Georgiev, 2014).

Atualmente os biorreatores de imersão temporária são os mais utilizados, estes proporcionam condições de usar meio líquido e controlar o ambiente gasoso interno, ao mesmo tempo. Além disso, pode proporcionar automatização do sistema de produção, facilitando redução dos custos de produção por meio de maior produtividade. Dentre as principais atribuições dos biorreatores de imersão temporária está a redução de hiperhidricidade, em comparação com a de imersão permanente. O crescimento da planta e desenvolvimento pode ser controlado por meio da manipulação da frequência e duração da imersão no meio líquido. Devido à falta de agitação e de ventilação, a tensão mecânica dos tecidos da planta é geralmente baixa em comparação com os outros sistemas de biorreatores (Steingroewer et al., 2013).

Cada grupo de pesquisadores têm adotado um determinado tipo de biorreator de imersão temporária, fazendo com que, ao longo dos últimos anos, o BIT seja

reconhecido como uma tecnologia promissora para a micropropagação de plantas, para a produção de metabolitos secundários derivados de plantas, para a expressão de proteínas, assim como para a produção de plantas transgênicas e fitorremediação (Georgiev et al., 2013; Georgiev, 2014).

O principal foco dos trabalhos realizados pelos grupos de pesquisa com uso de biorreatores está relacionado com a avaliação de um tipo de BIT, na produção de mudas e aumento dos rendimentos, em comparação com meios semi-sólidos ou imersão permanente (Jova et al., 2011). A maioria dos autores relata aumento das taxas de multiplicação com seus BITs de escolha, em comparação com o semi-sólido, embora alguns não apresentem diferenças (Teixeira et al., 2011; Watt, 2012; Georgiev, 2014). Todos os autores relatam vantagens do uso de biorreatores em relação à micropropagação tradicional, fazendo com que seu uso seja cada ano de maior interesse para a propagação de plantas *in vitro*.

2.2. Aplicação de biorreatores para a propagação de mudas em larga escala

O uso de biorreatores na produção de mudas em larga escala tem apresentado um mercado crescente nos últimos anos. Cuba, França e Brasil são países pioneiros nessa tecnologia, iniciando o uso de biorreatores na indústria e no comércio nas décadas de 80-90 (Cabral, 2011). Espécies ornamentais (lírio e bromélia) e agrônômicas (batata, estévia e banana) podem ser citadas como espécies precursoras na propagação em larga escala em biorreatores. Para espécies arbóreas, relatos apontam que nos anos de 2005-2007 ocorreu a utilização comercial de biorreatores (Penchel et al., 2007).

O uso de meio líquido em sistema de biorreatores é adequado para produção comercial em larga escala de plantas micropropagadas (Debnath, 2016). Buscando o aumento da produção em qualidade e quantidade, o uso de biorreatores e meio líquido em larga escala possibilita o controle automatizado e pode ser informatizado, projetado para monitorar e controlar as condições de cultivo, parâmetros restritos no cultivo tradicional *in vitro*. Com o cultivo em biorreatores em meio líquido, pode-se controlar a duração e intervalos de imersão e aeração, temperatura, concentrações de oxigênio e CO₂, pH, composição do ambiente gasoso, fotossíntese e o nível do meio líquido (Murthy et al., 2018).

Moses e Mukundan (2013), com *Thymus vulgaris*, aplicaram a técnica de monitoramento da biomassa em biorreator, e juntamente com o monitoramento foi proposto um modelo de incremento da espécie. Os autores concluíram que o modelo criado pelo monitoramento no biorreator foi satisfatório, pois apresentou resultado semelhante com o calculado no processo destrutivo.

O uso de biorreatores na produção de mudas tem sido aplicado ao longo dos anos em diversas espécies, como por exemplo: *Eucalyptus* (Oliveira et al., 2011a; Oliveira et al., 2011b; Oliveira et al., 2014; Correia, 2011; Gonzalez et al., 2011; Watt, 2012; Palhares, 2013; Máximo, 2014; Da Silva et al., 2015); *Coffea arabica* (Ducos et al., 2007); *Theobroma cacao* (Niemenak et al., 2008) *Musa* sp. (Yang et al., 2010); *Lessertia frutescens* (Shaik et al., 2010); *Kalopanax septemlobus* (Kim et al., 2011); *Panax notoginseng* (You et al., 2012); *Xanthosoma sagittifolium* (Niemenak et al., 2013); *Fragaria* sp. (Debnath, 2008; Debnath, 2009; Hanhineva et al., 2005); *Vaccinium corymbosum* L. (Arencibia et al., 2017), *Malus pumila* Mill. (Chakrabarty et al., 2003). Na maioria destes trabalhos experimentais obteve-se resultados positivos, no entanto, para implantação desta tecnologia em escala operacional ainda são necessários diversos ajustes no manejo do equipamento e da cultura.

Fica evidente que uso de biorreatores de imersão temporária para a produção em larga escala pode ser potencialmente aplicado com sucesso para a propagação de muitas espécies de plantas lenhosas arbóreas. Porém, ainda há necessidade de desenvolvimento de protocolos eficientes para obter um aumento na produtividade (Debiasi, 2011) e redução nos custos, tornando o processo competitivo com os métodos convencionais de produção de mudas.

2.3. Produção de espécies lenhosas em biorreatores

Várias são as técnicas de propagação clonal atualmente utilizadas *in vitro* para pesquisas e/ou comercialmente em espécies florestais. Dentre elas está a micropropagação em meio semi-sólido em potes, a embriogênese somática e a micropropagação em meio líquido em biorreatores, sendo esta última considerada a mais promissora.

Os primeiros relatos da propagação de espécies lenhosas em biorreatores foram os de Aitken-Christie et al. (1988), com *Pinus radiata* e porta-enxertos de

macieira. Desde então, os biorreatores são estudados na propagação de espécies lenhosas, porém apenas nos últimos anos passaram a se destacar nas pesquisas e com interesses pelas empresas florestais.

Vários trabalhos recentes descrevem a biotecnologia como oportunidade emergente para espécies lenhosas, mas ainda são escassos os estudos envolvendo a tecnologia de biorreatores. Nawrot-Chorabik (2012) relata a produção em larga escala pelo método de embriogênese somática *in vitro*, utilizando biorreatores para a reprodução de espécies arbóreas. Nesse caso, a embriogênese somática foi induzida em meio semi-sólido, e depois o tecido foi transferido para meio líquido em biorreatores. A embriogênese somática em carvalho (*Quercus suber* L.) em biorreatores foi considerada uma ferramenta eficiente para a produção de um grande número de embriões (Pérez et al., 2013). O uso de embriões em biorreatores de imersão temporária na propagação em larga escala de rícino (*Kalopanax septemlobus*) proporcionou alta taxa de conversão de mudas, as quais foram morfológicamente normais e vigorosas, com melhor desempenho durante a aclimatização, mostrando maiores números de sobrevivência (Kim et al., 2011). Além das espécies supracitadas, o cultivo de embriões somáticos em biorreatores de imersão temporária foi utilizado em estudos com dendê (*Elaeis guineenses*) (Gorret et al., 2004), seringueira (*Hevea brasiliensis*) (Etienne et al., 1997; Martre et al., 2001) e cacau (*Theobroma cacao*) (Niemenak et al., 2008).

O sucesso do cultivo de espécies coníferas em biorreator via embriogênese somática foi relatado em *Picea mariana* e *P. gluca-engelmannii* (Tautorus et al., 1994) e *P. glauca* (Attree et al., 1994). Para *P. sitchensis* a manutenção de suspensões embriogênicas foi relatada somente em frasco com meio líquido (Krogstrup, 1990).

A propagação de *Eucalyptus* por embriogênese somática ainda possui muitas lacunas, permanecendo seu cultivo *in vitro* via brotações axilares e apicais (Merkle e Nairn, 2005). A maioria dos trabalhos relata a inexistência de um protocolo eficiente de regeneração de *Eucalyptus* por embriogênese somática, uma vez que ainda existem problemas básicos a serem solucionados, como o número reduzido de embriões obtidos e a baixa taxa de conversão destes em plantas (Titon et al., 2007). Uma possibilidade para melhoria do processo de produção de embriões de eucaliptos seria o uso de biorreatores de imersão temporária.

Quanto à micropropagação por brotações axilares e apicais, vários trabalhos foram realizados em biorreatores, em diversas espécies lenhosas. Em *Eucalyptus*, o uso de biorreatores tem apresentado resultados satisfatórios comparados com sistemas tradicionais de micropropagação (Oliveira et al., 2014; Da Silva et al., 2015; Mendonça et al., 2016; Businge et al., 2017; Máximo et al., 2018).

Outras espécies lenhosas micropropagadas por brotações axilares e apicais em biorreatores de imersão temporária são: *Artocarpus altilis* (Murch et al., 2007), *Crescentia cujete* (Liu et al., 2007; Murch et al., 2004), *Jacaranda decurrens* (Nascimento et al., 2012), *Kalopanax septemlobus* (Kim et al., 2011), *Pistacia vera*, (Akdemir et al., 2014) e *Malus pumila* Mill. (Chakrabarty et al., 2003).

3. BIBLIOGRAFIA

- AITKEN-CHRISTIE, J.; DAVIES, H. E. Development of a semi-automated micropropagation system. **Acta Horticulturae**, v. 230, p. 81–87, 1988
- AKDEMIR, H.; SÜZERER, V.; ONAY, A.; TILKAT, E.; ERSALI, Y.; ÇİFTÇİ, Y. O. Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 1, p. 65–76, 2014
- ARENCIBIA, A. D., VERGARA, C., QUIROZ, K., CARRASCO, B., BRAVO, C., GARCIA-GONZALES, R. An approach for micropropagation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plants mediated by temporary immersion bioreactors (TIBs). **American Journal of Plant Sciences**, v.4, n.05, p.1022, 2013
- ARENCIBIA, A. D.; GÓMEZ, A.; POBLETE, M.; VERGARA, C. High-performance micropropagation of dendroenergetic poplar hybrids in photomixotrophic Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). **Industrial Crops and Products**, v. 96, p. 102–109, 2017
- ATTREE, S. M.; POMEROY, M. K.; FOWKE, L. C. Production of vigorous, desiccation tolerant white spruce (*Picea glauca* [Moench.] Voss.) synthetic seeds in a bioreactor. **Plant Cell Reports**, v.13, n.11, p.601-606 1994
- BUSINGE, E.; TRIFONOVA, A.; SCHNEIDER, C.; RÖDEL, P.; EGERTSDOTTER, U. Evaluation of a new temporary immersion bioreactor system for micropropagation of cultivars of *Eucalyptus*, birch and fir. **Forests**, v. 8, n. 6, 2017
- CABRAL, J.B. Sistema de imersão temporária (SIT) na produção em larga escala de vitroplantas In: GERALD, L. T. S. (Ed.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas in vitro**. ed. São Paulo: Atiqua, 2011, p.71-87.
- CHAKRABARTY, D.; HAHN, E. J.; YOON, Y. J.; PAEK, K. Y. Micropropagation of apple rootstock M.9 EMLA using bioreactor. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.78, n.3, p. 605-609, 2003

- DA SILVA, A. L. L.; GOLLO, A. L.; BRONDANI, G. E.; HORBACH, M. A.; DE OLIVEIRA, L. S.; MACHADO, M. P.; DE LIMA, K. K. D.; DA LUZ COSTA, J. Micropropagation of *Eucalyptus saligna* Sm. from cotyledonary nodes. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 1, p. 311–318, 2015
- DEBIASE, C. Utilização de biorreatores de imersão temporária numa biofábrica de açúcar, In: GERALD, L. T. S. (Ed.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. ed. São Paulo: Atiqua, 2011, p.100-116
- DEBNATH, S. C. Developing a scale-up system for the *in vitro* multiplication of thidiazuron-induced strawberry shoots using a bioreactor. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 88, n. 4, p. 737–746, 2008
- DEBNATH, S. C. Characteristics of strawberry plants propagated by *in vitro* bioreactor culture and ex vitro propagation method. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 3, p. 239–246, 2009
- DUCOS, J.-P.; LAMBOT, C.; PÉTIARD, V. Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. **International Journal of Plant Developmental Biology**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2007
- DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A Micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 58, p. 49-59, 2009
- FURUSAKI, S.; TAKEDA, T. Bioreactors for Plant Cell Culture. In: **Comprehensive Biotechnology**, v.2, n.11, p.361-372, 2011
- GEORGIEV, M. I. Design of Bioreactors for Plant Cell and Organ Cultures. In: : PAEK, K.Y., MURTHY, H.N., ZHONG, J.J. (eds). **Production of Biomass and Bioactive Compunds Using Bioreactor Technology**. ed.Springer, 2014, p. 3-15
- GEORGIEV, M. I.; EIBL, R.; ZHONG, J. J. Hosting the plant cells *in vitro*: Recent trends in bioreactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 3787–3800, 2013
- GERALD, L.T.S, LEE, L, L. Biofábrica e sua influência na produtividade de cana-de-açúcar, In: GERALD, L. T. S. (Ed.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. ed. São Paulo: Atiqua, 2011, p.118-133
- GONZÁLEZ, R.; RÍOS, D.; AVILÉS, F.; SÁNCHEZ-OLATE, M. *In vitro* multiplication of *Eucalyptus globulus* by temporary immersion system. **Bosque**, v. 32, n. 2, p. 147–154, 2011
- GORRET, N.; BIN ROSLI, S. K.; OPPENHEIM, S. F.; WILLIS, L. B.; LESSARD, P. A.; RHA, C. K.; SINSKEY, A. J. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. **Journal of Biotechnology**, v. 108, n. 3, p. 253–263, 2004
- JOVA, M. C.; KOSKY, R. G.; CUELLAR, E. E. Effect of liquid media culture systems on yam plant growth (*Dioscorea alata* L. ‘Pacala Duclos’). **Biotechnology, agronomy, society and environment**, v. 15, n. 4, p. 515–521, 2011
- KIM, S. J.; DEWIR, Y. H.; MOON, H. K. Large-scale plantlets conversion from cotyledonary somatic embryos of *Kalopanax septemlobus* tree using bioreactor cultures. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 241–248, 2011

- KROGSTRUP, P. Effect of culture densities on cell proliferation and regeneration from embryogenic cell suspensions of *Picea sitchensis*. **Plant Science**, v.72, n.1, p.115-123, 1990
- LIU, C. Z.; HE, S. S.; ROMERO, R.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Micropropagation of calabash tree *Crescentia cujete* L. In: Jain, S.M., Häggman, H. (eds). **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. ed.Springer, 2007, p.427–436
- MARTRE, P.; LACAN, D.; JUST, D.; TEISSON, C. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.67, n.1, p.25-35, 2001
- MÁXIMO, W. P. F. **Propagação de um híbrido comercial de *Eucalyptus urograndis* em biorreator de imersão temporária (BIT[®])**. 2014.83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014
- MÁXIMO, W. P. F.; SANTOS, P. A. A.; MARTINS, G. S.; MENDONÇA, E. G.; PAIVA, L. V. *In vitro* multiplication of *Eucalyptus* hybrid via temporary immersion bioreactor: culture media and cytokinin effects. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.18, n.2, p.131-138, 2018
- MENDONÇA, E. G.; STEIN, V. C.; CARVALHO, H. H. de; SANTOS, B. R.; BEIJO, L. A.; PAIVA, L. V. The use of continuous, temporary immersion bioreactor system and semisolid culture medium for the production of *Eucalyptus camaldulensis* clones. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 4, p. 1211-1224, 2016
- MOSES, T., MUKUNDAN, U. On-line monitoring plant biomass for large-scale production of *Thymus vulgaris*, a medicinal and culinary herb. **Asian Journal of Experimental Sciences**, 27, 19–28, 2013
- MURCH, S. J.; RAGONE, D.; SHI, W. L.; ALAN, A. R.; SAXENA, P. K. In vitro conservation and micropropagation of breadfruit (*Artocarpus Altilis*, Moraceae). In: **Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. [s.l: s.n.] p. 279–288, 2007
- MURCH, S. J.; LIU, C.; ROMERO, R. M.; SAXENA, P. K. *In vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, n. 1, p. 63–68, 2004
- NASCIMENTO, M. M.; FERREIRA, M. A. C.; MALOSSO, M. G. Produção de mudas de carobinha (*Jacaranda decurrens* Cham.) em sistema de imersão temporária com biorreatores do tipo R.I.T.A. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.2, p.414-417, 2012
- NAWROT-CHORABIK, K. Somatic embryogenesis in forest plants. In: **Embryogenesis**. ed. S. Ken-Ichi (Rijeka: InTech Open Access Publisher, 2012, p. 423–446
- NIEMENAK, N.; NOAH, A. M.; OMOKOLO, D. N. Micropropagation of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) in temporary immersion bioreactor. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, n. 3, p. 383–390, 2013
- NIEMENAK, N.; SAARE-SURMINSKI, K.; ROHSIUS, C.; NDOUMOU, D. O.; LIEBEREI, R. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in

- temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 4, p. 667–676, 2008
- OLIVEIRA, M. L. de; XAVIER, A.; PENCHEL, 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**, v. 35, n. 6, p. 1207–1217, 2011
- OLIVEIRA, M. L. de; XAVIER, A.; PENCHEL, R. M.; SANTOS, A. F. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 39, n. 91, p. 309–315, 2011
- OLIVEIRA, M. L.; XAVIER, A.; FILHO, R. M. P.; DOS REIS, J. P. Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Ciencia Florestal**, 2014
- PALHARES, G. A. Efecto de un análogo de Brasinoesteroides (MH5) en la propagación de *Eucalyptus urograndis* en Biorreactores de Inmersión Temporal. **Cultivos Tropicales**, v. 25, n. 1, p. 30–44, 2013
- PENCHEL, R. M., XAVIER, A.; OTONI, W. C. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotechnology Florestal**. Suprema Gráfica e Editora: Viçosa, 2007, p. 75-92
- PÉREZ, M.; BUENO, M. A.; ESCALONA, M.; TOOROP, P.; RODRÍGUEZ, R.; CAÑAL, M. J. Temporary immersion systems (RITA[®]) for the improvement of cork oak somatic embryogenic culture proliferation and somatic embryo production. **Trees - Structure and Function**, v. 27, n. 5, p. 1277–1284, 2013
- SHAIK, S.; DEWIR, Y. H.; SINGH, N.; NICHOLAS, A. Micropropagation and bioreactor studies of the medicinally important plant *Lessertia* (Sutherlandia) *frutescens* L. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 2, p. 180–186, 2010
- STEINGROEWER, J.; BLEY, T.; GEORGIEV, V.; IVANOV, I.; LENK, F.; MARCHEV, A.; PAVLOV, A. Bioprocessing of differentiated plant *in vitro* systems. **Engineering in Life Sciences**, v. 13, n. 1, p. 26-38, 2013
- TAUTORUS, T. E.; LULSDORF, M. M.; KIKCIO, S. I.; DUNSTAN, D. I. Nutrient utilization during bioreactor culture, and maturation of somatic embryo cultures of *Picea mariana* and *Picea glauca-engelmannii*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.30, n. 1, p. 58-63, 1994
- TEIXEIRA, J. B. Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais - Produção de mudas em larga escala. **Biotechnology Ciência & Desenvolvimento**, n.24. p. 36-41, 2002
- TEIXEIRA, J. B.; BARRUETO CID, L. P. Biorreatores para produção de mudas sem larga escala. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010, 157-176
- TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 31, n. 3, p. 417-426, 2007

TRUEMAN, S. J. Cytokinin and auxin effects on survival and rooting of *Eucalyptus pellita* and *E. grandis* x *E. pellita* cuttings. **Rhizosphere**, v. 6, p. 74-76, 2018

WATT, M. P. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 76, p. 14025-14035, 2012

YANG, L.; QIN, G.; SU, J.; YANG, L. T.; LUO, R. H.; LI, X. Q.; LIN, G. M.; ZOU, Y.; LI, Y. R. Micropropagation of banana (*Musa* AAA *Cavendish* var. Williams B6) in temporary immersion bioreactor system (TIBS). v. 27, n. 6, p.1010-1013, 2010

YOU, X. L.; TAN, X.; DAI, J. L.; LI, Y. H.; CHOI, Y. E. Large-scale somatic embryogenesis and regeneration of *Panax notoginseng*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 108, n. 2, p. 333–338, 2012

EFEITO DO MEIO DE CULTURA SEMI-SÓLIDO E LÍQUIDO NA MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES DE *Eucalyptus* spp.

Resumo - O presente trabalho objetivou avaliar o efeito do meio de cultura semi-sólido e líquido, bem como a possibilidade de uso do meio líquido na multiplicação *in vitro* de um clone de *Eucalyptus urophylla*, três clones de *Eucalyptus dunnii* e dois clones de *Eucalyptus benthamii*. Tufos contendo de seis a oito gemas diferenciadas dos clones estabelecidos *in vitro* foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL meio de cultura JADS, com e sem adição de agente geleificante. Foram avaliadas a produção de brotações, tamanho da maior brotação, vigor, oxidação dos explantes e do meio de cultura, presença ou ausência de raízes e massas fresca e seca após 30 dias da instalação do experimento. A micropropagação de *Eucalyptus* spp. pode ser realizada utilizando-se de meio de cultura semi-sólido ou líquido. O uso de meio líquido resultou em maior incremento de massa fresca e seca dos explantes, taxa de multiplicação e tamanho da maior brotação. Com base nos resultados obtidos, observaram-se respostas diferentes entre os clones em relação ao meio de cultivo utilizado (semi-sólido e líquido) para as características de oxidação do explante, número de brotações e tamanho da maior brotação.

Palavras-chaves: Propagação *in vitro*; sistemas líquidos; consistência do meio; meio de cultura

1. Introdução

A micropropagação tem sido amplamente utilizada como ferramenta para propagação massal de clones em curto espaço de tempo, com controle nutricional, ambiental e fitossanitário, limpeza clonal, transporte do material clonal por grandes distâncias sem danos, intercâmbio de material genético, armazenamento por extenso período e retenção do vigor híbrido (Xavier et al., 2013). As desvantagens dessa técnica incluem: a necessidade de um laboratório de cultura de tecidos, que demanda altos custos de manutenção, exigência de mão-de-obra especializada, a ocorrência de elevadas taxas de contaminação, variação de condições entre e dentro de clones e dificuldade de encontrar o meio adequado para a espécie/clone (Dutra et al., 2009).

Com a necessidade constante de aperfeiçoamento da clonagem e viabilização econômica da produção massal de *Eucalyptus* via micropropagação, novos procedimentos na produção *in vitro* de espécies florestais tem sido aliado na potencialização e redução de custos do cultivo vegetal, em laboratórios de cultura de tecidos vegetais. No sistema tradicional de produção de plantas *in vitro* o meio de cultura utilizado é semi-sólido com a adição de agentes gelificantes. Quando alteradas as características físicas do meio, alteram-se os parâmetros de absorção e disponibilidade de nutrientes e fitorreguladores, influenciando assim o desenvolvimento da planta.

Geralmente a quantidade de nutrientes varia com a presença ou ausência de agentes gelificantes no meio de cultivo, sendo exigido o uso de maior quantidade na preparação do meio semi-sólido do que no meio líquido. Os explantes *in vitro*, na maioria dos casos, não possuem raízes, dificultando a absorção e disponibilidade de nutrientes. Outro fator a ser considerado na utilização do meio de cultura semissemi-sólido é o alto custo gerado pela adição do agente gelificante (Mohamed et al., 2009; Kaur et al., 2015; Kadam et al. 2018).

O uso de meio líquido em processos de micropropagação tem sido considerado uma solução recomendada visando à redução dos custos de produção de porpágulos, assim como nas situações aonde pretende-se automatizar o processo (Aitken-Christie, 1991; Watt, 2012). De fato, sistemas de cultura líquido proporcionam condições muito mais uniformes de distribuição de nutrientes e água, melhorando a nutrição e a taxa de crescimento, acelerando o processo (Gupta, 2005; Preece, 2010; Teixeira, 2011; Watt, 2012). O meio pode facilmente ser renovado sem alterar o recipiente, possibilidade de esterilização por ultrafiltração, bem como a limpeza do recipiente após do uso é facilitada. Com a adoção do meio de cultura líquido na propagação *in vitro*, recipientes maiores podem ser utilizados, otimizando a produção em escala (Berthouly e Etienne, 2005; Teixeira, 2011).

Outras vantagens do meio líquido sobre o meio semi-sólido são relacionadas à possibilidade de taxas de crescimento mais rápidas, maior número de brotações e menor ocorrência de distúrbios fisiológicos no desenvolvimento das plantas (Singh, 2018). Salla et al. (2017), testando meio semi-sólido e líquido na organogênese de *Eucalyptus globulus*, concluíram que o meio líquido foi mais eficiente na promoção da multiplicação de brotos, resultando num sistema menos dispendioso e menos laborioso, com menor produção de compostos fenólicos e, portanto, mais útil para

regeneração de plantas de *Eucalyptus* geneticamente modificadas. Trueman et al. (2018) citam que a introdução e a proliferação de brotos de *Eucalyptus* via micropropagação são geralmente realizadas em meios semi-sólidos incorporando agentes geleificantes; no entanto, meios líquidos têm sido considerados alternativas mais adequadas para diferentes espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia*.

Do ponto de vista fisiológico, o uso de meio líquido na propagação *in vitro* pode causar a hiperhidricidade, considerada a desordem mais grave em sistemas de cultura líquidos (Gerald e Lee, 2011; Teixeiras, 2011; Tabart et al., 2015), dificultando a aclimação das plantas na condição *ex vitro* (Teixeiras, 2011). Como forma de atenuar tais efeitos, Singh (2018) comparando o meio líquido com semi-sólido, em sistemas de imersão temporária, obteve melhor proliferação e alongamento de brotos com o uso de “suportes de papel-filtro”, minimizando os efeitos da hiperhidricidade em *Jatropha curcas*. Também Godoy et al. (2017), testando meio semi-sólido e líquido em biorreator de imersão temporal, concluíram que o meio líquido mostrou-se viável, com maior eficiência e mais rápido como sistema de propagação de *Prunus avium*, quando comparado ao uso de meio semi-sólido.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a influência da consistência do meio de cultura na micropropagação de seis clones de *Eucalyptus* spp., a fim de buscar uma alternativa ao uso de substâncias gelificantes.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal

Para a obtenção dos explantes utilizados no presente trabalho, foram utilizadas explantes de 6 clones de *Eucalyptus* spp., sendo um clone de *Eucalyptus urophylla* (C1), 3 clones de *Eucalyptus dunnii* (C2, C3 e C6) e 2 clones de *Eucalyptus benthamii* (C4 e C5). Esses explantes dos referidos clones de *Eucalyptus* spp. foram obtidos a partir do banco clonal *in vitro*, estabelecidos via micropropagação, localizado no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa – UFV, localizado no município de Viçosa, Minas Gerais.

Para multiplicação dos explantes, foram utilizados tufos contendo de seis a

oito gemas diferenciadas, cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL meio de cultura JADS (Correia et al., 1995), suplementado com mio-inositol ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), ágar (7 g L^{-1}), sacarose (30 g L^{-1}), $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (6 - benzilaminopurina), $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA (ácido α -naftalenoacético) e PVP ($0,8 \text{ g L}^{-1}$), com pH ajustado para $5,8 \pm 0,01$ antes da adição do ágar. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min.

No cultivo dos clones, via micropropagação, as condições ambientais da sala de crescimento do laboratório foram mantidas com temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e com fotoperíodo de 16 h, com irradiância de $33 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (quantificada por radiômetro LI-COR®, LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram®, Brasil).

2.2. Tratamentos: meio semi-sólido e líquido

Após 30 dias em meio de cultivo para multiplicação, os tufo contendo de seis a oito gemas diferenciadas foram transferidos para tubos de ensaio contendo dois tipos de meio: 1) sistema tradicional de meio semi-sólido com uso de ágar; 2) meio líquido com papel de filtro (pontes de papel) para evitar imersão do explante no meio (Figura 1).

Em cada tubo de ensaio foi adicionado 10 mL de meio de cultura JADS (Correia et al., 1995), suplementado com mio-inositol ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), ágar (7 g L^{-1}), sacarose (30 g L^{-1}), $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (6 - benzilaminopurina), $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA (ácido naftalenoacético) e PVP ($0,8 \text{ g L}^{-1}$), com pH ajustado para $5,8 \pm 0,01$ antes da adição do ágar (meio semi-sólido). O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min.

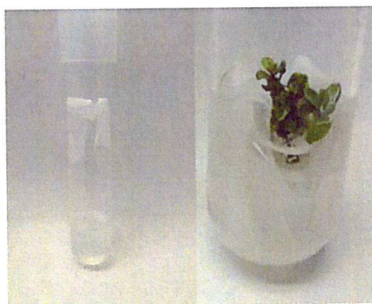


Figura 1. Uso de pontes de papel para multiplicação de brotações de *Eucalyptus* spp. em meio de cultura líquido.

2.3. Avaliações experimentais e análise dos dados

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2x6, com dois tratamentos (semi-sólido e líquido) e seis clones. Para cada tratamento foram utilizadas 4 repetições de 5 tubos cada e um explante por tubo, constituindo-se os tratamentos com a adição (semi-sólido) e sem adição (líquido) do ágar ao meio nutritivo. Após 30 dias da instalação do experimento, foram avaliadas a produção de brotações, tamanho da maior brotação, vigor, oxidação dos explantes e do meio de cultura, presença ou ausência de raiz, massas fresca e seca dos explantes. Para as características vigor, oxidação dos explantes e do meio de cultura, presença ou ausência de raiz, adotou-se uma escala conforme indicado na Tabela 1. A fim de se atender os pressupostos da análise de variância, utilizou-se a transformação “raiz quadrada de $x + 0,5$ ”. Sempre que identificada significância das fontes de variação pelo teste F na análise de variância ($p \leq 0.05$) realizou-se comparações múltiplas entre as médias pelo teste Tukey ($p \leq 0.05$). Todas as análises foram feitas com o auxílio do software R e pacote ExpDes.pt. (Ferreira et al., 2013).

Tabela 1 - Escala de notas para a classificação das características avaliadas quanto ao vigor, da oxidação do meio, oxidação dos explantes e presença e ausência de raiz em cultivo *in vitro* pela micropropagação de seis clones de *Eucalyptus* spp.

Características	Descrição da pontuação designada
Vigor das brotações	0 - Baixo - senescência e morte das brotações 1- Ruim - brotações com clorose, baixa multiplicação e alto grau de hiperhidricidade 2- Médio - brotações sem clorose, com baixo grau de hiperhidricidade 3 - Ótimo - brotações com alta multiplicação, sem clorose, sem hiperhidricidade
Oxidação do meio	0 - Nula - sem oxidação 1 - Baixa - meio com coloração amarelo claro 2 - Média - meio com coloração amarelo escuro 3 - Alta - meio de cultura completamente oxidado com tom acinzentado
Oxidação do explante	0 - Nula - sem oxidação 1 - Baixa - reduzida oxidação na base dos explantes 2 - Média - coloração ligeiramente amarelada nos explantes 3- Total - oxidação completa dos explantes (tom amarelo escuro)
Presença de raiz	0 - sem presença de raiz 1 - com presença de raiz

3. Resultados

De acordo com os resultados obtidos, houve interação significativa ($p < 0,05$)

(Tabela 2) dos clones em relação ao meio de cultivo para as características de oxidação do explante, número de brotações e tamanho da maior brotação.

Tabela 2. Resumo da ANOVA para as características avaliadas de vigor, oxidação do meio, oxidação dos explantes, número de brotações e comprimento da maior brotação por explante de seis clones de *Eucalyptus* spp., aos 30 dias após a inoculação, em função do tipo de meio (semi-sólido ou líquido) utilizado.

FV	GL	Vigor	Oxidação do explante	Oxidação do meio	Número de brotações	Tamanho maior brotação
Meio de Cultivo	1	0,4021ns	0,1104 ns	0,4058 *	7e-04 ns	0,0067 ns
Clone	5	0,8802 *	0,7264 *	0,6051 *	10,7151 *	0,6858 *
Meio x Clone	5	0,1309ns	0,2278 *	0,0419ns	2,7269 *	0,2463 *
Resíduo	##	0,1595	0,0738	0,0473	0,6499	0,0492
(%)		30,112	23,590	19,731	40,571	20,748

*e ^{ns}: significativo e não significativo ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$), pelo teste F.

O meio semi-sólido apresentou maior oxidação do meio quando comparado ao uso do meio líquido. Quanto aos resultados obtidos dos clones em relação à avaliação do vigor e oxidação do meio de cultivo, os materiais genéticos que apresentaram maior vigor foram os que apresentaram maiores valores de oxidação do meio (Tabela 3). Analisando os diferentes clones testados quanto à oxidação do meio de cultivo, os clones C1 e C5 não apresentaram diferença quanto ao meio utilizado, mantendo taxa de vigor de média a alta. C1 foi o clone que mais oxidou o meio e obteve maior vigor e C5 o de menores taxas de oxidação e vigor. Já os clones C2, C3 e C4 apresentaram maiores taxas de oxidação e vigor no meio semi-sólido.

A oxidação dos explantes foi menor no meio líquido para os clones C2, C4 e C6, para os demais o meio semi-sólido proporcionou menor taxa oxidativa sobre os explantes.

O clone 1 alcançou o maior número de explantes no meio líquido em comparação ao meio semi-sólido, assim como o maior tamanho de brotação (Tabela 4). Já o clone 6 obteve maior número e tamanho de brotação no meio semi-sólido. Comparando o uso de meio semi-sólido ou líquido para os demais clones, estes não apresentaram diferenças na emissão de brotações nem para tamanho da maior brotação. O clone 1 foi superior aos demais clones avaliados no meio líquido, tanto em número quanto em tamanho de brotações. No meio semi-sólido, os clones C1, C2 e C3 apresentaram maior número de brotações e tamanho da maior brotação.

Tabela 3. Vigor e oxidação do meio de cultivo de seis clones de *Eucalyptus spp.* aos 30 dias após a inoculação, em função do tipo de meio (semi-sólido ou líquido) utilizado.

Clones	Vigor	Oxidação meio
C1	1,43 a	1,28 a
C2	1,37 ab	1,17 ab
C3	1,44 a	1,10 bc
C4	1,15 b	0,97 cd
C5	1,13 b	0,95 d
C6	1,44 a	1,14 ab

Obs.: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Tabela 4. Número de explantes (A) e tamanho da maior brotação (B) de seis clones de *Eucalyptus spp.*, aos 30 dias após a inoculação, em função do tipo de meio de cultivo (semi-sólido ou líquido) utilizado.

(A) Número de explantes			(B) Tamanho maior brotação (cm)		
Clones	Meio		Clones	Meio	
	Líquido	Semi-sólido		Líquido	Semi-sólido
C1	3,1857 Aa	2,5495 Ba	C1	1,4228 Aa	1,1578 Ba
C2	2,096 Ab	2,5516 Aa	C2	1,0883 Ab	1,1930 Aa
C3	1,6666 Ab	1,567 Aa	C3	0,9763 Ab	1,0221 Aa
C4	1,7435 Ab	1,5543 Ab	C4	0,9857 Ab	0,9290 Aab
C5	1,6941 Ab	1,3977 Ab	C5	0,9857 Ab	0,9140 Ab
C6	1,5264 Bb	2,3123 Ab	C6	0,9874 Bb	1,1668 Ab

Obs.: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não se diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de significância.

Foram encontradas diferenças de massa fresca e massa seca dos explantes em relação ao meio utilizado, ao clone com o meio e entre os clones (Tabela 5). As maiores médias foram conseguidas entre clones e dentro dos clones no meio líquido. No meio semi-sólido a média de massa fresca foi de 0,20 mg e massa seca 0,03 mg. Já no meio líquido a média da massa fresca foi de 0,45 mg e massa seca de 0,05 mg (Tabela 6).

Tabela 5. Resumo da ANOVA para as características avaliadas de massa fresca e massa seca dos explantes de seis clones de *Eucalyptus* spp., aos 30 dias após a inoculação, em função do tipo de meio (semi-sólido ou líquido) utilizado.

FV	GL	Massa fresca	Massa seca
Meio de cultivo	1	0,5402*	0,0025*
Clone	5	0,3082*	0,003*
Meio x Clone	5	0,1592*	0,0017*
Resíduo	24	0,0303*	0,0002*
CV(%)		53,71	28,47

Obs.: *e ^{ns}: significativo e não significativo em nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$) pelo teste F.

Os clones C1 e C4 apresentaram maior massa fresca e massa seca dos explantes no meio líquido em relação com o meio semi-sólido e foram superiores nesse meio quando comparados aos demais materiais genéticos (Tabela 6). Os outros clones não diferiram quanto ao uso de meio semi-sólido ou líquido, na multiplicação, quanto ao massa seca e massa fresca dos explantes.

Tabela 6. Massa fresca (A) e massa seca (B) dos explantes de clones de *Eucalyptus* spp. aos 30 dias após a inoculação, em função do tipo de meio (semi-sólido ou líquido) utilizado.

(A) Massa fresca			(B) Massa Seca		
Clones	Meio de Cultivo		Clones	Meio de Cultivo	
	Líquido	Semi-sólido		Líquido	Semi-sólido
C1	0,89 Aa	0,45Ba	C1	0,09Aa	0,06Ba
C2	0,42 Ab	0,21Aa	C2	0,06Ab	0,03Bab
C3	0,27 Ab	0,07Aa	C3	0,02Ac	0,01Ab
C4	0,91 Aa	0,13Ba	C4	0,09Aa	0,02Bb
C5	0,13 Ab	0,27Aa	C5	0,04Bbc	0,07Aa
C6	0,08 Ab	0,08Aa	C6	0,02Ac	0,02Ab

Obs.: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não se diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de significância.

4. Discussão

Quanto aos clones utilizados, verificou-se diferenças significativas entre e dentro destes quanto às características avaliadas e a presença ou ausência do agente

gelificante. Estes resultados demonstram que na micropropagação há interação entre o material genético e o ambiente, indicando que os clones variam sua resposta dependendo das condições *in vitro* a que são submetidos. Estas variações em relação clone-ambiente são observadas na multiplicação *ex vitro* e em testes clonais. Alterações de resposta de diferentes genótipos à multiplicação *in vitro* foram observadas por Sotelo e Monza (2007), buscando um protocolo de micropropagação de clones adultos de *Eucalyptus globulus* sub. *maidenii*, observando que apenas 5 clones de um total de 58 avaliados apresentaram resposta à multiplicação *in vitro*, evidenciando que o genótipo tem efeito direto nesta variação. Resultados semelhantes também foram obtidos por Correia et al. (1995), trabalhando com a multiplicação de diferentes clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, onde observou variação dentro e entre dos materiais genéticos avaliados em meios de cultura líquido e semi-sólido.

Oliveira et al. (2016) observaram diferenças entre 5 clones de *Eucalyptus globulus* quanto à produção média de tufo de brotações ao longo dos subcultivos. Essa variação de resposta ao crescimento *in vitro* dos clones pode estar relacionada com as características morfológicas do explante, número de subcultivos, capacidade de absorção de nutrientes alterada pela adição do agente gelificante, idade fisiológica e ontogenética do explante utilizado na indução na condição *in vitro*, bem como da constituição genética das diferentes espécies e clones utilizados. Com isso pode-se inferir que a modificação de características morfológicas específicas pode alterar a resposta ao cultivo *in vitro*, podendo ser utilizada para melhorar o desempenho dos materiais frente às diferentes fases do processo de micropropagação, desde que não seja uma característica genética. Estas respostas a modificações morfológicas serão dependentes do clone que pode responder de forma específica e diferenciada.

Oliveira et al. (2011) comparando meio de cultura semissemi-sólido e líquido em sistema de biorreatores com *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, observou heterogeneidade no desenvolvimento dos explantes, em todas as características avaliadas. O cultivo em meio líquido foi superior ao meio semi-sólido em todas as características de crescimento avaliadas nos três períodos de cultivo estudados e promoveu maior ganho em massa fresca e em número de brotos por explantes em comparação ao cultivo em meio semissemi-sólido.

Comparando a produtividade (número de explantes e tamanho da maior brotação) com o uso dos dois meios (semi-sólido e líquido), observou-se que os clones com maior produção obtiveram maior tamanho de brotações. Demonstrando maior facilidade de alguns clones quanto à multiplicação e alongamento *in vitro* e maior aproveitamento dos nutrientes e reguladores de crescimento. Também se constatou que o número de brotações e o tamanho da maior brotação do meio líquido foi superior ao meio semi-sólido. Desta forma, estes resultados mostraram que o uso de meio líquido apresenta vantagens em comparação com o meio semi-sólido, podendo estar relacionado à maior facilidade de absorção de nutrientes, maior uniformidade e melhor aproveitamento do meio (Gupta e Timmis, 2005; Lemos et al., 2001; Berthouly e Etienne, 1997; Gupta, 2005; Preece 2010; Teixeiras 2011; Watt, 2012).

Na literatura, trabalhos como de Oliveira et al. (2011) constataram que o cultivo em biorreator (meio líquido) foi superior ao cultivo em ágar para o número de brotações para o clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* utilizado. Este padrão também foi relatado por McAlister et al. (2005), em que o cultivo em meio semisemi-sólido apresentou brotações menores e taxa de multiplicação inferior, comparativamente ao cultivo em inersão temporária. Businge et al. (2017) relatam aumento de 5,8 vezes na taxa de multiplicação quando cultivados em meio líquido em biorreatores em comparação com o meio de cultura semi-sólido.

Clones com maior vigor apresentaram maior oxidação do meio, indicando percentuais diferenciados de absorção de nutrientes do meio, alteração de pH e produção de substâncias oxidativas pelo aumento da taxa de multiplicação.

Vários trabalhos têm relatado resultados melhores de massas fresca e seca em meio líquido, comparativamente ao semi-sólido. Reis et al. (2003) obtiveram incremento de 8 vezes na massa fresca de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivados em biorreatores. Correia et al. (1995) mostraram que os resultados obtidos indicaram heterogeneidade para massas fresca e seca nos sistemas semi-sólido e líquido, podendo ser explicados pela variabilidade genética, pela especificidade nutricional do meio de cultura para com a cultura e pelos fatores ambientais de crescimento.

De modo geral, as respostas dos clones à multiplicação *in vitro* em meio semi-sólido e líquido mostraram-se satisfatórias, apesar de haver diferenças entre os materiais genéticos e o meio utilizado. Várias são as técnicas de propagação clonal

atualmente utilizadas *in vitro* para pesquisas e/ou comercialmente em espécies florestais. Dentre elas está a micropropagação em meio semi-sólido em potes, a embriogênese somática e os micropropagação em meio líquido em biorreatores. Os resultados obtidos para os clones demonstram a possibilidade do uso desses materiais em meio líquido. Oliveira et al. (2011) e Businge et al. (2016) constataram que o cultivo em biorreator foi superior ao cultivo em ágar para o crescimento em massa fresca.

Estudos que busquem definir ajustes melhores e mais específicos nos meios de cultura são imprescindíveis para maximizar os resultados de micropropagação de clones híbridos de *Eucalyptus* spp.

5. Conclusões

Com base nos resultados obtidos neste trabalho para os seis clones de *Eucalyptus* spp. avaliados, pode-se concluir que: 1) o uso de meio líquido apresenta-se como alternativa na propagação *in vitro* de clones *Eucalyptus* spp.; 2) clones *in vitro* apresentam diferenças de crescimento com o uso de meio líquido ou meio semi-sólido; e 3) os incrementos de massa fresca, multiplicação e tamanho da maior brotação são maiores em meios líquidos.

6. Bibliografia

- AITKEN-CHRISTIE, J. Automation In: DEBERGH, P.C.; ZIMMENNANN, R.H. (Ed.). **Micropropagation - Technology and Application**, Kluwer Academic Publishers, 1991, p. 363-388.
- BERTHOULY, M.; ETIENNE, H. Temporary immersion system: A new concept for use liquid medium in mass propagation. In : HVOSLEF-EIDE, A. K.; PREIL, W. (Ed.). **Liquid culture systems for in vitro plant propagation**. Dordrecht : Springer [Pays-Bas], 2005, p. 165-195.
- BUSINGE, E.; TRIFONOVA, A.; SCHNEIDER, C.; RÖDEL, P.; EGERTSDOTTER, U. Evaluation of a new temporary immersion bioreactor system for micropropagation of cultivars of *Eucalyptus*, birch and fir. **Forests**, v. 8, n. 6, 2017
- CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. Z. DO; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e semi-sólido no desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. IPEF, v. 48, n. 49, p. 107-116, 1995

- DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A Micropropagação de Eucalipto. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v. 58, p. 49-59, 2009
- GERALD, L. T. S.; LEE, L. L. . Biofábrica e sua influência na produtividade de cana-de-açúcar. In: GERALD, L. T. S. (Ed.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. ed. São Paulo: Atiqua, 2011, p.118-133.
- GODOY, S.; TAPIA, E.; SEIT, P.; et al. Temporary immersion systems for the mass propagation of sweet cherry cultivars and cherry rootstocks: development of a micropropagation procedure and effect of culture conditions on plant quality. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 53, n. 5, p. 494–504, 2017
- GUPTA, P. K.; TIMMIS, R. Mass propagation of conifer trees in liquid cultures - Progress towards commercialization. **Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation**. p.389–402, 2005
- KADAM, D. D.; CHHATRE, A. A.; LAVALE, S. A.; SHINDE, N. A. Low-Cost Alternatives for Conventional Tissue Culture Media. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 4, p. 2523–2529, 2018
- KAUR, A.; SANDHU, J. S. High throughput *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from spindle leaf roll segments: Cost analysis for agribusiness industry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 1, p. 339–350, 2015
- LEMONS, E. E. P. DE; FERREIRA, M. D. S.; ALENCAR, LIDUÍNA MARIA CALHEIROS DE OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de banana cv. terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 482–487, 2001
- MCALISTER, B.; FINNIE, J.; WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA[®]) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA). **Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation**. p.425–442, 2005
- MOHAMED, M. A. H.; ALSADON, A. A.; AL MOHAIDI, M. S. Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micro-propagation. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 12–16, 2009
- OLIVEIRA, M. L.; XAVIER, A.; PENCHEL, R. M.; SANTOS, A. F. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissemi-sólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis**, v. 39, p. 309–315, 2011
- OLIVEIRA, L. S. D., XAVIER, A., LOPES, A. P., TAKAHASHI, E. K., & OTONI, W. C. In Vitro Multiplication And Elongation of Hybrid Clones of *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 235–247, 2016
- PREECE, J. E. Micropropagation in stationary liquid media. **Propagation of Ornamental Plants**, Vol.10, n.4, p.183-187, 2010
- REIS, J, P.; MORAIS, P. B.; PENCHEL, R.; HENRIQUE, A. Micropropagação de eucalipto no sistema de imersão temporária. Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas. **Anais....** p.276, 2003
- SALLA, T. D.; SILVA, C. DOS S.; MACHADO, K. L. D. G.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Non-aerated liquid culture promotes shoot organogenesis in *Eucalyptus globulus* Labill. **Journal of Forestry Research**, v. 29, n. 3, p. 623–629, 2018

- SOTELO, M.; MONZA, J. Micropropagation of *Eucalyptus maidenii* elite trees. **Agrociencia**, v. 9, n. 1, p. 81–89, 2007
- KAUR, A.; SANDHU, J. S. High throughput *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from spindle leaf roll segments: Cost analysis for agribusiness industry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 1, p. 339–350, 2015
- SINGH, A. Efficient Micropropagation Protocol for *Jatropha Curcas* Using Liquid Culture Medium. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 89–94, 2018
- TABART, J.; FRANCK, T.; KEVERS, C.; DOMMES, J. Effect of polyamines and polyamine precursors on hyperhydricity in micropropagated apple shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 1, p. 11–18, 2015
- TEIXEIRA, J. B. Biorreator de imersão temporária – O futuro da produção industrial de plantas *in vitro*. In: GERALD, L. T. S. (Ed.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. ed. São Paulo: Atiqua, 2011, p.41-52.
- TRUEMAN, S. J.; RICHARDSON, D. M. In vitro propagation of *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (Myrtaceae) via cytokinin-free node culture. **Australian Journal of Botany**, v. 55, n. 4, p. 471–481, 2007
- WATT, P. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. **African Journal Of Biotechnology**, v. 11, n. 76, p 14025-14035, 2012

SELEÇÃO GENÉTICA DE CLONES DE *Eucalyptus* spp. EM AMBIENTE DE TROCAS GASOSAS *in vitro* VIA MICROPROPAGAÇÃO

Resumo- Novos sistemas de propagação *in vitro* necessitam ser estudados, buscando inovar o processo da micropropagação em larga escala na propagação de *Eucalyptus* spp., bem como de outras espécies de interesse ao mercado florestal. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de trocas gasosas, o comportamento de diferentes clones e a interação genótipo x ambiente, na multiplicação e alongamento *in vitro* de brotações de dez clones de *Eucalyptus* spp. via micropropagação. Explantes de dez clones de *Eucalyptus* foram cultivados em dois ambientes (com e sem membrana) em meio semi-sólido JADS, em duas fases do processo de micropropagação (multiplicação e alongamento). As características avaliadas nas duas fases foram a oxidação do meio de cultura, o tamanho da maior brotação, o número total de brotações e o número de brotações maior que 2 cm, além da presença de raízes. Os dados obtidos foram submetidos ao Modelo #51 do software SELEGEN-REML/BLUP (Resende 2016) e análise de deviance (LRT). Dos dois ambientes testados, a não utilização de membrana (sem trocas gasosas) foi o ambiente mais favorável para a propagação *in vitro* dos genótipos avaliados. Existe efeito dos genótipos para as características avaliadas, nas duas fases, permitindo a seleção e classificação de clones de *Eucalyptus* spp. na micropropagação. Os clones de *Eucalyptus benthamii* obtiveram melhor desempenho em comparação com os outros clones estudados.

Palavras-chaves: Cultura de Tecidos, propagação *in vitro*, propagação fotoautotrófica.

1. Introdução

A micropropagação tem sido considerada como técnica de rejuvenescimento/revigoramento de clones selecionados para atender demandas da produção de mudas para estabelecimento de minijardins clonais, limpeza clonal, transporte do material clonal por grandes distâncias sem danos, assim como no intercâmbio de material genético, a nível nacional e internacional, além de proporcionar condições de manutenção de banco clonal nas condições *in vitro* de

clones (Xavier et al., 2013). Outro importante uso que vem aumentando estudos nos últimos anos são jardins clonais *in vitro* (Brondani et al., 2012; Oliveira et al., 2015), eliminando assim os fatores ambientais alternantes que existem nas condições dos viveiros florestais. No entanto, uma das maiores limitações no uso da micropropagação, a nível comercial, tem sido a aclimação do material vegetal na condição *ex vitro*. Nesse sentido, visando a melhoria desta fase da produção de mudas micropropagadas, tem sido sugerido adequar a micropropagação realizada no laboratório às condições que facilitem sua aclimatização e sobrevivência *ex vitro*, aumentando as taxas de sobrevivência e, assim, reduzindo os custos (Xiao et al., 2011; Dias et al.; 2014). Uma das estratégias estudadas e adotadas atualmente refere-se à propagação fotoautotrófica.

O sistema de micropropagação convencional em recipientes fechados é caracterizado por elevada umidade relativa, alta concentração de etileno e baixos níveis de CO₂, que determinam problemas anatômicos, baixa atividade fotossintética e problemas na climatização *ex vitro* (Xiao et al., 2011; Alvarez et al., 2012, Arencibia et al., 2013). As vantagens dos sistemas de micropropagação fotoautotrófica, usando pequenos recipientes convencionais com membranas e grandes recipientes com ventilação forçada, são descritos para várias espécies lenhosas como, por exemplo, acácia (*Acacia mangium*), café (*Coffea arabusta*), *Eucalyptus* (*Eucalyptus camaldulensis*), mangostão (*Garcinia mangostana*), nim (*Azadirachta indica*), paulownia (*Paulownia fortunei*) e pinus (*Pinus radiata*) (Kozai et al., 2001; Kaur et al., 2015). Nestas espécies, foi verificado um maior crescimento de explantes clorofilados em condições fotoautotróficas em relação à condição convencional fotomixotrófica na condição *in vitro*. Porém, com exigência de um aumento na concentração de CO₂, advindo de uma combinação de filtros e enriquecimento de CO₂ na sala de crescimento no laboratório de cultura de tecidos.

O uso de sistemas utilizando tampas com membranas porosas com ventilação natural ou ventilação forçada (Iarema et al., 2012; Pinheiro et al., 2013; Saldanha et al., 2013) têm proporcionado, com sucesso, redução da umidade relativa do ar no interior dos frascos de cultivo e aumento significativo das trocas gasosas com a atmosfera exterior. Conseqüentemente, ocorre aumento na transpiração e a efetiva absorção de água e nutrientes pela planta, melhorando seu processo de aclimatização *ex vitro* (Xiao et al., 2011; Kaur, 2015).

Na otimização de protocolos, sabe-se que vários fatores interferem no potencial de resposta do material a diferentes condições *in vitro*, entre eles está o genótipo (Watt, 2014). A capacidade de micropropagação, na maioria dos casos, tem alta variação de acordo com o genótipo, sendo seu uso seriamente ponderado de acordo aos objetivos finais e às particularidades do material vegetal para satisfazer as metas desejadas (Park et al., 2016).

Alterações de resposta de diferentes genótipos à produção *in vitro* têm sido observadas na micropropagação de clones de *Eucalyptus* spp. (Sotelo e Monza, 2007; Oliveira et al., 2011; Oliveira et al., 2016), exigindo a otimização e implementação de protocolos específicos de clones (Watt et al., 2003). Porém, devido aos custos e tempo necessário ao desenvolvimento de protocolos individuais, os laboratórios precisam decidir se aperfeiçoam o protocolo para cada clone na produção ou usam um protocolo geral e aceitam o rendimento do material *in vitro* (Watt, 2014).

Objetivou-se, com o presente estudo, avaliar o efeito de trocas gasosas, o comportamento de diferentes clones e a interação genótipo x ambiente, na multiplicação e alongamento *in vitro* de dez clones de *Eucalyptus* spp. em sistema de micropropagação.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal e condições *in vitro*

Para a obtenção dos explantes utilizados no presente trabalho, foram utilizadas explantes de 12 clones de *Eucalyptus* spp. (Tabela 1) propagados *in vitro* em fase de multiplicação no banco clonal do Laboratório de Cultura de Tecidos – LCT II, do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa – UFV, localizado no município de Viçosa, Minas Gerais.

Foram utilizados tufos contendo de seis a oito gemas diferenciadas, os quais foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL meio de cultura JADS (Correia et al., 1995) suplementado com mio-inositol 0,1 g L⁻¹, ágar 7 g L⁻¹, sacarose 30g L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹ de BAP (6 -benzilaminopurina), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido α -naftalenoacético) e PVP 0,8 g L⁻¹, com pH ajustado para 5,8 \pm 0,01 antes da adição do ágar, e com o meio de cultura esterilizado em autoclave a uma pressão de 1,5 atm

e temperatura de 121 °C por 20 min.

Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h, com irradiância de 33 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (quantificada por radiômetro LI-COR®, LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram®, Brasil).

Tabela 1. Identificação dos clones de *Eucalyptus* spp. e suas origens genéticas utilizadas no presente estudo.

Clone	Origem genética
C1	<i>Eucalyptus urophylla</i>
C2	<i>Eucalyptus urophylla</i>
C3	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) x <i>E. viminalis</i>
C4	<i>Eucalyptus dunnii</i>
C5	<i>Eucalyptus dunnii</i>
C6	<i>Eucalyptus dunnii</i>
C7	<i>Eucalyptus benthamii</i>
C8	<i>Eucalyptus benthamii</i>
C9	<i>Eucalyptus dunnii</i>
C10	<i>Eucalyptus dunnii</i>
C11	<i>Eucalyptus urophylla</i>
C12	<i>Eucalyptus dunnii</i>

2.2. Trocas gasosas na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus* spp.

Nesse estudo, foi utilizado como material experimental 10 clones (Tabela 1) provenientes da fase de multiplicação *in vitro* da micropropagação por proliferação de gemas axilares: C1, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10 e C12. Após 30 dias em meio de cultivo para multiplicação, os tufo contendo de seis a oito gemas diferenciadas foram transferidos para frascos de vidro (250 mL), contendo 60 ml de meio de cultura, sendo submetidos a duas formas de vedação: tampas rígidas de polipropileno, ou seja, sem trocas gasosas; e tampas de polipropileno com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas de 0,45 μm (MilliSeal® AVS-045 Air Vent), possibilitando as trocas gasosas. O meio de cultura utilizado foi o JADS, com 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,8 g L⁻¹ de PVP, 0,5 mg L⁻¹ de BAP (6 - benzilaminopurina), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) e 5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado em 5,8 antes da adição do ágar, e autoclavado a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C, por 20 min. Os

frascos de vidro foram mantidos por 30 dias em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h.

Adotou-se o delineamento inteiramente ao acaso com dois tratamentos (com e sem membrana), 10 parcelas (clones) e cinco repetições por parcela. Cada repetição era composta por um frasco com quatro explantes, foi obtida a média destes.

2.3. Trocas gasosas no alongamento *in vitro* de clones de *Eucalyptus* spp.

Foi utilizado como material experimental 10 clones (Tabela 1) provenientes da fase de multiplicação *in vitro* da micropropagação por proliferação de gemas axilares: C1, C2, C3, C6, C7, C8, C9, C10, C11 e C12. Após 30 dias em meio de cultivo para multiplicação, os tufo contendo de seis a oito gemas diferenciadas foram transferidos a condições semelhantes à fase de multiplicação, diferindo apenas nos reguladores de crescimento adicionados no meio de cultura. Para o alongamento das brotações, utilizou-se, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB.

Adotou-se o delineamento inteiramente ao acaso com dois tratamentos (com e sem membrana), 10 parcelas (clones) e cinco repetições por parcela. Cada repetição foi composta por um frasco com quatro explantes.

2.4. Avaliações experimentais

Ao final de 30 dias, das fases de multiplicação e alongamento, foram avaliados o vigor dos brotos, oxidação do meio de cultura, tamanho da maior brotação, número total de brotações e o número de brotações maior que 2 cm, além da presença ou ausência de raízes. Para avaliação do vigor e da oxidação do meio de cultura, utilizou-se uma escala de notas, variando de 1 (Baixo), 2 (Médio) e 3 (Alto).

Os dados obtidos foram submetidos ao Modelo #51 do software livre SELEGEN-REML/BLUP (Resende, 2016), utilizado para cada uma das 6 variáveis:

$$y = Xr + Zg + Wp + Ti + \varepsilon,$$

Em que: y é o vetor de dados (ora Vigor, Oxidação, Número de brotações, Número de brotações acima de 2 cm, Presença ou ausência de raiz ou Tamanho da maior brotação); r é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos

como fixos) somados à média geral; g é o vetor dos efeitos genotípicos de clones (assumidos como aleatórios); p é o vetor dos efeitos de parcela (aleatórios); i é vetor dos efeitos da interação genótipo \times ambiente (aleatórios), sendo quatro ambientes considerados: Fase de alongamento e fase de multiplicação em condições de com e sem trocas gasosas; e ε é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios). A letra maiúscula X representa a matriz de incidência sobre os efeitos fixos, e as letras maiúsculas Z , W e T representam as matrizes de incidência para os referidos efeitos de natureza aleatória.

A estrutura de variância do efeito aleatório de genótipos ou clones é dada por, $g \sim N(0, I\sigma_g^2)$, sendo I uma matriz identidade de ordem 10×10 , logo, os clones foram considerados como não aparentados; a estrutura de variância do efeito aleatório de parcelas é dada por $p \sim N(0, I\sigma_{parc}^2)$; a estrutura de variância do efeito aleatório da interação é dada por $i \sim N(0, I\sigma_{int}^2)$; e finalmente, a estrutura de variância do resíduo de parcelas é dada por $\varepsilon \sim N(0, I\sigma_\varepsilon^2)$. Por meio da estimativa REML (Restricted Maximum Likelihood) dos componentes de variância supracitados, da variância do erro de predição (PEV) e média geral de variável avaliada (\bar{y}), foram obtidos os parâmetros genéticos.

Efetivou-se uma medição simultânea de estabilidade, adaptabilidade e produtividade pela média harmônica do desempenho relativo dos valores genotípicos (PRVG e MHVG), bem como realizou-se análise de deviance, via teste da razão de verossimilhança (LRT) (Resende, 2016).

3. Resultados

De acordo as análises apresentadas na Tabela 2, a média do Número de brotações (NB) foi de 7,68 e do Número de brotações acima de 2 cm (NB>2) foi de 3,27. Neste estudo, a herdabilidade de plantas individuais no sentido amplo (h^2g) para NB, NB>2 e RAIZ foi moderada (0,21, 0,27, e 0,19, respectivamente). Os maiores valores de acurácia foram encontrados para as variáveis NB, NB>2 e RAIZ.

Os resultados apresentados na tabela 3 revelaram efeitos significativos para a interação genótipos \times ambientes e ambientes para todas as características. Quanto aos clones eles apresentaram efeitos significativos sobre os parâmetros número de

brotações, número de brotações maior que 2 e presença/ausência de raiz, indicando que para essas características as diferenças são devido ao efeito dos genótipos e também interação com o ambiente (Com e Sem membrana).

Tabela 2. Estimativa de parâmetros genéticos provenientes do modelo #51 (Selegen) para as características vigor (VIG), oxidação (OXD), número de brotações (NB), número de brotações acima de 2 cm (NB>2), presença ou ausência de raiz (RAIZ) e tamanho da maior brotação (TMB) avaliadas em 10 genótipos de *Eucalyptus* spp., após 30 dias de cultivo *in vitro*, nas fases de multiplicação e alongamento, em dois ambientes.

Parâmetros	VIG	OXD	NB	NB>2	RAIZ	TMB
<i>Vg</i>	0,04	0,02	10,58	2,07	0,44	0,00
<i>Vint</i>	0,13	0,36	15,81	1,88	0,75	0,21
<i>Ve</i>	0,26	0,29	15,93	3,11	0,95	0,37
<i>Vf</i>	0,46	0,83	49,48	7,76	2,36	0,76
h^2g	0,09±0,03	0,02±0,01	0,21±0,05	0,27±0,05	0,19±0,04	0,01±0,01
<i>Acgen</i>	0,69	0,35	0,81	0,87	0,80	0,16
<i>M</i>	2,24	1,52	7,68	3,27	1,93	0,73

Vg: variância genotípica; *Vint*: variância da interação genótipos x ambientes; *Ve*: variância residual; *Vf*: variância fenotípica individual; h^2g : herdabilidade individual no sentido amplo (dos efeitos genotípicos totais); *Acgen*: acurácia da seleção de genótipos, assumindo sobrevivência completa; *M*: Média geral do experimento.

Tabela 3. Análise de deviance para os efeitos de clone, parcela e interação genótipos ambientes para as características vigor (VIG), oxidação (OXD), número de brotações (NB), número de brotações acima de 2 cm (NB>2), presença ou ausência de raiz (RAIZ) e tamanho da maior brotação (TMB) avaliadas em 10 genótipos de *Eucalyptus* spp., após 30 dias de cultivo *in vitro*, nas fases de multiplicação e alongamento, em dois ambientes.

Efeitos	LRT ^a					
	VIG	OXD	NB	NB>2	RAIZ	TMB
Clones	1,36 ^{ns}	0,06 ^{ns}	5,77*	10,85*	4,17*	0,02 ^{ns}
Parcela	13,4*	101,14*	68,16*	26,60*	27,34*	81,32*
Interação	60,03*	70,71*	65,04*	63,73*	78,37*	41,54*

^a Teste da razão de verossimilhança (Likelihood Ratio Test); * p < 0.05; ns Não significativo

Na tabela 4, são apresentados os ordenamentos dos clones classificados, utilizando a análise conjunta das fases de multiplicação e alongamento e dos dois ambientes (com e sem membrana) avaliados para a variável número de brotações. Os dois clones de *Eucalyptus benthamii* apresentaram o maior valor genético em relação às outras espécies e híbridos estudados no presente trabalho. No entanto, outros grupos de espécies de *Eucalyptus* não apresentaram este comportamento de agrupamento.

Tabela 4. Classificação dos valores genotípicos (g), médias genotípicas (u + g), ganhos genéticos preditos e nova média para a variável número de brotações (NB) para doze genótipos de *Eucalyptus* spp, após 30 dias de cultivo *in vitro* considerando diferentes ambientes (com e sem membrana), na análise conjunta das fases de multiplicação e alongamento.

Genótipo	G	u+g	Ganho	Nova média
C07	2,77	6,04	2,77	6,04
C08	2,22	5,49	2,50	5,76
C05	0,10	3,37	1,70	4,96
C02	0,06	3,33	1,29	4,55
C04	-0,05	3,22	1,02	4,29
C01	-0,15	3,11	0,82	4,09
C03	-0,66	2,61	0,61	3,88
C06	-0,68	2,58	0,33	3,59
C11	-0,69	2,58	0,33	3,59
C09	-0,86	2,40	0,21	3,47

O ambiente mais favorável para produção na multiplicação e alongamento foi o ambiente sem membrana (Tabela 5), sendo este considerado ambiente superior para todos os clones na fase de multiplicação e para oito dentre os dez clones avaliados no alongamento.

Tabela 5. Ambientes superiores para cada genótipo de *Eucalyptus* spp. considerando ganhos genéticos preditos e nova média para a variável número de brotações (NB) na fase de multiplicação e número de brotações maior que 2 (NB>2) na fase de alongamento, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Genótipo	Multiplicação - NB			Alongamento- NB>2		
	Ambiente	Ganho	Nova média	Ambiente	Ganho	Nova média
C1	Sem membrana	2,89	19,99	Sem membrana	1,22	3,41
C2	Sem membrana	12,93	30,03	Com membrana	2,01	4,21
C3	Sem membrana	5,73	22,82	Sem membrana	1,65	3,71
C4	Sem membrana	4,26	21,35	Sem membrana	0,94	3,14
C5	Sem membrana	7,61	24,71	Sem membrana	0,80	2,09
C6	Sem membrana	10,41	27,50	Sem membrana	3,47	5,67
C7	Sem membrana	14,33	31,43	Sem membrana	2,94	5,14
C8	Sem membrana	0,86	17,96	Sem membrana	0,94	3,14
C9	Sem membrana	1,79	18,89	Com membrana	0,34	2,54
C10	Sem membrana	0,003	17,10	Sem membrana	0,19	2,38

O ranking dos materiais testados no presente estudo, de acordo com a estabilidade e adaptabilidade, do maior para o menor valor, encontra-se na tabela 6. Os dois clones de *Eucalyptus benthamii* aparecem entre os cinco melhores para as duas variáveis tanto em estabilidade quanto em adaptabilidade. O Clone de

Eucalyptus dunnii (C10) aparece em último para todas as características em adaptabilidade e estabilidade.

Tabela 6. Ranking da estabilidade de valores genotípicos (MHVG) e adaptabilidade de valores genotípicos (PRVG), para número de brotações e número de brotações maiores que 2cm (NB>2) para doze genótipos de *Eucalyptus* spp., nas fases de multiplicação e alongamento, em dois ambientes.

MHVG				PRVG			
NB		NB>2		NB		NB>2	
C05	11,69	C02	6,29	C07	2,17	C08	4,85
C04	10,93	C11	4,89	C08	2,03	C07	3,65
C07	7,43	C08	2,54	C03	1,70	C05	1,12
C08	6,76	C07	1,83	C02	1,13	C02	1,01
C03	4,39	C04	0,20	C05	0,90	C04	0,89
C01	2,88	C05	0,06	C06	0,87	C11	0,79
C06	2,30	C01	0,00	C04	0,87	C01	0,64
C12	2,21	C03	-0,09	C11	0,87	C03	0,27
C09	2,20	C06	-0,10	C01	0,86	C12	0,25
C02	1,85	C12	-0,10	C09	0,67	C06	0,25
C11	1,42	C09	-0,16	C12	0,47	C09	0,16
C10	0,23	C10	-0,23	C10	0,43	C10	0,03

Analisando as características avaliadas na Figura 1, no ambiente sem membrana, para os genótipos que coincidiram nas duas fases, houve coincidência de ranking em 87,5% dos genótipos.

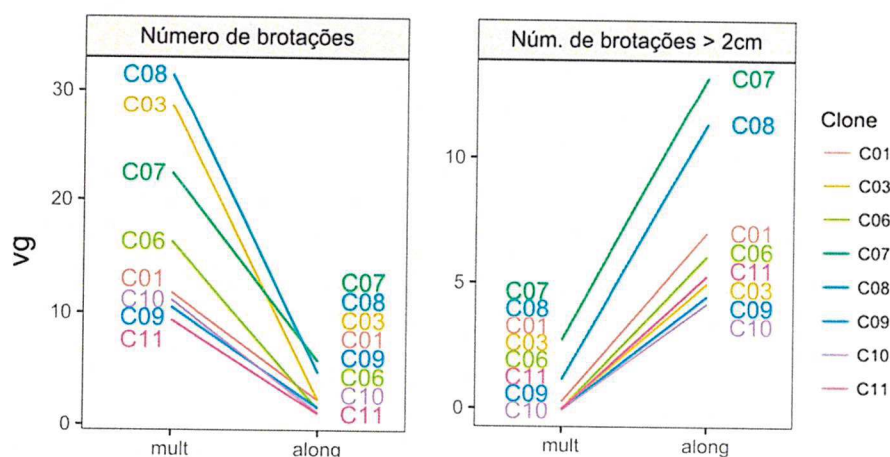


Figura 1. Comportamento dos genótipos no Ambiente 2 (sem membrana). Para as características Número de brotações (NB) e Número de brotações acima de 2 cm (NB>2). Nas abcissas são: *along*: fase de alongamento, *mult*: fase de multiplicação, avaliadas em genótipos de *Eucalyptus* spp., após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Os clones de *Eucalyptus benthamii* (C08 e C07) apresentaram superioridade em relação entre número de brotações maior que dois e o enraizamento na fase de alongamento, nos dois ambientes (Figura 2). No entanto, os clones C06, C09, C10 e C11 (*Eucalyptus dunnii*) apresentaram os valores mais baixos. O ambiente com membrana aumentou o número de brotações maior que dois para os clones de *Eucalyptus bentham*

mii e o ambiente sem membrana aumentou a taxa de enraizamento. Para os clones de *Eucalyptus urophylla* (C01, C02 e C03) o ambiente com membrana foi mais favorável ao enraizamento.

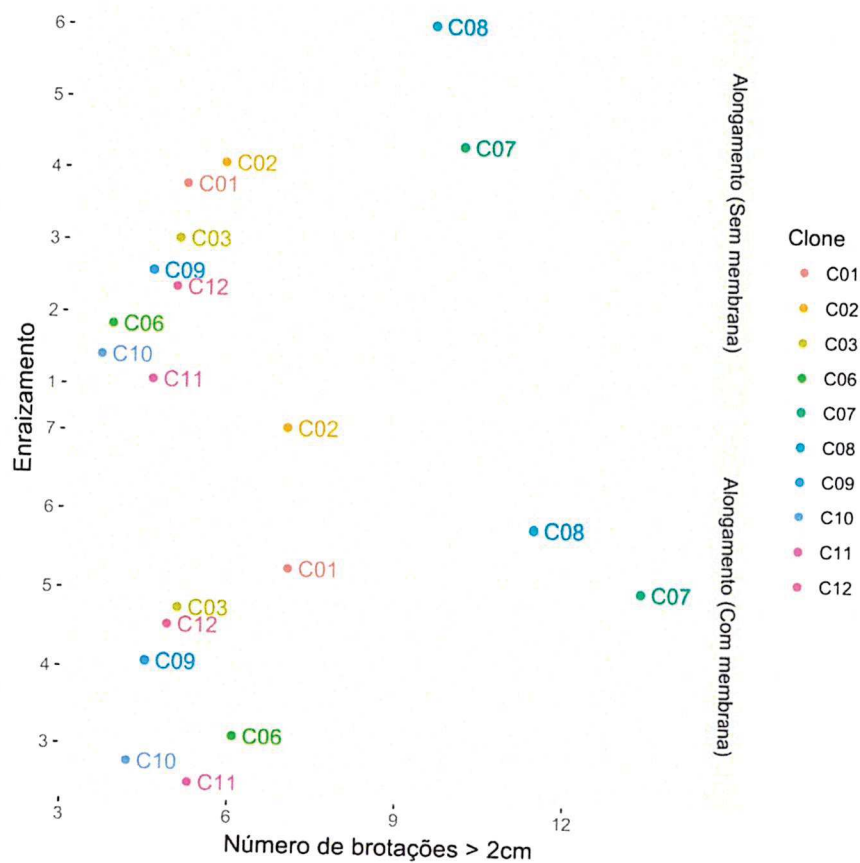


Figura 2. Comportamento dos genótipos de *Eucalyptus* spp. na fase de alongamento, em relação à interação do número de brotações maior de 2 (NB>2) e enraizamento (RAIZ), nos dois ambientes (sem membrana e com membrana), após 30 dias de cultivo *in vitro*.

4. Discussão

Estudos sobre a interação genótipo x ambiente tem sido amplamente utilizado em programas de melhoramento genético florestal, sendo essa interação e seus efeitos clonais na propagação vegetativa via micropropagação com potencial de uso nessa área (Oliveira et al., 2016; Moura, 2016; Dias et al., 2018). No presente estudo, o controle genético das características revelou efeitos significativos para genótipos e interação “g x a” para todas as características. Pode-se assim, inferir que as diferenças observadas no desenvolvimento do material vegetal, podem ser atribuídas aos diferentes clones utilizados e ao comportamento diferenciado desse nos dois ambientes (com e sem trocas gasosas). As estimativas de herdabilidades individual no sentido amplo podem ser classificadas de acordo com a classificação de Resende (2002), como de moderada magnitude, para número de brotações (NB) (0,21) para número de brotações maior que 2 (NB>2) (0,27) e para presença/ausência de raiz (RAIZ) (0,19). Os altos valores de acurácia encontrados para estas variáveis conferem segurança nos valores genéticos estimados.

A classificação (ranking) e seleção dos genótipos com desempenho superior pode ser realizada considerando o uso ou não de membranas. Na seleção de materiais genéticos, a adaptabilidade e estabilidade de clones devem ser levadas em consideração, visando selecionar materiais que se comportam bem em grande variação de condições ambientais e as respostas a melhorias ambientais (Resende, 2007). Para a discussão de classificação, estabilidade e adaptabilidade em cada ambiente, serão discutidos o número de brotações e número de brotações maior que dois, uma vez que essas características tendem a ser as mais importantes nas fases avaliadas do cultivo *in vitro* (multiplicação e alongamento).

Na multiplicação, o ambiente sem trocas gasosas, apresentou os maiores valores de número de brotações (NB) para todos os clones testados. Estes dados concordam com o trabalho de Gallo (2014), em que o uso de sistema fechado favoreceu a micropropagação de *Eucalyptus* spp. Estes resultados diferem com diversos estudos com a aplicação de manejo *in vitro* e ambientes gasosos que promoveram melhores resultados (Zobayed et al., 2001; Emam e Esfahan, 2014).

Quando em fase de alongamento, 80% dos clones testados apresentaram maior número de brotações maior que dois (NB>2) no ambiente sem trocas gasosas.

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de obter melhores protocolos para o alongamento *in vitro* de *Eucalyptus* spp. (Sotelo e Monza, 2007; Brondani et al., 2009; Navroski et al., 2013; Oliveira et al., 2016), buscando melhorar tanto o número de explantes alongados quanto a capacidade de sobrevivência *ex vitro*. As plantas micropropagadas apresentam frequentemente baixa taxa de sobrevivência quando transplantadas no viveiro (Martins et al., 2015), os principais problemas de adaptação *ex vitro* de plantas cultivadas através de micropropagação relacionam-se com controle da transpiração pelas plantas e controle de umidade nos frascos (Dias et al., 2014). O uso de tampas rígidas, que obteve melhor resultado nesse estudo, favorece maior acúmulo de umidade no espaço interno dos frascos e menor controle da transpiração. O uso de tampas com membranas porosas reduz o teor de umidade e a perda de água, apresentando uma forma de reproduzir as condições ambientais *ex vitro* pela manutenção das trocas gasosas e das concentrações adequadas de CO₂ (Pinheiro et al., 2013; Hoang et al., 2017), melhorando a adaptação a fase no viveiro. Apenas 20% dos materiais genéticos avaliados se desempenharam melhor no ambiente com trocas gasosas (com uso de membranas) durante o alongamento.

De forma geral, é de interesse que um genótipo multiplique e alongue bem para produzir material suficiente para o processo *ex vitro* e viabilizar a micropropagação a larga escala. No presente trabalho, pode-se observar que o ranking de multiplicação não corresponde em totalidade ao alongamento.

O material produzido nas fases de multiplicação e alongamento são posteriormente enraizados *in vitro* ou *ex vitro*. Analisar a variável presença/ausência de raiz, no alongamento, indica clones potenciais ao enraizamento. No presente trabalho o número de brotações alongadas teve relação direta com o enraizamento do material, permitindo também a classificação e agrupamento de espécies mais ou menos aptas ao enraizamento. Os resultados demonstraram alto controle genético para o enraizamento (acurácia > 0,80) que concordam com o trabalho de Oliveira et al. (2015).

5. Conclusões

Dos dois ambientes testados, a não utilização de membrana (sem trocas gasosas), foi o ambiente mais favorável para a multiplicação e alongamento *in vitro* dos genótipos avaliados.

O controle genético para as características avaliadas e a interação genótipo x ambiente, em ambientes com e sem trocas gasosas, permite a seleção e classificação de clones de *Eucalyptus* spp. mais aptos as fases de multiplicação e alongamento *in vitro*.

6. Bibliografia

- ALVAREZ, C.; SÁEZ, P.; SÁEZ, K.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 1, p. 93–101, 2012
- ARENCIBIA, A. D.; GÓMEZ, A.; POBLETE, M.; VERGARA, C. High-performance micropropagation of dendroenergetic poplar hybrids in photomixotrophic Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). **Industrial Crops and Products**, v. 96, p. 102–109, 2017
- BRONDANI, G. E.; DE WIT ONDAS, H. W.; BACCARIN, F. J. B.; GONÇALVES, A. N.; DE ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 48, n. 5, p. 478- 487, 2012
- BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* x *E dunnii*. **Revista Arvore**, v.33, n.1, p.11- 19, 2009
- CORREIA, D.; GONÇALVES, A.; COUTO, H.; RIBEIRO, M. Efeito do meio de cultura líquido e semi-sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **Ipef**, v. 48/49, p. 107–116, 1995
- DIAS, M. C.; CORREIA, C.; MOUTINHO-PEREIRA, J.; OLIVEIRA, H.; SANTOS, C. Study of the effects of foliar application of ABA during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 2, p. 213-224, 2014
- EMAM, M.; ESFAHAN, E. Z. Effect of chemical (enriched-CO₂ and sucrose- free medium) and physical factors (light period and temperature) on rooting and hardening of *Sorbus aucuparia* L. plantlets. **International Journal of Biosciences**, v. 4, n. 5, p. 176–181, 2014

- GALLO, R. **Produção de microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus* spp. pela micropropagação.** 2014. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- HOANG, N. N.; KITAYA, Y.; MORISHITA, T.; ENDO, R.; SHIBU YA. T. A comparative study on growth and morphology of wasabi plantlets under the influence of the micro-environment in shoot and root zones during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 130, n. 2, p. 255-263, 2017
- IAREMA, L.; DA CRUZ, A. C. F.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; VIEIRA, R. F.; DE OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 2, p. 227–238, 2012
- MARTINS, J. P. R.; PASQUAL, M.; MARTINS, A. D.; RIBEIRA, S. F. Effects of salts and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 1, p. 85-91, 2015
- MOURA, L. C. D. **Indução de embriões somáticos em *Eucalyptus* spp.** 2016. 83f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2016
- NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S.; PEREIRA, M. de O.; CURTI, A. R.; PAIM, A. F. Alongamento *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* maiden. **Cerne**, v. 19, n. 4, p. 545–550, 2013
- OLIVEIRA, M. L. de; 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**, v. 35, n. 6, p. 1207–1217, 2011
- OLIVEIRA, L. S.; BRONDANI, G. E.; BATAGIN-PIOTTO, K. D.; CALSAVARA, R.; GONÇALVES, A. N.; DE ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. **Australian Forestry**, P.219-231, 2015
- OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; LOPES, A. P.; TAKAHASHI, E. K.; OTONI, W. C. Multiplicação e alongamento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciencia Florestal**, v.26, n.1, p.235-247, 2016
- PARK, Y. S.; BONGA, J. M.; MOON, H. K. **Vegetative propagation of forest trees.** National Institute of Forest Science, 2016, 49p.
- PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Árvore**, v. 37, n. 1, p. 19–29, 2013
- RESENDE, M. D. V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002, 975p.
- RESENDE, M. D. V. **Matemática e Estatística na Análise de Experimentos e no melhoramento genético.** Colombo: Embrapa Florestas, 2007, 535p.
- RESENDE, M. D. V. Software Selegen-REML/BLUP: A useful tool for plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 330–339, 2016

- SOTELO, M.; MONZA, J. Micropropagation of *Eucalyptus maidenii* elite trees. **Agrociencia**, v. 9, n. 1, p. 81–89, 2007
- WATT, M. P. Genotypic-unspecific protocols for the commercial micropropagation of *Eucalyptus grandis* × *nitens* and *E. grandis* × *urophylla*. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 38, p. 125-133, 2014
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2.ed. Viçosa: Ed. UFV, 2013, 279p.
- XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 2, p. 149-158, 2011
- ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Large-scale photoautotrophic micropropagation in a scaled-up vessel. **Progress in Biotechnology**, v. 18, n. C, p. 345–354, 2001

SACAROSE E LUZ NO CULTIVO *in vitro* DE CLONES DE *Eucalyptus benthamii* E *Eucalyptus dunnii* VIA MICROPROPAGAÇÃO

Resumo- Nos sistemas de propagação *in vitro* fotoautotófico, entre fatores importantes normalmente mencionados na literatura científica, estão aqueles relacionados com estudo de luz e fontes de carbono, essenciais nesse processo. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi pesquisar a influência de diferentes condições de luz e ausência de sacarose na multiplicação e alongamento de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii* cultivados *in vitro* via micropropagação. Foram testadas lâmpadas fluorescentes, lâmpadas de diodos emissores de luz LED branca e LED vermelho/azul. As intensidades promovidas por estas foram, respectivamente, de 80, 100, 64 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As concentrações de sacarose testadas foram de 0 e 30 g L^{-1} . O número de brotações e na fase de alongamento o número de brotações com tamanho maior que 2 cm, tamanho da maior brotação, quantificação de clorofila total e carotenoides foram avaliados na fase de multiplicação após 30 dias da instalação do experimento. Todas as fontes luminosas e intensidades de luz testadas proporcionaram bom desenvolvimento dos clones de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii* cultivados *in vitro*. O uso de LED branca e 30 g L^{-1} de sacarose promoveu valores de clorofila total e de carotenoide semelhantes aos encontrados na condição *ex vitro* para os clones testados. Para os clones de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii* avaliados, o uso de sacarose adicionado no meio de cultivo *in vitro* estimulou a produção na multiplicação e alongamento, bem como maiores taxas de clorofila total e carotenoides.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, sistema fotoautotrófico, multiplicação *in vitro*, alongamento *in vitro*.

1. Introdução

A técnica de micropropagação tem sido considerada estratégica no setor florestal, principalmente para espécies com dificuldade de produção de mudas clonais pela miniestaquia. Dentre suas aplicações, destaca-se o

revigoramento/rejuvenescimento de clones de interesse comercial e de difícil propagação, para produção de plantas a serem estabelecidas em minijardins clonais (Xavier et al., 2013). Dentre esses materiais considerados de difícil propagação *ex vitro* encontram-se as espécies subtropicais, tal como o *Eucalyptus benthamii* (Brondanii et al., 2014) e *Eucalyptus dunnii* (Trueman et al., 2013). Porém, na propagação *in vitro* de materiais subtropicais, vários problemas têm sido descritos, como baixas taxas de multiplicação, clorose, oxidação, hiper-hidricidade, formação de calos e dificuldade de enraizamento (Graça et al., 2001; Billard e Lallana, 2005; Malyz et al., 2011; Navroski, 201; Navroski et al., 2013), necessitando desenvolvimento de protocolos que melhorem a eficiência da produção e a qualidade das plantas.

Um dos aspectos da produção *in vitro* que limita a produção e a qualidade do material, relaciona-se ao estresse ocasionado pelas condições de cultivo. Nesse sistema os materiais são estabelecidos em um pequeno recipiente de cultura asséptica, onde a nutrição é primariamente suprida pela água e composição do meio de cultura (Chen, 2015). De modo geral, a micropropagação é fortemente influenciado pela natureza do meio usado (Zahara et al., 201) e ambiente de cultura (Jeong e Sivanesan, 2015; Szopa e Ekiert, 2016). O componente do meio usado como fonte de energia mais comum, usado na célula de planta, tecido e cultura de órgãos, durante o processo de cultura de tecidos é o uso de sacarose em altos teores (Gago et al., 2014), necessário para sustentar o metabolismo heterotrófico e fotomixotrófico do cultivo *in vitro*, como também considerado a principal causa de estresse do processo (Yaseen et al., 2013; Imamura et al., 2014; Schmildt et al., 2015).

A tendência no desenvolvimento de cultivo *in vitro* é o desenvolvimento de condições fotoautotróficas, em substituição as condições heterotróficas e fotomixotróficas tradicionais, onde nelas a sacarose é reduzida ou excluída (Saldanha et al., 2014). Para o gênero *Eucalyptus*, foram realizados diferentes trabalhos estudando as características de crescimento em condições fotoautotróficas (Kirdmanee et al., 1995; Zobayed et al., 2000; Zobayed et al., 2001; Sha Valli Khan et al., 2002; da Silva et al., 2015; Gallo et al., 2017).

Outras condições de cultivo *in vitro* podem ser manipuladas a fim de diminuir o estresse da planta *in vitro*, buscando melhorar a produção e qualidade do material,

como o conhecimento de tipos de iluminação alternativos e mais eficientes para o sistema (Saldanha et al., 2012; Xavier et al., 2013).

A intensidade da luz, o fotoperíodo e a qualidade espectral tem efeitos sobre a fotossíntese e afeta a fotomorfogênese. Diversos estudos demonstram o efeito promotor da luz na organogênese, embriogênese somática e produção de metabólitos (Chung et al., 2010; Kozai, 2013; Singh, 2015; Sivanesan e Park, 2015; Hung et al., 2016; Szopa e Ekiert, 2016), variando entre espécies. As diferenças espectrais entre as lâmpadas LEDs e fluorescentes tem influência direta na fotossíntese, crescimento, e desenvolvimento das plantas *in vitro* (Batista et al., 2018).

Há uma tendência para substituir as lâmpadas fluorescentes, em que vários autores citam as lâmpadas LEDs como fontes de luz mais eficientes para organogênese, embriogênese somática e produção de metabólitos *in vitro* (Monteuuis, 2016; Batista et al., 2018), podendo melhorar o processo da fotossíntese das plantas induzindo uma maior eficiência estágio fotomixotrófico (Batista et al., 2018) e reduzindo o estresse na fase *ex vitro*. Mudanças cultivadas *in vitro* têm que se ajustar na transição de crescimento heterotrófico para autotrófico, processo que pode resultar em baixo crescimento e mortalidade das plantas (Xiao et al., 2011).

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a influência da luz e da sacarose na multiplicação e alongamento de clones de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii* cultivados em micropropagação, para estimular o comportamento fotoautotrófico.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal

O material experimental utilizado foi proveniente da fase de multiplicação de dois clones de *Eucalyptus benthamii* (C1 e C2) e dois clones de *Eucalyptus dunnii* (C3 e C4), mantidos em banco clonal *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

Foram utilizados tufos contendo de seis a oito gemas diferenciadas, cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura JADS (Correia et al., 1995) acrescido de 0,8 g L⁻¹ de PVP30, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,5

mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0,01 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA). O pH foi ajustado em 5,8 com HCl 1 M ou NaOH 1 M antes da adição de 6 g L⁻¹ de ágar, e o meio de cultura esterilizado em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 20 min. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, em fotoperíodo de 16 h e luz de 64 μmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro LI-COR®, LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram®, Brasil).

2.2. Sacarose e condições luminosas

Foram testadas duas concentrações de sacarose e quatro condições luminosas em duas fases de desenvolvimento da micropropagação: multiplicação e alongamento das brotações. Na fase de multiplicação, explantes cultivados *in vitro* foram transferidos para frascos de vidro (250 mL de capacidade), contendo 40 mL de meio de cultura JADS, adicionado de 0,8 g L⁻¹ de PVP30, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ ANA. Foram testadas as concentrações de 0 e 30 g L⁻¹ de sacarose, sendo os frascos mantidos em sala de cultura sob quatro condições luminosas: LED V/A - duas lâmpadas diodo emissor de luz – LED vermelho/azul (luz 80 μmol m⁻² s⁻¹, LabLumens); 4F- 4 lâmpadas fluorescentes tubulares (luz de 100 μmol m⁻² s⁻¹, Osram®); 2F- 2 lâmpadas fluorescentes tubulares (luz de 64 μmol m⁻² s⁻¹, Luz do Dia Especial, Osram®); LED B- duas lâmpadas LED branca, do tipo tubular, (luz 130 μmol m⁻² s⁻¹, Tecnal) (Figura 1).

Na fase de alongamento, as condições testadas foram semelhantes à fase de multiplicação, diferindo apenas nos reguladores de crescimento adicionado no meio de cultura. Para o alongamento das brotações, utilizou-se 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,25 mg L⁻¹ de AIB.

O pH dos meios de cultura foi ajustado em 5,8 antes da adição de 6 g L⁻¹ de ágar, sendo o meio esterilizado em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 20 min. Os frascos de cultura foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h.

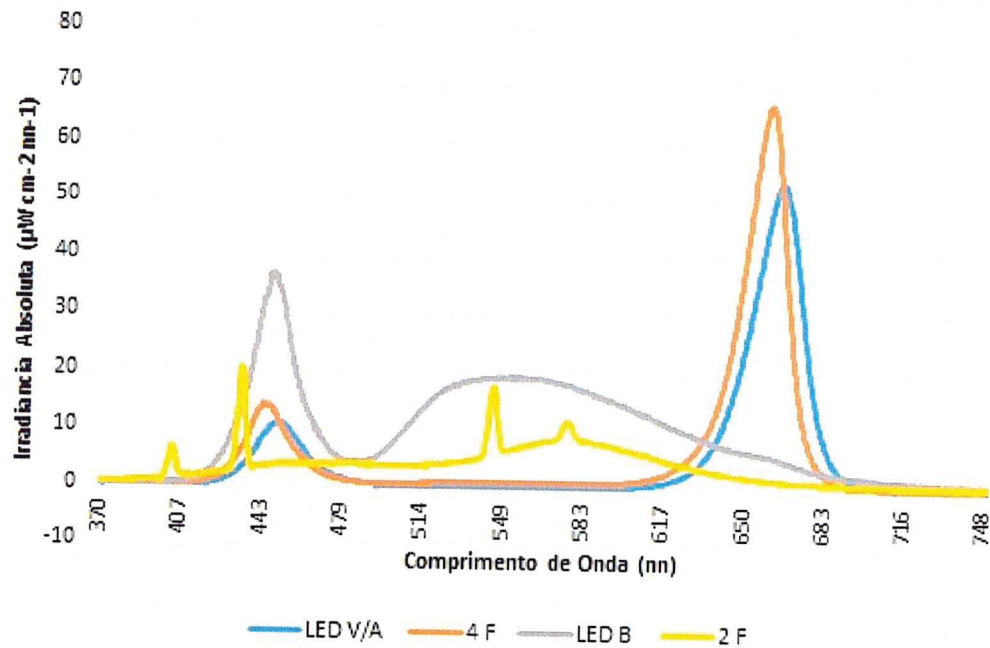


Figura 1. Variações da luz absoluta ($\mu\text{W cm}^{-2} \text{nm}^{-1}$) e do comprimento de onda (nm) de luz emitida pelas lâmpadas utilizadas em diferentes clones de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii*. LED V/A - duas lâmpadas LED Vermelho/Azul; 4F- 4 lâmpadas fluorescentes; 2F- 2 lâmpadas fluorescentes; LED B- duas lâmpadas LEDs brancas.

2.3. Avaliações experimentais e análise dos dados

Para as fases de multiplicação e alongamento, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2×4 (duas concentrações de sacarose e quatro fontes luminosas), com 5 repetições e uma observação por parcela, obtida pela média de 4 explantes.

Na fase de multiplicação, o número de brotações (NB) foi avaliado após 30 dias a partir da instalação do experimento. Para a fase de alongamento, o número de brotações maiores que 2 cm ($\text{NB} > 2$), tamanho da maior brotação (TMB) e pigmentos fotossintéticos foram avaliados 30 dias após a instalação do experimento. Para avaliação dos pigmentos fotossintéticos, amostras de 0,24 mg de folhas foram colocadas em 5 mL de solução de DMSO (saturado com carbonato de cálcio), e mantidas no escuro por 48 h (Santos et al., 2008). Determinou-se a absorvância das amostras, utilizando cubetas de quartzo de 10 mm de caminho ótico no espectrofotômetro Genesys 10UV (ThermoScientific, EUA). Os comprimentos de onda analisados foram de 665, 645 e 480 nm e as equações para o cálculo das concentrações de clorofila a, b e carotenoides foram baseadas no trabalho de

Wellburn (1994). Para as análises dos dados utilizou-se o programa estatístico R e o pacote ExpDes.pt (Ferreira et al., 2013). Para as características avaliadas fez-se transformação dos dados utilizando Raiz ($X+0,5$), sendo as médias comparadas pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

3. Resultados

3.1. Multiplicação

As duas concentrações de sacarose avaliadas e todas as luzes testadas (LED V/A - duas lâmpadas LED Vermelho/Azul; 4F- 4 lâmpadas fluorescentes; 2F- 2 lâmpadas fluorescentes; LED B- duas lâmpadas LEDS brancas promoveram multiplicação das gemas de todos os genótipos avaliados. As médias do número de brotações do meio de cultura contendo 30 g L⁻¹ foram superiores: LED V/A- 4,78; 4F- 3,89; 2F- 4,40 e LED B 5,21. Um maior número de brotações foi alcançado com a lâmpada LED dentro desse tratamento (Tabela 1). A luz 4F apresentou diferença na média geral, considerando todos os clones, entre as concentrações de 30 e 0 g L⁻¹ de sacarose.

Tabela 1. Valores médios do número de brotações (NB) em relação às diferentes concentrações de sacarose (0 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹) adicionadas ao meio de cultura em diferentes luzes (LED V/A - duas lâmpadas LED Vermelho/Azul; 4F- 4 lâmpadas fluorescentes; 2F- 2 lâmpadas fluorescentes; LED B- duas lâmpadas LEDS brancas) para diferentes clones (CLONES) de *Eucalyptus benthamii* (C1 e C2) e *Eucalyptus dunni* (C3 e C4), avaliados aos 30 dias na fase de multiplicação *in vitro*.

		NB							
		Condições de Luminosidade							
Sacarose	CLONES	LED V/A	4F	2F	LED B				
0 g L ⁻¹	C1	2,49	a AB	3,60	a A	2,40	a B	2,56	a AB
	C2	1,94	a A	2,65	a A	2,11	a A	1,78	a A
	C3	3,25	a A	2,99	a A	2,85	a A	2,56	a A
	C4	3,03	a A	3,45	a A	3,16	a A	2,40	a A
	\bar{x}	2,68	b	3,17	a	2,63	b	2,33	b
30 g L ⁻¹	C1	5,80	a A	3,93	b B	4,25	a B	5,52	a A
	C2	2,49	c B	2,66	c B	3,02	c B	4,26	a A
	C3	5,25	ab A	5,05	a A	5,64	a A	5,69	a A
	C4	5,56	b A	3,93	b A	4,67	ab A	5,37	a A
	\bar{x}	4,78	a	3,89	a	4,40	a	5,21	a

Obs.: Médias seguidas por letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas dentro de cada nível de sacarose não diferem pelo teste Tukey, a 5% de significância.

3.2. Alongamento

Em relação ao comprimento das brotações alongadas, tanto em número de brotações maior de 2 cm, quanto no tamanho da maior brotação, os valores máximos estimados foram encontrados na concentração de 30 g L⁻¹ e nas luzes 4F e LED B (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios do número de brotações maior que 2 cm (NB > 2) e tamanho da maior brotação (TMB) em relação às diferentes concentrações de sacarose (0 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹) adicionadas ao meio de cultura em diferentes luzes (LED V/A - duas lâmpadas LED Vermelho/Azul; 4F- 4 lâmpadas fluorescentes; 2F- 2 lâmpadas fluorescentes; LED B- duas lâmpadas LEDS brancas) para diferentes clones (MG) de *Eucalyptus benthamii* (C1 e C2) e *Eucalyptus dunnii* (C3 e C4), avaliados aos 30 dias de alongamento *in vitro*.

		NB > 2					
		Condições de Luminosidade					
Sacarose	CLONES	LED V/A	4F	2F	LED B		
0 g L ⁻¹	C1	0,71 a A	0,71 a A	0,71 a A	0,71 a A	0,71 a A	
	C2	0,71 a A	0,71 a A	0,71 a A	0,84 a A	0,71 a A	
	C3	0,71 a A	0,71 a A	0,71 a A	0,71 a A	0,71 a A	
	C4	0,71 a A	0,71 a A	0,71 a A	0,71 a A	0,71 a A	
	\bar{x}	0,71 b	0,71 b	0,71 b	0,74 b	0,71 a A	
30 g L ⁻¹	C1	3,44 a A	3,53 a A	3,20 a A	3,50 a A	3,50 a A	
	C2	2,06 b AB	2,53 b A	0,71 d C	1,82 b B	1,82 b B	
	C3	1,64 b B	2,19 bc A	0,73 c AB	2,10 b AB	2,10 b AB	
	C4	1,68 b B	1,86 c B	2,49 b A	2,05 b AB	2,05 b AB	
	\bar{x}	2,21 a	2,53 a	1,78 a	2,37 a	2,37 a	
		TMB (cm)					
Sacarose	CLONES	LED V/A	4F	2F	LED B		
0 g L ⁻¹	C1	1,14 a A	1,21 a A	1,27 a A	1,23 a A	1,23 a A	
	C2	1,32 a A	1,19 a A	1,25 a A	1,40 a A	1,40 a A	
	C3	1,13 a A	1,21 a A	1,14 a A	1,14 a A	1,14 a A	
	C4	1,24 a A	1,22 a A	1,36 a A	1,27 a A	1,27 a A	
	\bar{x}	1,21	1,21	1,26	1,26	1,26	
30 g L ⁻¹	C1	2,26 b B	2,70 b AB	2,55 a B	3,05 a A	3,05 a A	
	C2	3,07 a A	3,09 a A	1,29 c B	2,79 a A	2,79 a A	
	C3	1,80 c A	1,97 c A	1,82 b A	1,82 c A	1,82 c A	
	C4	2,00 c AB	1,88 c B	2,27 a A	2,29 b A	2,29 b A	
	\bar{x}	2,28	2,41	1,98	2,49	2,49	

Obs.: Médias seguidas por letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas dentro de cada nível de sacarose não se diferem pelo teste Tukey, em nível de 5% de significância.

Os valores variaram para o número médio de brotações alongadas entre 0,71 cm e 3,53 cm e tamanho da maior brotação 1,13 cm a 3,07 cm. Na concentração de 0 g L⁻¹ de sacarose não houve alteração em relação aos clones e às luzes e o número de brotações e o tamanho da maior brotação.

Após 30 dias de cultivo das brotações sob diferentes condições luminosas e sacarose, foi observada diferença significativa nos valores médios de teor de clorofila e carotenóides. As quantidades de clorofila e carotenóides foram superiores nos tratamentos com 30 g L⁻¹ e na luz LED B (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios de teor de clorofila total (Total Cl) e carotenóides em relação às diferentes concentrações de sacarose (0 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹) adicionadas ao meio de cultura em diferentes luzes (T1 - duas lâmpadas LED Vermelho/Azul; T2- 4 lâmpadas fluorescentes; T3- 2 lâmpadas fluorescentes; T4- duas lâmpadas LEDS brancas) para diferentes clones (MG) de *Eucalyptus benthamii* (C1 e C2) e *Eucalyptus dunnii* (C3 e C4), avaliados aos 30 dias de alongamento *in vitro*.

Sacarose	CLONES	Total Cl ($\mu\text{g cm}^{-2}$)							
		Condições de Luminosidade							
		LED V/A		4F		2F		LED B	
0 g.L ⁻¹	C1	13,21	b B	15,83	ab AB	24,37	a A	25,73	a A
	C2	36,89	a A	13,39	ab B	12,44	bc B	13,78	b B
	C3	32,22	a A	22,26	a AB	20,62	ab B	13,81	b B
	C4	13,51	b AB	9,71	b B	9,74	c B	21,54	ab A
	\bar{x}	23,96		15,30		16,79		18,72	
30 g.L ⁻¹	C1	32,58	b B	18,72	b C	39,68	a AB	44,99	a A
	C2	20,97	c BC	33,92	a A	11,34	b C	24,27	b AB
	C3	27,92	bc B	28,22	ab B	40,89	a A	45,55	a A
	C4	49,34	a A	24,19	ab C	37,27	a B	43,79	a AB
	\bar{x}	32,70		26,26		32,30		39,65	
Sacarose	CLONES	Carotenóides ($\mu\text{g cm}^{-2}$)							
		Condições de Luminosidade							
		LED V/A		4F		2F		LED B	
0 g.L ⁻¹	C1	2,05	b B	2,61	a AB	3,36	a AB	3,62	a A
	C2	5,03	a A	1,80	a B	1,35	c B	2,14	ab B
	C3	4,56	a A	3,15	a AB	2,97	ab AB	2,09	b B
	C4	2,37	b AB	1,67	a B	1,55	b B	3,47	ab A
	\bar{x}	3,50		2,31		2,31		2,83	
30 g.L ⁻¹	C1	4,62	b B	2,88	b C	5,61	a AB	6,30	a A
	C2	3,37	b B	5,04	a A	1,79	b C	3,67	b AB
	C3	4,80	b AB	4,02	ab B	5,74	a A	6,10	a A
	C4	7,94	a A	4,18	ab C	5,78	a B	6,55	a AB
	\bar{x}	5,18		4,03		4,73		5,66	

Médias seguidas por letras iguais minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas dentro de cada nível de sacarose não se diferem pelo teste Tukey, a 5% de significância.

4. Discussão

Observamos que tanto a fonte e quantidade de luz, quanto à adição ou supressão de sacarose no meio de cultura, possibilitaram diferentes respostas nas duas fases de crescimento *in vitro*. Entretanto, todas as condições testadas possibilitaram a multiplicação e alongamento dos clones de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii* testados. Diferenças no crescimento estão relacionadas com a presença da fonte de carbono na forma de sacarose, seja pelo fornecimento no meio ou produção pela própria planta através da fotossíntese estimulada pelas diferentes qualidades e intensidades de luz fornecida.

Maiores taxas de multiplicação e alongamento com o uso de sacarose relaciona-se a este carboidrato, como fonte de energia e carbono sendo um componente muito importante nos meios de cultura *in vitro* (Al-Khateeb, 2008; Faria et al., 2004; Nambiar et al., 2012). Fontes de carbono são necessárias no meio devido à restrição da quantidade de luz e baixa concentração de CO₂ em condições *in vitro*, especialmente quando as plantas não estão prontas para fotossintetizar seus próprios alimentos durante o estágio inicial da cultura de tecidos (Al-Khateeb, 2008; Faria et al., 2004; Mazinga et al., 2014; Nambiar et al., 2012). Diversos trabalhos relatam o uso de 30 gL⁻¹ de sacarose no processo de micropropagação, sendo responsável pela multiplicação ou alongamento de *Eucalyptus* spp. (Brondani et al., 2009; Borges et al., 2011; Navroski et al., 2013). Outros trabalhos com *Eucalyptus in vitro* encontraram resultados diferentes, onde a diminuição ou isenção de sacarose foi superior ao uso de 30 g L⁻¹ (Castro e Gonzalez, 2002; Cha-Um et al., 2014; Gallo, 2014).

Todas as qualidades e intensidades de luz testadas neste estudo propiciaram a multiplicação e alongamento, porém a LED parece comum promotora de melhores resultados nas duas fases testadas. Sendo assim, como expectativa de menor consumo, maior durabilidade e melhorar a eficiência da produção e qualidade das plantas lenhosas micropropagadas, suprimindo necessidade de uma fonte de luz eficiente (Batista et al., 2018) o uso de LED para cultivo *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii* é uma alternativa viável. O trabalho de Gallo (2014) reporta a superioridade da luz LED para *Eucalyptus* spp *in vitro*, em comparação com a luz fluorescente tradicionalmente utilizada nos laboratórios de micropropagação, concluindo que a qualidade de luz teve influência no vigor dos

brotos, tendo a lâmpada com 4LEDs sido superior à lâmpada de 2 LEDs e à fluorescente.

A diminuição ou eliminação de sacarose (Kozai, 2005) e o uso de sistemas de luz que aumentem a capacidade de realização de fotossíntese para as plantas *in vitro* (Jeong e Sivanesan, 2018), são condições que estimulam o estabelecimento de condições fotoautotróficas.

O teor de clorofila e carotenoides apresentou maiores valores na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose em todas as luzes. Segundo Yuan et al. (2015), a biossíntese e acúmulo de carotenoides é também regulada pelo metabolismo da sacarose presente. Ao contrário do observado no presente trabalho, na maioria das plantas as altas concentrações de sacarose aplicada exogenamente resultam em uma inibição da fotossíntese, que está associada à inibição da biossíntese da clorofila (Martins et al., 2013; Mccarthy et al., 2016).

Os valores de clorofila total e de carotenoide observados no presente estudo com o uso de LED branca, foram mais próximos ao *ex vitro* para os clones testados, apesar de vários estudos relatarem que a fotossíntese é fortemente influenciada pelos espectros de vermelho e azul e vermelho de lâmpadas de LED (Wang et al., 2016; Manivannan et al., 2017), a LED branca dentre as luzes testadas, promoveu valores mais próximos ao crescimento *ex vitro* do material de clorofila total e carotenoides. Estes dados concordam com Tuan et al. (2013), aonde maiores quantidades de carotenoides foram encontradas em brotos expostos à luz LED branca, em comparação com brotos expostos a LED vermelha em *Fagopyrum tataricum*. Ferreira et al. (2016) trabalhando com cana de açúcar, também encontraram maiores teores de pigmentos fotossintéticos nas plantas cultivadas sob LED branco, independentemente da concentração de sacarose.

5. Conclusões

1. O uso de sacarose adicionado no meio de cultivo *in vitro* estimula a produção de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii* na multiplicação e alongamento.
2. Lâmpadas fluorescentes, LED branca e LED vermelho/azul podem ser utilizadas no cultivo *in vitro*, na fase de multiplicação e alongamento, com ou sem uso de sacarose.

3. O uso de LED branca e 30 g L⁻¹ de sacarose promoveu valores de clorofila total e de carotenoide mais próximos aos encontrados *ex vitro* para os clones testados.
4. Valores iguais ou maiores de pigmentos, clorofilas e carotenoides foram apresentados com o uso de LED em comparação às demais fontes luminosas além de maior homogeneidade de respostas em diferentes clones.

6. Bibliografia

- AL-KHATEEB, A. A. Regulation of *in vitro* bud formation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khanezi by different carbon sources. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6550–6555, 2008
- BATISTA, D. S.; FELIPE, S. H. S.; SILVA, T. D.; DE CASTRO, K. M.; MAMEDESRODRIGUES, T. C.; MIRANDA, N. A.; RÍOS-RÍOS, A. M.; FARIA, D. V.; FORTINI, E. A.; CHAGAS, K.; TORRES-SILVA, G.; XAVIER, A.; ARENCIBIA, A. D.; OTONI, W. C. Light quality in plant tissue culture: does it matter? **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 3, p. 1-21, 2018
- BILLARD, C. E.; LALLANA, V. H. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, v. XVI, n. 30, p. 199–216, 2005
- BORGES, S. R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S. de; MELO, L. A. de; ROSADO, A. M. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, v. 35, n. 3, p. 425–434, 2011
- BRONDANI, G. E.; BACCARIN, F. J. B.; BERGONCI, T.; GONÇALVES, A. N.; DE ALMEIDA, M. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii*: Efeito do genótipo, AIB, zinco, boro e coletas de brotações. **Cerne**, vol.20, n.1, pp.147-156, 2014
- BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii*. **Revista Árvore**, v. 33, n. 1, p. 11–19, 2009
- CASTRO, D. R.; GONZÁLEZ, O. J. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. **Agricultura Técnica**, v. 62, p. 68–78, 2002
- CHA-UM, S.; SOMSUEB, S.; SAMPHUMPHUANG, T.; KIRDMANEE, C. Screening of eight eucalypt genotypes (*Eucalyptus* sp.) for water deficit tolerance using multivariate cluster analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 3, p. 753–764, 2014
- CHEN, C. Application of growth models to evaluate the microenvironmental conditions using tissue culture plantlets of *Phalaenopsis Sogo* Yukidian “V3”. **Scientia Horticulturae**, v. 191, p. 25–30, 2015
- CHUNG, J. P.; HUANG, C. Y.; DAI, T. E. Spectral effects on embryogenesis and plantlet growth of *Oncidium* “Gower Ramsey”. **Scientia Horticulturae**, v. 124, n. 4, p. 511–516, 2010

- CORREIA, D.; GONÇALVES, A.; COUTO, H.; RIBEIRO, M. Efeito do meio de cultura líquido e semi-sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **Ipef**, v. 48/49, p. 107–116, 1995
- DA SILVA, A. L. L.; GOLLO, A. L.; BRONDANI, G. E.; HORBACH, M. A.; DE OLIVEIRA, L. S.; MACHADO, M. P.; DE LIMA, K. K. D.; DA LUZ COSTA, J. Micropropagation of *Eucalyptus saligna* sm. from cotyledonary nodes. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 1, p. 311–318, 2015
- FARIA, R. T.; RODRIGUES, F.N., OLIVERIA, L.V.R., MULLER, C. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 4, p. 780–783, 2004
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: Experimental Designs package. R package version 1.1.2, 2013
- FERREIRA, L. T.; SILVA, M. M. de A.; MACÊDO, C. R. de; WILLADINO, L. Fonte de luz e concentração de sacarose no cultivo *in vitro* da cana-de-açúcar (RB 867515). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.12, n.2, p.46-52, 2016
- GALLO, R. **Produção de microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus* spp. pela micropropagação**. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, 2014
- GALLO, R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, B. de A.; DE MOURA, L. C.; MIRANDA, N. A.; GATTI, K. C.; OTONI, W. C. Micro-cutting propagation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* through clumps of axillary buds using different containers and substrates. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 10, p. 1327–1333, 2017
- GRAÇA, M. E. C.; KALIL FILHO, A. N.; MEDEIROS, A. C. de S.; TAVARES, F. R. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron, na multiplicação “*in vitro*” de brotações de *Eucalyptus Dunnii* MAID. **Boletim de Pesquisa Florestal** v. 43, p. 107–112, 2001
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v.108, n. 2, p.105-120, 2006
- HUNG, C. D.; HONG, C. H.; KIM, S. K.; LEE, K. H.; PARK, J. Y.; NAM, M. W.; CHOI, D. H.; LEE, H. I. LED light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 6, 2016
- IMAMURA, T.; HIGUCHI, A.; SEKINE, K. T.; YAMASHITA, T.; TAKAHASHI, H. High concentrations of sucrose induce overwintering bud formation in gentian plantlets cultured *in vitro*. **Plant Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 97–104, 2014
- JEONG, B. R.; SIVANESAN, I. Impact of light quality and sucrose on adventitious shoot regeneration and bioactive compound accumulation in *Ajuga multiflora* Bunge. **Scientia Horticulturae**, v. 236, p. 222–228, 2018
- JEONG, B. R.; SIVANESAN, I. Direct adventitious shoot regeneration, *in vitro* flowering, fruiting, secondary metabolite content and antioxidant activity of *Scrophularia takesimensis* Nakai. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, n. 3, p. 607–618, 2015
- KIRDMANEE, C.; KITAYA, Y.; KOZAI, T. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in*

- vitro* and *ex vitro*. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 31, n. 3, p. 144–149, 1995
- KOZAI, T. Resource use efficiency of closed plant production system with artificial light: Concept, estimation and application to plant factory. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 89, n. 10, p. 447–461, 2013
- KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Springer (eds), 2005, 307p.
- MALYSZ, M.; CADORE, D.; TIBOLA, E.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J. M. DESINFESTAÇÃO E MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus dunnii* MAIDEN. **PERSPECTIVA**, v. 35, n. 131, p. 69–77, 2011
- MANIVANNAN, A.; SOUNDARARAJAN, P.; PARK, Y. G.; WEI, H.; KIM, S. H.; JEONG, B. R. Blue and red light-emitting diodes improve the growth and physiology of *in vitro*-grown carnations ‘Green Beauty’ and ‘Purple Beauty’. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 58, n. 1, p. 12–20, 2017
- MARTINS, M. C. M.; HEJAZI, M.; FETTKE, J.; STEUP, M.; FEIL, R.; KRAUSE, U.; ARRIVAUULT, S.; VOSLOH, D.; FIGUEROA, C. M.; IVAKOV, A.; YADAV, U. P.; PIQUES, M.; METZNER, D.; STITT, M.; LUNN, J. E. Feedback inhibition of starch degradation in *Arabidopsis* leaves mediated by trehalose 6-phosphate. **Plant Physiology**, v. 163, n. 3, p. 1142–1163, 2013
- MCCARTHY, A.; CHUNG, M.; IVANOV, A. G.; KROL, M.; INMAN, M.; MAXWELL, D. P.; HÜNER, N. P. An established *Arabidopsis thaliana* var. Landsberg erecta cell suspension culture accumulates chlorophyll and exhibits a stay-green phenotype in response to high external sucrose concentrations. **Journal of Plant Physiology**, v. 199, p. 40-51, 2016
- MAZINGA, K. M.; MARIO, G. J.; BABOY, L. L.; USENI, S. Y.; NYEMBO, K. L.; KASONGO, L. M. E.; VAN, K. M. Effects of carbon sources (sucrose, glucose) and doses of sucrose on the induction of rooting in FHIA (AAAB) banana *in vitro*. **Journal Applied Bioscience**, v. 73, p. 5991–6001, 2014
- MONTEUUIS, O. Micropropagation and production of forest trees. In: PARK, Y.-S.; BONGA, J.; MOON, H.-K. (Ed.). **Vegetative propagation of forest trees**. [s.l.: s.n.]p. 32–55, 2016
- NAMBIAR, N.; TEE, C. S.; MAZIAH, M. Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocormlike bodies in *Dendrobium* Alya Pink. **Plant OMICS**, v. 5, n. 1, p. 10–18, 2012
- NAVROSKI, M. C.; PEREIRA, L. R. S. R. M. M. A. A. R.; OLIVEIRA, C. M. de. *In vitro* establishment and multiplication of genotypes of *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Cerne**, v. 20, n. 1, p. 139–146, 2014
- NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S.; PEREIRA, M. de O.; CURTI, A. R.; PAIM, A. F. Alongamento *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* maiden. **Cerne**, v. 19, n. 4, p. 545–550, 2013
- SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L. F. DE; DIAS, L. L. C.; RÉGO, M. M. DO; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012

- SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; ROCHA, D. I.; CAVATTE, P. C.; DETMANN, K. S. C.; TANAKA, F. A. O.; DIAS, L. L. C.; DAMATTA, F. M.; OTONI, W. C. CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (spreng.) pedersen] plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 87-99, 2014
- SANTOS, R. P.; CRUZ, A. C. F. da; IAREMA, L.; KUKI, K. N.; OTONI, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Ceres**, v. 55, n. 4, p. 356-364, 2008
- SCHMILDT, O.; NETTO, A. T.; SCHMILDT, E. R.; CARVALHO, V. S.; OTONI, W. C.; CAMPOSTRINI, E. Photosynthetic capacity, growth and water relations in 'Golden' papaya cultivated *in vitro* with modifications in light quality, sucrose concentration and ventilation. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 27, n. 1, p. 7-18, 2015
- SHA VALLI KHAN, P. S.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, n. 2, p. 141-146, 2002
- SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DA CUNHA, S. H. B.; LAZZARINI, L. E. S.; TAVARES, M. C.; PINTO, J. E. B. P. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.129, n.3, p. 501-510, 2017
- SINGH, D.; BASU, C.; WOLLWEBER, M. M.; ROTH, B. LEDs for energy efficient greenhouse lighting. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 139-147, 2015
- SIVANESAN, I.; PARK, S. W. Optimizing factors affecting adventitious shoot regeneration, *in vitro* flowering and fruiting of *Withania somnifera* (L.) Dunal. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 323-328, 2015
- SZOPA, A.; EKIERT, H. The importance of applied light quality on the production of lignans and phenolic acids in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. cultures *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 1, p. 115-121, 2016
- TUAN, P. A.; THWE, A. A.; KIM, Y. B.; KIM, J. K.; KIM, S. J.; LEE, S.; CHUNG, S. O.; PARK, S. U. Effects of white, blue, and red light-emitting diodes on carotenoid biosynthetic gene expression levels and carotenoid accumulation in sprouts of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 50, p. 12356-12361, 2013
- TRUEMAN, S. J.; MCMAHON, T. V.; BRISTOW, M. Production of cuttings in response to stock plant temperature in the subtropical eucalypts, *Corymbia citriodora* and *Eucalyptus dunnii*. **New Forests**, v.44, n.2, p.:265-279, 2013
- WANG, J.; LU, W.; TONG, Y.; YANG, Q. Leaf Morphology, Photosynthetic Performance, Chlorophyll Fluorescence, Stomatal Development of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Exposed to Different Ratios of Red Light to Blue Light. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p.1-10, 2016

- WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2.ed. Viçosa: Ed. UFV, 2013, 279p.
- XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 2, p. 149-158, 2011
- YASEEN, M., AHMAD, T., SABLOK, G., STANDARDI, A., HAFIZ, I. A.. Role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. **Molecular biology reports**, v.40, n.4, p.2837-2849, 2013
- YUAN, H.; ZHANG, J.; NAGESWARAN, D.; LI, L. Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. **Horticulture research**, v. 2, e.15036, 2015
- ZAHARA, M.; DATTA, A.; BOONKORKAEW, P. Effects of sucrose, carrot juice and culture media on growth and net CO₂ exchange rate in *Phalaenopsis* hybrid “Pink”. **Scientia Horticulturae**, v. 205, p. 17–24, 2016
- ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 37, n. 6, p. 807–813, 2001
- ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. **Annals of Botany**, v. 85, n. 5, p. 587–592, 2000

OSZÔNIO NA ESTERILIZAÇÃO DE BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA NA MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES DE *Eucalyptus* spp.

Resumo – A contaminação microbiológica constitui-se em uma das principais dificuldades no estabelecimento de novas técnicas para micropropagação de tecidos vegetais, como a utilização de biorreatores de imersão temporária. Nesse sentido, novos procedimentos para sanitização visam minimizar os efeitos da fragilidade dos materiais dos biorreatores e resistência dos microrganismos aos tratamentos sanitizantes convencionalmente utilizados. O uso do gás ozônio (O_3) para sanitização de biorreatores de imersão temporária foi avaliada em esquema fatorial 2^3 avaliando o tempo de tratamento, concentração de O_3 e umidade do gás como variáveis independentes. Após 15 min de ozonização, com fluxo de O_3 de $0,5 \text{ L min}^{-1}$ e concentração de 50 mg L^{-1} , observou-se completa inibição da contaminação microbiológica avaliada ao longo de 21 dias. A avaliação energética da ozonização como alternativa para sanitização dos biorreatores em relação ao uso de autoclave mostrou melhor eficiência energética do processo de ozonização, com redução dos custos operacionais.

Palavras-chave: Propagação *in vitro*, ozonização; sanitização; sistemas líquidos.

1. Introdução

A micropropagação vegetal apresenta diversas aplicações na área florestal, como aquelas relacionadas à conservação de germoplasma *in vitro*, rejuvenescimento e/ou revigoramento, limpeza clonal, intercâmbio de material vegetal, pesquisas de poliploidização, além de constituir a base de outras técnicas biotecnológicas tais como a transformação genética (Vengadesan et al., 2002; Gomes e Canhoto, 2009; Oliveira et al., 2011; Amoo et al., 2012; Dolce et al., 2018). No entanto, ainda permanecem vários desafios dessa técnica que têm impedido de torna-la de uso na produção em larga escala e viabilização econômica.

A produção de mudas via micropropagação em larga escala utilizando biorreatores apresenta um mercado crescente e de grande potencial, sendo que os de imersão temporária têm sido os mais avaliados para propagação em larga escala de

diversas espécies, inclusive espécies arbóreas (Polzin et al., 2014; Akdemir et al., 2014; Gatti et al., 2017; Mosqueda et al., 2017; Vives et al., 2017). No entanto, dentre os principais desafios para uma maior utilização dos biorreatores, como o aumento da produtividade, uniformidade do desenvolvimento de brotações com qualidade para o plantio e redução dos custos (Ahmadian et al., 2015), destaca-se os problemas de contaminação biológica (Klayraung et al., 2017).

A contaminação biológica, principalmente por bactérias e fungos, constitui-se em um importante problema para a cultura *in vitro* de tecidos vegetais. Essa contaminação pode estar relacionada a fatores ambientais, manipulação inadequada, insumos utilizados, preparação do meio de cultura, com a contaminação gerada pela esterilização ineficiente do recipiente utilizado na produção *in vitro*, pelas superfícies em contato do recipiente com o meio de cultura/tecido vegetal e contaminação prévia dos tecidos vegetais (Ahmadian et al., 2015; Javed et al., 2017). Diante dessa situação encontrada na micropropagação, a manutenção da assepsia de todo o processo de micropropagação tem sido fundamental para o seu sucesso (Ndakidemi et al., 2013). Também nesse sentido, a esterilização dos biorreatores visando a redução dos problemas com contaminação biológica, constitui-se em importante passo para a sua ampla implementação na micropropagação de tecidos vegetais.

A autoclavagem, tradicionalmente utilizada em laboratórios de cultura de tecidos como forma de esterilização, tem sido utilizada para esterilização dos biorreatores. Entretanto, além dos possíveis danos ao material dos biorreatores devido à alta temperatura e pressão, os quais geralmente são confeccionados de policarbonato, a autoclavagem apresenta elevados custos do equipamento, consumo de energia e riscos atribuídos à sua operação. Outra opção seria o uso de produtos químicos, embora tóxicos para os tecidos vegetais, tem-se utilizado agentes esterilizantes, como hipoclorito de cálcio ou sódio, etanol, nitrato de prata, peróxido de hidrogênio, cloreto de mercúrio, entre outros (Mihaljevic et al., 2013; Ndakidemi et al., 2013). Estes procedimentos poderiam ser adotados para higienização dos biorreatores, entretanto, além do maior consumo e gasto com produtos químicos, haveria uma maior geração dos resíduos químicos provenientes desse processo de lavagem dos biorreatores.

O desenvolvimento de protocolos alternativos para esterilização dos biorreatores, que permita superar os problemas dos métodos atuais com menor custo, seria fundamental para o uso desta tecnologia em larga escala. Dentre as novas

tecnologias para esterilização o ozônio (O₃) destaca-se como poderoso agente esterilizante devido ao seu elevado potencial oxidativo, bem como a formação de radicais que apresentam potenciais oxidativos ainda mais elevados (Grimes et al., 1983; Javier Benitez et al., 2002; Greene et al., 2012). Devido à sua instabilidade em condições ambientais de temperatura e pressão, o O₃ não deixa resíduos tóxicos no ambiente em que é aplicado, decompondo-se em oxigênio (O₂) (Khadre et al., 2001).

O O₃ apresenta potencial antimicrobiano, antifúngico e detoxificante (Hudson e Sharma, 2009; Alencar et al., 2012, Alexopoulos et al., 2013; Tordiglione et al., 2014; Ong e Ali, 2015; Zhang et al., 2015; Bridges et al., 2018). Além do potencial para descontaminação de superfícies nas indústrias de alimentos (Guzel-Seydim et al., 2004; Kohli, 2015; Guzzon et al., 2017; Eglezos e Dykes, 2018;) e de superfícies de materiais delicados como polivinil siloxano (Celebi et al., 2018), o O₃ é reconhecidamente seguro para aplicação direta em alimentos e no tratamento de água (Khadre et al., 2001; Guzel-Seydim et al., 2004; Thompson e Drago, 2015). Além disso, o uso do O₃ foi positivamente avaliado na micropropagação de *Aloe barbadensis* (Mariateresa et al., 2014).

Considerando a utilização dos biorreatores de imersão temporária para a propagação de diversas espécies vegetais e o potencial antimicrobiano do ozônio, este trabalho teve como objetivo principal a avaliação da substituição da autoclavagem de biorreatores de imersão temporária para micropropagação de tecidos vegetais pela sanitização com gás O₃, testando diferentes concentrações e tempos de tratamento.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal e biorreator utilizado

2.1.1. Biorreator

Utilizou-se o biorreator de imersão temporária Plantform[®] (Plantform, Lomma, Suécia) de policarbonato com dimensões de 180x150x150 mm (Figura 1). Neste biorreator, o meio líquido foi colocado em um recipiente inferior e o material vegetal em um recipiente sobre o meio. O biorreator foi ligado a um compressor que

bombeou o ar para a câmara contendo meio líquido, elevando o nível do meio e imergindo temporariamente o material vegetal.

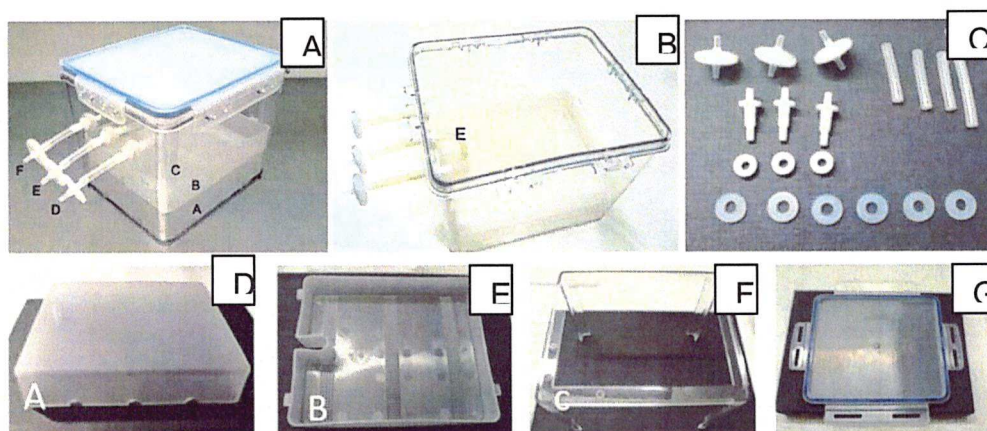


Figura 1. Biorreator e suas diferentes partes numeradas de A-G. A: Recipiente exterior com 3 entradas/saídas para troca de gás; B: Filtro do meio conectado a um tubo plástico na câmara interna, filtros; C: tubos de plástico, porcas, grampos e anéis de silicone para ser conectado às 3 entradas/saídas no recipiente externo; D: Câmara interna com 3 ranhuras no lado e ligação ao filtro do meio; E: Cesta com 3 filas de pequenos furos; F: Quadro com 4 pernas; G: Tampa com 4 abas. (Fonte: http://www.plantform.se/db/technical_improvement.pdf)

2.2. Material Vegetal

Os explantes do clone de *Eucalyptus urophylla* utilizados no presente trabalho foram obtidos a partir do banco clonal *in vitro*, estabelecidos via micropropagação, localizado no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa – UFV, localizado no município de Viçosa, Minas Gerais.

Para multiplicação dos explantes, foram utilizados tufo contendo de seis a oito gemas diferenciadas, cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL meio de cultura JADS (Correia et al., 1995), suplementado com mio-inositol ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), ágar (7 g L^{-1}), sacarose (30 g L^{-1}), $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (6 - benzilaminopurina), $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA (ácido naftalenoacético) e PVP ($0,8 \text{ g L}^{-1}$), com pH ajustado para $5,8 \pm 0,01$ antes da adição do ágar. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min.

No cultivo dos clones, via micropropagação, as condições ambientais da sala de crescimento do laboratório foram mantidas com temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e com fotoperíodo de 16 h, com irradiância de $33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (quantificada por radiômetro

LI-COR[®], LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram[®], Brasil).

Para estabelecimento nos biorreatores o material vegetal utilizado foi pré-estabelecido *in vitro* em meio de cultura semissólido, cultivado em placas de Petri estéreis e descartáveis (90 mm (D) x 15 mm (H)). Cada placa continha 25 mL de meio JADS suplementado com mio-inositol (0,1 g L⁻¹), ágar (7 g L⁻¹), sacarose (30 g L⁻¹), 0,5 mg L⁻¹ de BAP (6 - benzilaminopurina), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (α -ácido naftalenoacético) e PVP (0,8 g L⁻¹), com pH ajustado para $5,8 \pm 0,01$ antes da adição do ágar. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 20 min. Os explantes foram assepticamente extraídos, em câmara de fluxo laminar sendo separados com auxílio de pinças e bisturis. Para cada explante utilizado na extração dos tufos, o instrumento era imerso em álcool e flambado. Em cada placa foram colocados 10 explantes e mantidos nas condições de sala de crescimento citadas por sete dias.

2.2. Obtenção e quantificação do ozônio (O₃)

O ozônio (O₃) foi obtido por meio de um gerador O&L3 ORM (Ozone & Life, São José dos Campos, Brasil), utilizando como insumo gás oxigênio isento de umidade. O oxigênio foi concentrado a partir do ar atmosférico com o auxílio do concentrador de oxigênio Oxixul, Mark 5 Plus (Ozonebras, Curitiba, Brasil), sendo as diferentes concentrações de ozônio produzidas controladas pelo dosador do equipamento. A concentração do ozônio foi determinada pelo método iodométrico, por titulação indireta (Birdsall et al., 1952). Este método consiste no borbulhamento do gás ozônio em 50 mL de solução de iodeto de potássio (KI) por 30 s. Desta reação, ou seja, da oxidação do KI pelo ozônio, ocorre a liberação de iodo (I₂). Posteriormente, adicionou-se 2,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1 mol L⁻¹ na solução para evitar a decomposição do iodo em iodato. Procedeu-se a titulação com tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) a 0,1 mol L⁻¹ até que a coloração castanha do iodo se tornasse quase transparente. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução indicadora de amido a 1% (v/v) e continuou titulando com tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) a 0,1 mol L⁻¹ até o completo desaparecimento da coloração azul.

2.3. Arranjo experimental

Os biorreatores secos e vazios foram submetidos ao tratamento com ozônio a partir da injeção do gás com fluxo de $0,5 \text{ L min}^{-1}$ pela entrada do biorreator (Figura 1-A). O gás residual do biorreator foi direcionado, a partir de uma das saídas do biorreator para um catalisador de O_3 . O ozonizador foi conectado a entrada E, na qual o O_3 era injetado; na conexão D foi destinada para a saída do O_3 do sistema. A entrada F foi isolada para não haver perda no sistema. A concentração de ozônio, tempo de tratamento e teor de umidade do gás O_3 foram adotados de acordo com o planejamento experimental descrito no ítem 2.5. Para variar a umidade do gás, utilizou-se uma solução saturada de NaCl para borbulhar o O_3 antes da sua injeção no biorreator (Ozkan et al., 2011; Santos et al., 2016). Os experimentos foram conduzidos em ambiente com controle de temperatura a $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.4. Avaliações experimentais

Após o tratamento dos biorreatores com ozônio, estes foram levados à câmara de fluxo laminar para adicionar o meio de cultura e os explantes, em ambiente asséptico. O meio de cultura utilizado foi o JADS (Correia et al., 1995), suplementado com mio-inositol ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), ágar (7 g L^{-1}), sacarose (30 g L^{-1}), $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (6 - benzilaminopurina), $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA (ácido naftalenoacético) e PVP ($0,8 \text{ g L}^{-1}$), com pH ajustado para $5,8 \pm 0,01$ antes da adição do ágar. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a uma pressão de $1,5 \text{ atm}$ e temperatura de $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min.

Os explantes estabelecidos nas placas de Petri, como descrito no ítem 2.2.2., foram transferidos com auxílio de uma pinça evitando contato com as superfícies do biorreator. Placas que apresentavam algum tipo de contaminação foram descartadas.

Para avaliar a contaminação dos biorreatores após o tratamento com O_3 , foi realizada quantificação do número de biorreatores contaminados cada 7 dias durante 21 dias. As contaminações foram determinadas por avaliações visuais da presença de fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante.

2.5. Análise estatística

Os experimentos seguiram o delineamento experimental inteiramente ao acaso em esquema fatorial completo 2^3 . As variáveis independentes em estudo foram a concentração de O_3 , o tempo de ozonização e a umidade do O_3 . Os níveis superior (+1) e inferior (-1) de cada variável independente avaliada são apresentados na Tabela 1. O planejamento fatorial (Tabela 2) e os resultados obtidos foram avaliados com auxílio do *software* Statistica 12.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA).

Tabela 1. Variáveis independentes do delineamento experimental em esquema fatorial completo 2^3 .

Variável independente	Níveis	
	-1	+1
Concentração O_3 ($mg L^{-1}$) [ppmv]	5,00 [2.679,6]	50,00 [26.784,9]
Tempo (min)	5	15
Umidade O_3 (%)	0,0	75,0

Tabela 2. Delineamento experimental em esquema fatorial completo 2^3 com valores codificados e originais das variáveis em estudo (concentração de O_3 , tempo de exposição e umidade do O_3).

Repetição	Valores codificados			Valores originais		
	$[O_3]$ ($mg L^{-1}$)	Tempo (min)	Umidade O_3 (%)	$[O_3]$ ($mg L^{-1}$)	Tempo (min)	Umidade O_3 (%)
1	-1	-1	-1	5,00	5	0,0
1	+1	-1	-1	50,00	5	0,0
1	-1	+1	-1	5,00	15	0,0
1	+1	+1	-1	50,00	15	0,0
1	-1	-1	+1	5,00	5	75,0
1	+1	-1	+1	50,00	5	75,0
1	-1	+1	+1	5,00	15	75,0
1	+1	+1	+1	50,00	15	75,0
2	-1	-1	-1	5,00	5	0,0
2	+1	-1	-1	50,00	5	0,0
2	-1	+1	-1	5,00	15	0,0
2	+1	+1	-1	50,00	15	0,0
2	-1	-1	+1	5,00	5	75,0
2	+1	-1	+1	50,00	5	75,0
2	-1	+1	+1	5,00	15	75,0
2	+1	+1	+1	50,00	15	75,0

3. Resultados

A taxa de contaminação diminuiu com o aumento do tempo de tratamento com ozônio, em relação à contaminação dos biorreatores (Figura 2). O efeito observado para o tempo de tratamento em relação à contaminação dos biorreatores foi negativo, indicando que maiores tempos de exposição levaram a menores contaminações. As variáveis umidade e concentração de ozônio, dentro das faixas avaliadas, não foram significativas para contaminação dos biorreatores. No tratamento sem esterilização, houve 100% de contaminação após 24 h.

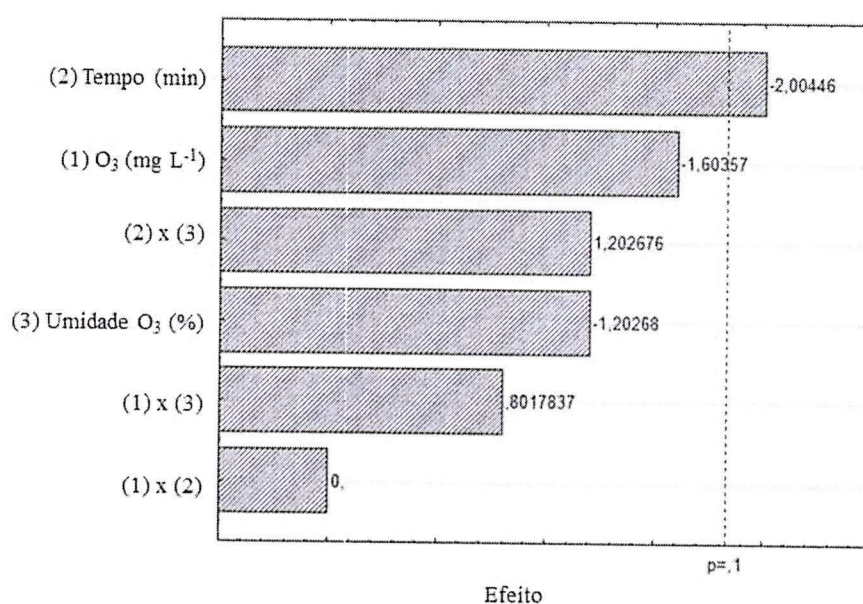


Figura 2. Diagrama de Pareto dos efeitos dos fatores tempo de exposição (min), concentração de ozônio (mg L⁻¹) e umidade do gás ozônio (%) sobre a contaminação dos biorreatores após tratamento com ozônio.

Considerando-se os tratamentos com a umidade do gás ozônio de 75% (Figura 3) ou com umidade de 0% (Figura 3b), observa-se que os maiores tempos de exposição do biorreator ao gás ozônio, resultaram nos menores índices de contaminação por microrganismos. Os dados de contaminação na Figura 3 mostraram que, a concentração ideal para a esterilização total do biorreator, aonde a contaminação foi completamente eliminada, seria após exposição dos biorreatores a 50 mg L⁻¹ de O₃ por 15 min em fluxo constante de 0,5 L min⁻¹.

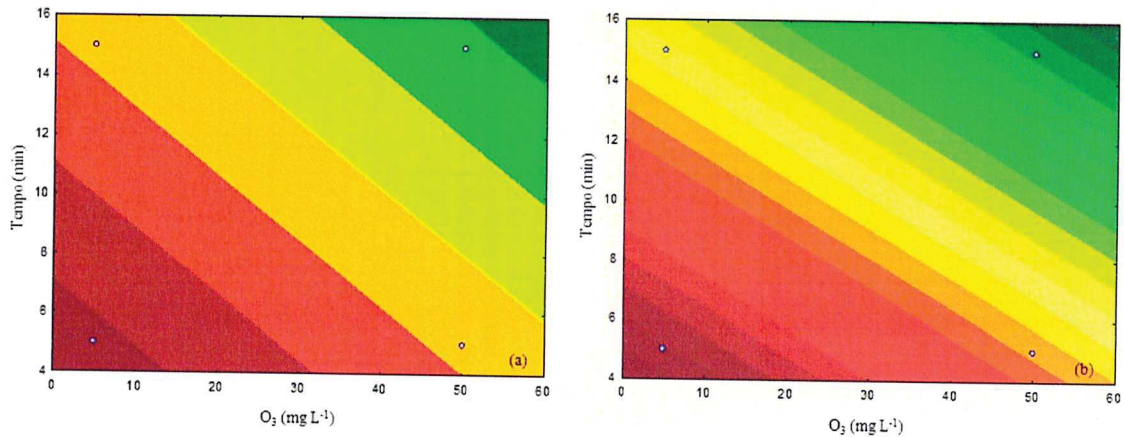


Figura 3. Curvas de contorno dos efeitos das variáveis independentes tempo de exposição (min) e concentração do gás ozônio (mg L^{-1}) sobre a contaminação de biorreatores para o gás ozônio com umidade de 75% (a) e 0% de umidade (b).

4. Discussão

Várias técnicas de sanitização de superfícies têm sido avaliadas como alternativas à esterilização com autoclaves na cultura de tecidos, microbiologia entre outras áreas. Além de aumentar a eficiência na sanitização das superfícies, novas técnicas podem representar uma estratégia para redução dos custos operacionais e evitar a seleção de microrganismos resistentes aos processos de sanitização tradicionais. Para os biorreatores de imersão temporária, novas alternativas ao uso das autoclaves buscam além da redução do custo com energia elétrica, maior vida útil pela redução dos danos ao material dos biorreatores.

A esterilização de biorreatores tem sido dificultada pelos vários acessórios que compõem o equipamento. Estruturas internas para suporte de explantes e separação do meio, mangueiras para condução de ar, estruturas para fixação das partes durante a injeção de ar, maior superfície de contato, maior número de peças para fechamento hermético. Comparativamente à tratamentos com sanitizantes líquidos, o tratamento com gás ozônio apresenta a vantagem de conseguir alcançar áreas e irregularidades das superfícies que são mais difíceis de serem alcançadas utilizando-se líquidos (Gómez-López et al., 2009). Sendo assim, o uso de gás ozônio facilita o contato desse com estas áreas de maneira uniforme e constante, atingindo áreas que o uso de esterilizantes químicos não conseguiriam atingir e que o processo de autoclavagem é ineficiente para eliminação de microrganismos fitopatogênicos.

No presente trabalho, a contaminação dos biorreatores por bactérias, leveduras, ou qualquer outro microrganismo foi completamente eliminada após exposição dos biorreatores a 50 mg L^{-1} de O_3 por 15 min em fluxo constante de $0,5 \text{ L min}^{-1}$. Para garantir a assepsia do processo de utilização de biorreatores de imersão temporal, o sistema de descontaminação com uso de ozônio proposto pelo presente trabalho é uma solução viável e segura para desinfecção de superfícies dos biorreatores. A concentração sugerida no presente trabalho pode controlar a contaminação de microrganismos nesses recipientes em um nível considerado normal de contaminação, desde que todas as demais medidas de assepsia na câmara de fluxo e na manipulação de explantes, bem como a manutenção do equipamento em área limpa com controle de umidade, temperatura e fotoperíodo sejam seguidas.

Outras técnicas de sanitização, como a autoclavagem, utilização de peróxido de hidrogênio, ácido clorídrico, hipoclorito de sódio, tiamina, entre outros, foram avaliadas previamente (dados não apresentados) para desinfecção das superfícies dos biorreatores, mas não foram efetivas no controle da contaminação. Estes tratamentos apresentaram 100% de contaminação na primeira semana após serem inoculados os explantes e colocados em sala de crescimento para desenvolvimento. Adicionalmente, o ácido clorídrico provocou morte dos explantes nas primeiras 24 h de estabelecidos no sistema.

O efeito diferencial do gás ozônio em relação as outras técnicas de esterilização seria, segundo a literatura a literatura especializada, que este provoca a lise das membranas celulares por meio de oxidação, com consequente morte celular. Ong e Ali (2015) analisaram o efeito do ozônio sobre um fungo e observou a degradação das mitocôndrias após 24 h de tratamento com ozônio, notando que, quanto maior a quantidade de ozônio aplicado, maior o dano mitocondrial, atingindo inativação praticamente completa em tratamentos com 5 mL L^{-1} de ozônio.

A utilização do gás ozônio como sanitizante para biorreatores de imersão temporal ainda apresenta vantagem do ponto de vista financeiro. O custo (Base cotação de 2018 do valor do dólar no Brasil) de aquisição do ozonizador é de aproximadamente US\$ 1.515,15. O ozonizador pode operar com oxigênio obtido a partir de um concentrador de O_2 do ar ambiente. O custo médio de um concentrador de oxigênio é de US\$ 1.212,12. Considerando o preço do kWh igual a US\$ 0,2371 as especificações de consumo energético dos equipamentos utilizados nesse trabalho (Tabela 2), o custo de operação de 15 min do gerador de ozônio e do concentrador de

oxigênio seria de US\$ 0,032. Assim, quando comparado ao custo fixo de aquisição de uma autoclave (US\$ 3.621,21) e o custo operacional de consumo energético (US\$ 0,32), a ozonização dos biorreatores apresenta uma vantagem econômica de operação. Além, é claro, dos menores riscos de operação, ausência de resíduos químicos e de danos ao material do biorreator.

Tabela 3. Especificações técnicas e custo operacional para ozonização e autoclavagem de biorreatores de imersão temporária.

Equipamento	Potência (W)	Tempo de operação (min)	Consumo energético (kWh)	Custo de operação (US\$)
Concentrador de oxigênio	450	15	0,112	0,026
Gerador de ozônio	100	15	0,025	0,006
Autoclave	4.000	20	1,330	0,32

Dolar base: R\$ 3,30 (Ano 2018- Brasil).

5. Conclusões

1. A esterilização com ozônio pode substituir esterilização com o uso de autoclave em biorreatores.
2. Quanto maior o tempo de exposição ao ozônio e maior a concentração do mesmo menor a contaminação.
3. A contaminação dos biorreatores por microrganismos foi completamente eliminada após exposição dos biorreatores a 50 mg L⁻¹ de O₃ por 15 min em fluxo constante de 0,5 L min⁻¹.
4. A sanitização com ozônio apresenta vantagem econômica e ambiental em relação ao uso de autoclave para sanitização de biorreatores.

6. Bibliografia

- AHMADIAN, M.; BABAEI, A. R.; SHOKRI, S.; HESSAMI, S.; ARAB, M. M. Controlling the *in vitro* contamination of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) single nodes explant by Nano-silver. **International Journal of Agriculture and Biosciences**, v. 4, n. 4, p. 167–170, 2015
- AKDEMIR, H.; SÜZERER, V.; ONAY, A.; TILKAT, E.; ERSALI, Y.; ÇIFTÇI, Y. O. Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 1, p. 65–76, 2014

- ALEXOPOULOS, A.; PLESSAS, S.; CECIU, S.; LAZAR, V.; MANTZOURANI, I.; VOIDAROU, C.; STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLOU, E. Evaluation of ozone efficacy on the reduction of microbial population of fresh cut lettuce (*Lactuca sativa*) and green bell pepper (*Capsicum annuum*). **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 491–496, 2013
- AMOO, S. O.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. *In vitro* plant regeneration, secondary metabolite production and antioxidant activity of micropropagated *Aloe arborescens* Mill. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 111, n. 3, p. 345–358, 2012
- BIRDSALL, C.; JENKINS, A.; SPADINGER, E. Iodometric Determination of Ozone. **Anal. Chem.**, v. 24, p. 662–664, 1952. BOXUS, P. h. The production of strawberry plants by *in vitro* micro-propagation. **Journal of Horticultural Science**, v. 49, n. 3, p. 209–210, 1974
- BRIDGES, D. F.; RANE, B.; WU, V. C. H. The effectiveness of closed-circulation gaseous chlorine dioxide or ozone treatment against bacterial pathogens on produce. **Food Control**, v. 91, p. 261–267, 2018
- CELEBI, H.; BÜYÜKERKMEYEN, E. B.; TORLAK, E. Disinfection of polyvinyl siloxane impression material by gaseous ozone. **Journal of Prosthetic Dentistry**, 2018
- CORREIA, D.; GONÇALVES, A.; COUTO, H.; RIBEIRO, M. Efeito do meio de cultura líquido e semi-sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **Ipef**, v. 48/49, p. 107–116, 1995
- DE ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. D. A.; SOARES, N. de F. F.; DA SILVA, W. A.; DA SILVA CARVALHO, M. C. Efficacy of ozone as a fungicidal and detoxifying agent of aflatoxins in peanuts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 4, p. 899–905, 2012
- DOLCE, N. R.; FALOCI, M. M.; GONZALEZ, A. M. *In vitro* plant regeneration and cryopreservation of *Arachis glabrata* (Fabaceae) using leaflet explants. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 54, n. 2, p. 133–144, 2018
- EBIHARA, K.; STRYCZEWSKA, H. D.; MITSUGI, F.; IKEGAMI, T.; SAKAI, T.; PAWLAT, J.; TEII, S. Recent development of ozone treatment for agricultural soil sterilization and biomedical prevention. **Przegląd Elektrotechniczny**, v. 88, p. 92–94, 2012
- EGLEZOS, S.; DYKES, G. A. Reduction of Environmental Listeria Using Gaseous Ozone in a Cheese Processing Facility. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 5, p. 795–798, maio 2018
- GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 45, n. 1, p. 72–82, 2009
- GÓMEZ-LÓPEZ, V. M.; RAJKOVIC, A.; RAGAERT, P.; SMIGIC, N.; DEVLIEGHERE, F. Chlorine dioxide for minimally processed produce preservation: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v.20, n.1, p.17-26, 2009

- GRIMES, H. D.; PERKINS, K. K.; BOSS, W. F. Ozone Degrades into Hydroxyl Radical under Physiological Conditions: A Spin Trapping Study. **Plant Physiology**, v. 72, n. 4, p. 1016–1020, 1983
- GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Use of ozone in the food industry LWT. **Food Science and Technology**, v.37, p.453-460, 2004.
- GUZZON, R.; BERNARD, M.; BARNABA, C.; BERTOLDI, D.; PIXNER, K.; LARCHER, R. The impact of different barrel sanitation approaches on the spoilage microflora and phenols composition of wine. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 3, p. 810–821, 2017
- HUDSON, J. B.; SHARMA, M. The practical application of ozone gas as an anti-fungal (anti-mold) agent. **Ozone: Science and Engineering**, v. 31, n. 4, p. 326–332, 2009
- HUSAIN, M. K.; ANIS, M. Rapid *in vitro* multiplication of *Melia azedarach* L. (a multipurpose woody tree). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 4, p. 765–772, 2009
- JAVED, S. B.; ALATAR, A. A.; BASAHI, R.; ANIS, M.; FAISAL, M.; HUSAIN, F. M. Copper induced suppression of systemic microbial contamination in *Erythrina variegata* L. during *in vitro* culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 2, p. 249–258, 2017
- JAVIER BENITEZ, F.; ACERO, J. L.; REAL, F. J. Degradation of carbofuran by using ozone, UV radiation and advanced oxidation processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 89, n. 1, p. 51–65, 2002
- KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. **Journal of Food Science**, V. 66, n. 9, p.21242-1252, 2001
- KLAYRAUNG, S.; NIAMSUP, P.; POONNOY, P.; TOPOONYANONT, N. Diversity and control of bacterial contamination of plants propagated in temporary immersion bioreactor system. **Acta Horticulturae**, 1155, 439-446, 2017
- KOHLI, R. UV-Ozone Cleaning for Removal of Surface Contaminants. Developments in Surface Contamination and Cleaning. In: KOHLI, R.; Mittal, K. L.(eds) **Developments in Surface Contamination and Cleaning**. William Andrew Publishing, 2015. p. 71-104
- MARIATERESA, C.; MARIA, C. S. C.; GIUSEPPE, C. Influence of ozone treatments on *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* in continuous immersion bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 194–201, 2014
- MIHALJEVIC, I.; DUGALIC, K.; TOMAS, V.; VILJEVAC, M.; PRANJIC, A.; CMELIK, Z.; PUSKAR, B.; JURKOVIC, Z. *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of ‘oblacinska’ sour cherry. **Journal of Agricultural Sciences, Belgrade**, v. 58, n. 2, p. 117–126, 2013
- MOSQUEDA FRÓMETA, O.; ESCALONA MORGADO, M. M.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; PINA MORGADO, D. T.; DAQUINTA GRADAILLE, M. A. *In vitro* propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. in a temporary immersion bioreactor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 3, p. 543–551, 2017

- NDAKIDEMI, C. F.; MNENEY, E.; NDAKIDEMI, P. A. Development of Sanitation Protocol for Leaf Explants of *B. huillensis* for *in vitro* Culture. **American Journal of Plant Sciences**, v.4, v.12, p.2425-2430, 2013
- GREENE, A. K.; GÜZEL-SEYDIM, Z. B.; SEYDIM, A. C. Chemical and Physical Properties of Ozone. In: O'DONNELL, C.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; RICE, R. G. **Ozone in Food Processing**. John Wiley and Sons, 2012, p. 19–32.
- DEBIASE, C. Utilização de biorreatores de imersão temporária numa biofábrica de açúcar, In: GERALD, L. T. S. (Ed.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. ed. São Paulo: Atiqua, 2011, p.100-116.
- OLIVEIRA, M. L. de; XAVIER, A.; PENCHEL, R. M.; SANTOS, A. F. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissemi-sólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 39, n. 91, p. 309–315, 2011
- ONG, M. K.; ALI, A. Antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. **Postharvest Biology and Technology**, v. 100, p. 113–119, 2015
- POLZIN, F.; SYLVESTRE, I.; DÉCHAMP, E.; ILBERT, P.; ETIENNE, H.; ENGELMANN, F. Effect of activated charcoal on multiplication of African yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA®). **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 50, n. 2, p. 210–216, 2014
- SANTOS, R. R.; FARONI, L. R. D.; CECON, P. R.; FERREIRA, A. P. S.; PEREIRA, O. L.; SANTOS, R. R.; FARONI, L. R. D.; CECON, P. R.; FERREIRA, A. P. S.; PEREIRA, O. L. Ozone as fungicide in rice grains. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 3, p. 230–235, 2016
- OZKAN, R.; SMILANICK, J. L.; KARABULUT, O. A. Toxicity of ozone gas to conidia of *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, and *Botrytis cinerea* and control of gray mold on table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v.60, n.1, p.47-51, 2011
- THOMPSON, C. M.; DRAGO, J. A. North American installed water treatment ozone systems. **Journal - American Water Works Association**, v. 107, n. 10, p. 45–55, 2015
- TORDIGLIONE, P.; MORSELLI, F. S. M. A.; SCARPA, I.; PUGGIONI, G.; MANCINI, C.; ROSA, G.; GIORDANO, A. Evaluation of Ozone Activity on Recent Clinically Isolated Bacterial Strains. **Advances in Microbiology**, v. 04, n. 02, p. 106–115, 2014
- VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; AMUTHA, S.; SELVARAJ, N. *In vitro* propagation of Acacia species- a review. **Plant Science**, v. 163, n. 4, p. 663–671, 2002
- VIVES, K.; ANDÚJAR, I.; LORENZO, J. C.; CONCEPCIÓN, O.; HERNÁNDEZ, M.; ESCALONA, M. Comparison of different *in vitro* micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT®). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 131, n. 1, p. 195–199, 2017

ZHANG, Y.; WU, Q.; ZHANG, J.; YANG, X. Effects of ozone on the cytomembrane and ultrastructure of *Pseudomonas aeruginosa*. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 987–993, 2015

EFEITO DA ESTERILIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA COM OZÔNIO E DA SACAROSE NA MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE CLONES DE *Eucalyptus* spp. EM BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

Resumo – O uso de biorreatores na condição *in vitro* tem como proposta contornar algumas dificuldades na micropropagação encontradas na metodologia tradicional, podendo ser usado como fonte de material vegetal para uso na condição *ex vitro* em viveiros, seja como microjardim clonal ou como fornecer de material rejuvenescido/revigorado aos minijardins *ex vitro*. Sendo assim, em vista da importância do desenvolvimento de novas tecnologias e manejo das condições de cultivo sobre o desenvolvimento das culturas, os objetivos deste estudo foram avaliar diferentes concentrações de sacarose, uso de esterilização química de meio de cultura e o uso de biorreatores, na fase de multiplicação de gemas axilares de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e de um clone de *Eucalyptus benthamii*. O tratamento do meio de cultura com ozônio foi eficiente para impedir a contaminação do meio com microorganismos em 90 min a 50 mg L⁻¹ em fluxo de 0,5 L min⁻¹. A adição de sacarose ao meio de cultura em concentração de 30 g L⁻¹ teve efeito positivo no vigor do material vegetal, no número de brotações e a na média de brotações alongadas, porém, proporcionou maior oxidação do meio de cultura.

Palavras-chave: Ozonização; sanitização; micropropagação; meio de cultura.

1. Introdução

A silvicultura clonal é uma técnica amplamente utilizada na área florestal devido à sua capacidade de aumentar a produtividade florestal, porém, esta técnica depende da capacidade de propagar o material de qualidade superior por métodos vegetativos. Existem duas formas de propagação vegetativa na silvicultura: i) Macropropagação ou suas derivações - obtenção de estacas e posterior enraizamento; e ii) Micropropagação - cultura de tecidos *in vitro* de materiais juvenis (embriões, cotilédones) ou maduros (meristemas) (Arencibia et al., 2017). O uso da micropropagação ainda é restrito devido, principalmente, ao custo desta técnica em relação à macropropagação, tornando-a inviável economicamente em escala comercial.

O desenvolvimento de novas tecnologias para produção de mudas micropropagadas em larga escala, em especial para espécies florestais de interesse econômico como as do gênero *Eucalyptus*, é um dos requisitos para tornar esta técnica comercialmente viável (Oliveira, 2009). Dentre as novas tecnologias, o uso de biorreatores apresenta vantagens em relação à micropropagação tradicional, que incluem o aumento da taxa de multiplicação, o crescimento mais rápido e de maior qualidade da cultura, uso de meio líquido e a redução nos custos médio de energia, mão de obra e espaço de laboratório (Akdemir et al., 2014; Polzin et al., 2014; Gatti et al., 2017; Mosqueda Frómata et al., 2017; Vives et al., 2017). Vários trabalhos utilizando *Eucalyptus* spp. em biorreatores apresentaram resultados satisfatórios quando comparados com a utilização de sistemas tradicionais de micropropagação (Dutra et al., 2009; Oliveira et al., 2011a; Oliveira et al., 2011b; Correia, 2011; Watt, 2012; Palhares, 2013; Oliveira et al., 2014; Ramlal, 2014; Máximo, 2014; Da Silva et al., 2015).

Outra estratégia para tornar viável a micropropagação é o desenvolvimento de tecnologias alternativas, melhorando protocolos de esterilização e tornando esta técnica menos onerosa sem prejuízo ao desenvolvimento do material vegetal. A etapa inicial para micropropagação de uma espécie *in vitro* é o preparo do meio de cultura e sua esterilização, comumente por autoclavagem, e assepsia dos explantes que darão início ao cultivo. A esterilização física por autoclavagem utiliza altas temperaturas (121°C) e pressão (1 kgf cm⁻²) por períodos que variam de 15 a 30 min. A autoclavagem apresenta como desvantagem os elevados custos do equipamento, consumo de energia e riscos atribuídos à sua operação. Por isso, embora tóxicos para os tecidos vegetais, tem-se utilizado agentes químicos esterilizantes, como hipoclorito de cálcio ou sódio, etanol, nitrato de prata, peróxido de hidrogênio, cloreto de mercúrio, entre outros (Rout et al., 2000; Mihaljevic et al., 2013; Ndakidemi et al., 2013). Contudo, tem-se verificado certo grau de fitotoxicidade destes produtos, o que limita o ajuste final de protocolos espécie-específicos (Vargas et al., 2016).

Como estratégia para substituição da autoclavagem e eliminação do efeito fitotóxico de agentes químicos esterilizantes, o O₃ destaca-se como um novo método para eliminar as contaminações nos biorreatores causados pela presença de microrganismos, principalmente bactérias e fungos, dentro dos tecidos vegetais para produção de mudas em larga escala (Dewir et al., 2005).

O O₃ é um poderoso desinfetante oxidante com ampla faixa de aplicação. A Organização Mundial da Saúde recomenda o seu uso e ele é amplamente aplicada na desinfecção de água, alimentos e locais que exigem condições assépticas extremas, como salas de operação (Loeb, 2011). Jova e Ivanov (2014) utilizaram o ozônio como uma alternativa para substituir o hipoclorito de sódio para desinfecção de segmentos nodais de inhame. Cardarelli et al. (2014) concluiu que o uso de O₃ dentro do biorreator é uma ferramenta adequada para eliminar as contaminações no substrato líquido sem o uso de substâncias químicas nocivas.

Além de novas tecnologias para tornar a micropropagação mais eficiente e econômica, alterações nos protocolos relacionados ao meio de cultura também tem sido pesquisadas buscando maior aproveitamento final do material produzido *in vitro*. No processo de cultura de tecidos as maiores perdas são atribuídas à contaminação e ao estresse do transplante da condição *in vitro* a *ex vitro* (Kaur, 2015). No meio de cultura, a sacarose é comumente fornecida como uma fonte de carboidratos em uma infinidade de culturas de tecidos vegetais para estimular o crescimento *in vitro* das plantas (Lembrechts et al., 2017). Em geral 3% de sacarose é adicionado ao meio, como fonte de energia para sustentar o metabolismo heterotrófico e fotomixotrófico (Gago et al., 2014). Embora, os efeitos positivos do fornecimento de sacarose no meio vêm sendo explorados há muitos anos, atualmente vários estudos vem relatando os efeitos negativos e buscando alternativas para fornecer o desenvolvimento necessário ao material sem ou com menos sacarose no meio. A eliminação da sacarose fornece um fator importante para a transição do modo fotomixotrófico/heterotrófico para um modo fotoautotrófico de nutrição com redução drástica contaminação da cultura e perdas de plantas, que favorece a aclimatação as condições *ex vitro*.

O uso de culturas fotoautotóficas em grandes recipientes *in vitro* auxilia no aumento do rendimento final. No entanto, trabalhos sobre nutrição fotoautotrófica em biorreatores são limitados e sua aplicação prática fora de escala laboratorial ainda não está bem estudada (Kaur, 2015).

Devido a importância do desenvolvimento de tecnologias e manejo das condições de cultivo sobre o desenvolvimento das culturas, os objetivos deste estudo foram avaliar diferentes concentrações de sacarose, uso de esterilização química de meio de cultura e o uso de biorreatores, na multiplicação de gemas axilares de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e de um clone de *Eucalyptus benthamii*.

2. Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizado no município de Viçosa/MG.

2.1. Biorreator

Utilizou-se o biorreator de imersão temporária Plantform® (Plantform, Lomma, Suécia) de policarbonato com dimensões de 180x150x150 mm (Figura 1). Neste biorreator, o meio líquido foi colocado em um recipiente inferior e o material vegetal em um recipiente sobre o meio. O biorreator foi ligado a um compressor que bombeou o ar para a câmara contendo meio líquido, elevando o nível do meio e imergindo temporariamente o material vegetal. Como suporte para separação dos explantes dos clones utilizados no biorreator se utilizou uma separação feita de plástico de polietileno.

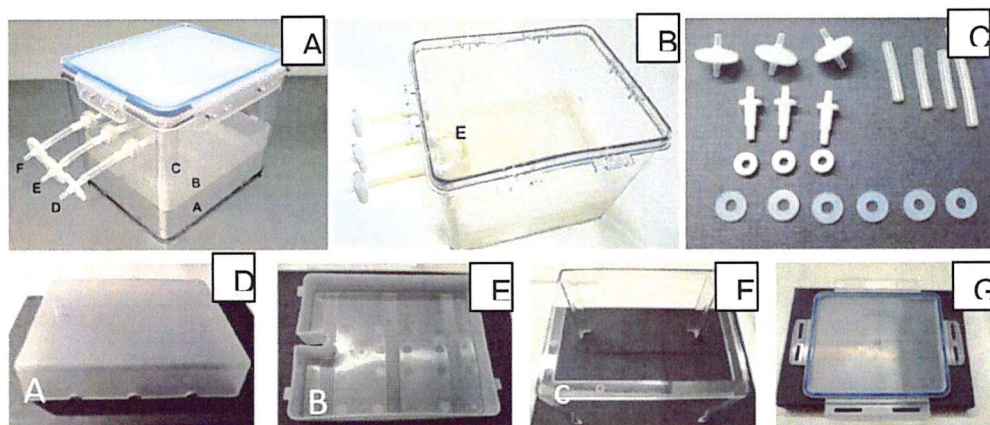


Figura 1. Biorreator e suas diferentes partes numeradas de A-G. A: Recipiente exterior com 3 entradas/saídas para troca de gás; B: Filtro do meio conectado a um tubo plástico na câmara interna, filtros; C: tubos de plástico, porcas, grampos e anéis de silicone para ser conectado às 3 entradas/saídas no recipiente externo; D: Câmara interna com 3 ranhuras no lado e ligação ao filtro do meio; E: Cesta com 3 filas de pequenos furos; F: Quadro com 4 pernas; G: Tampa com 4 abas. (Fonte: http://www.plantform.se/db/technical_improvement.pdf)

2.2. Material vegetal e condições de cultivo *in vitro*

Os explantes do clone de *Eucalyptus urophylla* (C1) e do clone de *Eucalyptus benthamii* (C2) utilizados no presente trabalho foram obtidos a partir do banco clonal *in vitro*, estabelecidos via micropropagação no Laboratório de Cultura de Tecidos II do BIOAGRO na UFV. Para multiplicação do material, tufos contendo de seis a oito gemas diferenciadas foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL meio de cultura JADS (Correia et al., 1995), adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP-30 (polivinilpirrolidona), 0,5 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido α -naftalenoacético) e 6 g L⁻¹ de ágar. O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,8 e esterilizado em autoclave sob pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C, por 20 min. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento a 25 \pm 2 °C, em fotoperíodo de 16 h e irradiância de 33 μ mol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro - LI-COR®, LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram®, Brasil).

Para estabelecimento nos biorreatores, o material vegetal utilizado foi pré-estabelecido *in vitro* em meio de cultura semissemi-sólido, cultivado em placas de Petri estéreis e descartáveis (90 mm (D) x 15 mm (H)). Cada placa continha 25 mL do meio de cultura utilizado na multiplicação e as condições de cultivo foram as mesmas.

2.3. Obtenção e quantificação do ozônio (O₃)

O ozônio (O₃) foi obtido por meio de um gerador de (O₃) , modelo O&L3 ORM (Ozone & Life, São José dos Campos, Brasil), utilizando como insumo gás oxigênio isento de umidade. O oxigênio foi concentrado a partir do ar atmosférico através do concentrador de oxigênio OxxiSul, Mark 5 Plus (Ozonebras, Curitiba, Brasil). As diferentes concentrações de ozônio foram produzidas de acordo com a posição do dosador do equipamento. A concentração do ozônio foi determinada pelo método iodométrico por titulação indireta (Birdsall et al., 1952). Resumidamente, este método consiste no borbulhamento do gás O₃ em 50 mL de solução de iodeto de potássio (KI) por 30 seg. Desta reação, ou seja, da oxidação do KI pelo O₃, ocorre a liberação de iodo (I₂). Posteriormente, adicionou-se 2,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1 mol L⁻¹ na solução para evitar a decomposição do iodo

em iodato. Procedeu-se a titulação com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até que a coloração castanha do iodo se tornasse quase transparente. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução indicadora de amido a 1% (m/v) e continuou a titulação com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até o completo desaparecimento da coloração azul.

2.4. Arranjo experimental

Para esterilização dos biorreatores secas e vazios estes foram submetidos ao tratamento com ozônio a partir da injeção do gás com concentração de 50 mg L^{-1} e fluxo de $0,5 \text{ L min}^{-1}$ pela entrada do biorreator (Figura 1-A) durante uma hora. O gás residual do biorreator foi direcionado, a partir de uma das saídas do biorreator para um catalisador de ozônio. O ozonizador foi conectado a entrada E, na qual o ozônio era injetado; a conexão D foi destinada para a saída do ozônio do sistema. A entrada F foi isolada para não haver perda no sistema.

Experimento 1:

Após o tratamento dos biorreatores com O_3 , estes foram levados à câmara de fluxo laminar. Foram adicionados 500 mL do meio de cultura JADS (Correia et al., 1995), semelhante ao item 2.3, em ambiente asséptico. Os biorreatores foram completamente fechados, incluindo as 3 entradas/saídas para trocas de gás (D, E e F-Figura 1A).

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso em esquema fatorial completo 2^2 , sendo constituídos pelo tempo de tratamento com O_3 e pela concentração de hipoclorito de sódio (NaClO), ambas analisadas nos níveis superior e inferior (Tabela 1). O tratamento com ozônio, considerando testes preliminares, foi realizado com concentração de 50 mg L^{-1} e fluxo de $0,5 \text{ L min}^{-1}$.

Tabela 1. Variáveis independentes do delineamento experimental em esquema fatorial 2^2 .

Variável	Níveis	
	-1	+1
NaClO ($\mu\text{L L}^{-1}$)	0	600
Tempo de O_3 (min)*	30	90

* concentração de 50 mg L^{-1} e fluxo de $0,5 \text{ L min}^{-1}$.

Foram utilizados três biorreatores por tratamento, sendo cada biorreator constituído por 10 explantes de cada clone (C1 e C2), totalizando 20 explantes por biorreator. Cada biorreator foi considerado como uma unidade experimental, caracterizando o planejamento realizado em triplicata. O planejamento fatorial (Tabela 2) e os resultados obtidos foram avaliados com auxílio do *software* Statistica 12.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA) e MiniTab[®] 17. Para escolha das condições com melhor poder sanitizante, foi considerado o resultado de contaminação a partir de avaliação feita após 21 dias do tratamento.

Tabela 2. Delineamento experimental em esquema fatorial completo 2² com valores codificados e originais das variáveis em estudo (tempo de exposição ao O₃ e concentração de NaClO).

Repetição	Valores codificados		Valores originais			
	Tempo (min)*	de O ₃	de NaClO (µL L ⁻¹)	Tempo (min)*	de O ₃	de NaClO (µL L ⁻¹)
1	-1		-1	30,0		0,0
1	+1		-1	90,0		0,0
1	-1		+1	30,0		600,0
1	+1		+1	90,0		600,0
2	-1		-1	30,0		0,0
2	+1		-1	90,0		0,0
2	-1		+1	30,0		600,0
2	+1		+1	90,0		600,0
3	-1		-1	30,0		0,0
3	+1		-1	90,0		0,0
3	-1		+1	30,0		600,0
3	+1		+1	90,0		600,0

* concentração de 50 mg L⁻¹ e fluxo de 0,5 L min⁻¹.

Experimento 2:

Após a determinação do tempo de tratamento com ozônio e da concentração de hipoclorito necessários, foi realizado procedimento semelhante ao experimento 1 para esterilização dos biorreatores, meio de cultura e introdução dos explantes. Para esterilização do meio de cultura utilizou-se o resultado do experimento 1, com tratamento do meio de cultura com O₃ a 50 mg L⁻¹ e fluxo de 0,5 L min⁻¹ por 90 min sem adição de hipoclorito. Nessa fase foram testadas duas concentrações de sacarose 0 e 30 gL⁻¹.

Foram utilizados cinco biorreatores por tratamento, sendo cada biorreator constituído por 10 explantes de cada clone (C1 e C2), totalizando 20 explantes por biorreator.

2.5. Avaliações experimentais

Após o tratamento dos biorreatores com O_3 , estes foram levados à câmara de fluxo laminar para adicionar o meio de cultura e os explantes, em ambiente asséptico. Após os tratamentos foram realizados, conforme descrito anteriormente (item 2.5).

Como testemunha, nos dois experimentos, utilizou-se o sistema tradicional de autoclavagem tanto para os biorreatores quanto para o meio. A concentração de sacarose utilizada foi 30 g L^{-1} , por ser considerada a mais utilizada para *Eucalyptus* spp. e cultura de tecidos.

Os explantes estabelecidos nas placas de Petri, como descrito no ítem 2.3 foram transferidos com auxílio de uma pinça evitando contato com as superfícies do biorreator. Placas que apresentavam algum tipo de contaminação foram descartadas.

No experimento 1, para avaliar a contaminação dos biorreatores após o tratamento com O_3 , foi realizada quantificação do número de biorreatores contaminados a cada 7 dias durante 21 dias. As contaminações foram determinadas por avaliações visuais da presença de fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante.

No experimento 2 foram avaliados aos 21 dias o vigor médio, média de brotações por explante e a média de brotações alongadas ($>1,5 \text{ cm}$) nos biorreatores sem contaminação.

3. Resultados

3.1. Experimento 1

A avaliação da contaminação aconteceu com caracterização de 100% para os biorreatores que apresentaram contaminação e 0% para os biorreatores livres de contaminação (Figura 2).

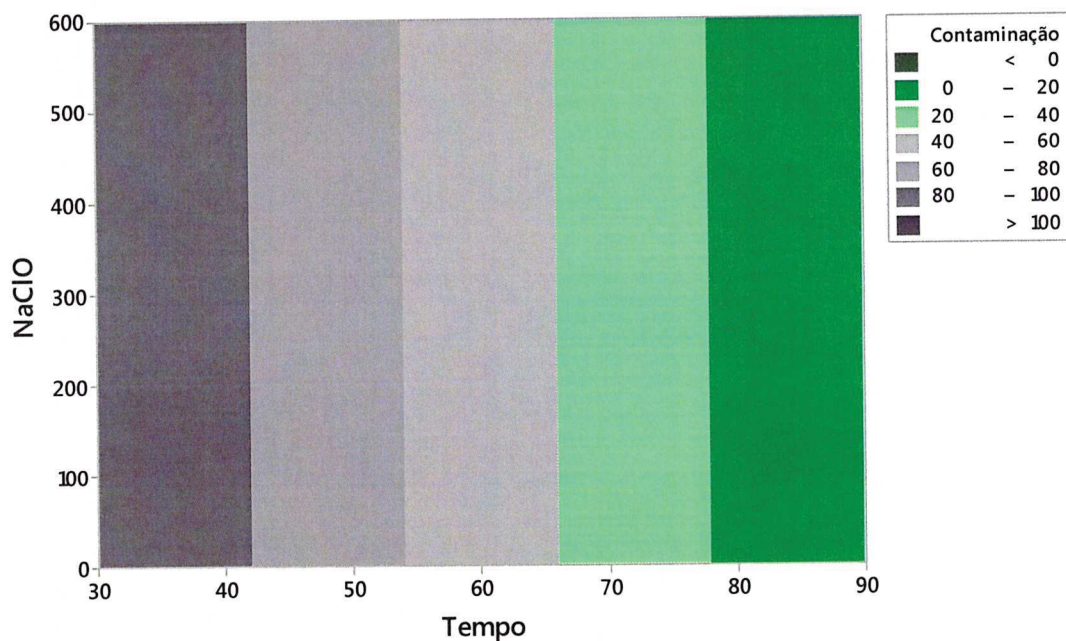


Figura 2. Gráficos de contorno dos efeitos das variáveis independentes tempo de exposição e concentração de NaClO sobre a contaminação do meio para o gás ozônio com umidade de 75% (a) e 0% de umidade (b).

Em comparação com os demais tratamentos, o tratamento controle, com uso de autoclavagem do meio e biorreator, houve contaminação na primeira avaliação, após 7 dias do tratamento. Após 21 dias, apenas os biorreatores com e sem NaClO tratados por 90 min com ozônio em concentração de 50 mg L^{-1} e fluxo de $0,5 \text{ L min}^{-1}$ estavam livres de contaminação. A adição de hipoclorito não apresentou efeito significativo na redução da contaminação dos biorreatores.

3.2. Experimento 2

Após o estabelecimento das condições ótimas para descontaminação do meio de cultura com exposição ao ozônio por 90 min, com concentração de 50 mg L^{-1} e fluxo de $0,5 \text{ L min}^{-1}$, avaliou-se as respostas qualitativas de vigor médio, brotações médias por explante e média das brotações alongadas ($> 1,5 \text{ cm}$). As respostas das avaliações realizadas em 4 repetições foram submetidas à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

Entre os tratamentos com sacarose em 30 g L^{-1} e sem sacarose, houve diferença significativa no vigor médio e média de brotações por explantes. Para os

tratamentos com sacarose, essas variáveis apresentam maiores valores. Quando comparados os explantes para o mesmo tratamento, houve diferença significativa apenas para a média de brotações dos diferentes clones. O clone C2 apresentou maior número médio de brotações por explante (Tabela 3).

Tabela 4. Avaliação qualitativa dos explantes submetidos ao meio com diferentes concentrações de sacarose

	Sacarose (g L ⁻¹)			
	0		30	
	C1	C2	C1	C2
Vigor médio	2,75 ± 0,19 Aa	2,77 ± 0,15 Aa	3,00 ± 0,00 Ba	3,00 ± 0,00 Ba
Média de brotações por explante	2,40 ± 0,57 Aa	2,40 ± 0,41 Aa	3,5 ± 0,68 Ba	8,07 ± 0,49 Bb
Média das brotações alongadas (>1,5cm)	0,00 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Aa	0,02 ± 0,05 Aa	0,12 ± 0,15 Aa
Oxidação do meio	Ausente	Ausente	Presente	Presente

Média ± desvio padrão.

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância (entre tratamentos concentrações de sacarose diferentes). Médias seguidas da mesma letra minúscula na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de significância (entre clones C1 e C2).

4. Discussão

Ozônio como alternativa para esterilização de biorreatores de imersão temporal, além da sua eficiência para desinfecção das superfícies dos biorreatores, o ozônio teve seu potencial para desinfecção do meio de cultura líquido avaliada. Dessa forma, o O₃ passa a ser avaliado como um agente completo de desinfecção de todo o processo de micropropagação *in vitro* de explantes de clones de clones de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus benthamii*.

O tratamento do meio de cultura com O₃ foi eficiente para impedir a contaminação do meio com microorganismos em 90 min a 50 mg L⁻¹ em fluxo de 0,5 L min⁻¹. O efeito esterilizante do ozônio no meio de cultura foi observado por Ivanov et al. (2014), utilizando os tempo de 5, 10 e 15 min a concentração de 5% de CO₂ em placas com meio de cultura, nenhum dos tempos testados apresentou contaminação

microbiana. Cardarelli et al. (2015) utilizaramu tratamentos de injeção de ozônio em biorreatores de imersão temporal durante 4 semanas, testando 1, 5 e 15 minutos por dia, o ozônio eliminou em todos os tratamentos a contaminação microbiana. Outras pesquisas recentes indicam grande potencial de uso do O₃ na micropropagação de material vegetal (Cardarelli et al., 2014; Jova e Gonzalez, 2014; Stanisavljević et al., 2017).

A adição de hipoclorito ao meio de cultura, de forma a potencializar o efeito sanitizante, não foi significativa. Assim, a adição de hipoclorito ao meio não é indicada com fins de melhorar a sanitização do meio. De acordo com Brondani et al. (2011), dentre os produtos químicos utilizados na esterilização na micropropagação como alternativa a autoclavagem, a substancia mais promissória é o hipoclorito de sódio (NaClO). Sua utilização é citada por vários autores (Brondani et al. 2011; Malysz et al. 2011; Borges et al., 2012); Brondani et al., 2013; Pais et al., 2016) e tem a vantagem da baixa toxicidade quando comparado com outras substancias químicas com efeito similar como o mercúrio (HgCl₂), fungicida e antibióticos (Dutra et al., 2009; Tiwari et al. 2012).

O uso de sacarose ao meio teve o efeito no vigor do material vegetal, no número de brotações e a na média de brotações alongadas. Diversos trabalhos relatam o uso de 30 gL⁻¹ de sacarose no processo de micropropagação, sendo responsável pelas maiores taxas de multiplicação ou alongamento de *Eucalyptus* spp. (Brondani et al., 2009; Borges et al., 2012; Navrosky et al., 2015). Estes dados concordam com Khan et al. (2002), aonde as maiores médias de multiplicação e comprimento de brotos na micropropagação de *Eucalyptus tereticornis* ocorreram em sistema fotomixotrófico com 30 gL⁻¹ de sacarose quando comparado a ambiente fotoautotofico sem uso de sacarose. Entretanto, a redução de sacarose em biorreatores de 30 para 15 gL⁻¹ foi considerada como tratamento primordial para adaptabilidade ao ambiente *ex vitro* em híbridos de *Populus* (Arencibia et al., 2017). Gallo (2014) para as características avaliadas, em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, os maiores valores foram observados com o uso de 15 g L⁻¹ de sacarose, concentração que apresenta redução desse açúcar no meio, visto o emprego usual de sacarose na micropropagação de *Eucalyptus* é de 30 g L⁻¹. Apesar dos efeitos positivos nas características de produção, com a adição de sacarose observou-se a oxidação do meio. Efeito negativo da sacarose na oxidação do meio, onde o

suprimento de sacarose aumentou a oxidação foi observado por Gallo (2014) em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

Os resultados do presente estudo evidenciaram que os clones apresentaram relação diferencial ao uso ou não de sacarose. Em geral 30 g L⁻¹ foi superior em número de brotações e tamanho da maior brotação. Esse resultado reflete a variação de resposta de diferentes genótipos à multiplicações *in vitro* também observada em outros estudos. Sotelo e Monza (2007) definiram um protocolo de micropropagação de clones adultos de *Eucalyptus globulus sub. maidenii*, por meio de gemas epicórmicas, observando que apenas 5 clones de um total de 58 avaliados apresentaram resposta à multiplicação *in vitro*, evidenciando que o genótipo tem efeito direto nesta variação. Estas diferenças entre clones foram evidenciadas por Oliveira et al. (2011), trabalhando com *Eucalyptus urophylla* em biorreatores, o C1 foi superior ao C2 na produção de novos brotos durante o período de cultivo, com média de 11 brotos por explante, em comparação com a 5,3 do C2.

Em biorreatores tem sido trabalhado o cultivo fotoautotrófico ou fotomixotrófico (Arencibia et al., 2013; Arencibia et al., 2017; Regueira et al., 2018). Porém, ainda se torna necessário maiores estudos, objetivando o desenvolvimento de protocolos eficientes para obter aumento na produtividade na multiplicação, redução nos custos, melhores taxas de alongamento e aclimatação tornando o processo competitivo com os métodos tradicionais de produção (Businge et al., 2017; Máximo et al., 2018). Além disso, necessita-se aliar a redução de sacarose com técnicas de redução de contaminação, suprimento de luz e CO₂ que possibilitem o desenvolvimento do fotoautotrofismo.

Os resultados do presente trabalho demonstram que o sistema de esterilização com O₃ é um importante aliado à cultura de tecidos, podendo tornar-se uma forma alternativa na produção de materiais micropropagados com menor custo e maior eficiência. O desenvolvimento de novas metodologias para produção *in vitro* aliadas a técnicas *ex vitro* de aclimatação desse material, principalmente em condições fotoautotróficas, abre novas perspectivas para a clonagem de materiais elite florestais, tornando a técnica cada vez mais viável economicamente.

5. Conclusões

Como indicação de protocolo para utilização do ozônio em completa substituição à autoclavagem na micropropagação *in vitro* de explantes de clones de clones de *Eucalyptus urophylla* e *E. benthamii*, tem-se a utilização do gás para sanitização das superfícies do biorreator vazio após sua lavagem e secagem; ozonização do meio de cultura líquido por 90 min com concentração de 50 mg L⁻¹ e fluxo de 0,5 L min⁻¹ e adição de sacarose ao meio de cultura em concentração de 30 gL⁻¹, tornando desnecessária a utilização de autoclave para sanitização dos biorreatores ou autoclavagem do meio de cultura.

6. Bibliografia

- AKDEMIR, H.; SÜZERER, V.; ONAY, A.; TILKAT, E.; ERSALI, Y.; ÇİFTÇİ, Y. O. Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 1, p. 65–76, 2014
- BORGES, S. R.; XAVIER, A.; DE OLIVEIRA, L. S.; LOPES, A. P.; OTONI, W. C.; TAKAHASHI, E. K.; DE MELO, L. A. *In vitro* establishment of *Eucalyptus globulus* hybrid clones. **Ciencia Florestal**, v.22, n.3, p.605-616, 2012
- BRONDANI, G. E.; DE OLIVEIRA, L. S.; BERGONCI, T.; BRONDANI, A. E.; FRANÇA, F. A. M.; DA SILVA, A. L. L.; GONÇALVES, A. N. Chemical sterilization of culture medium: A low cost alternative to *in vitro* establishment of plants. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 41, n. 98, p. 257–264, 2013
- BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* x *E dunnii*. **Revista Árvore**, v.33, n.1, p.11-19, 2009
- BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; HANSEL, F. A.; ARAUJO, M. A. Micropropagação de um híbrido de *Eucalyptus* (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 33, n. 4, p. 655–663, 2011
- BUSINGE, E.; TRIFONOVA, A.; SCHNEIDER, C.; RÖDEL, P.; EGERTSDOTTER, U. Evaluation of a new temporary immersion bioreactor system for micropropagation of cultivars of *Eucalyptus*, birch and fir. **Forests**, v. 8, n. 6, 2017
- CABRERA JOVA, M.; GONZÁLEZ, J. E. Ozone as an alternative for disinfection of explants during *in vitro* mass plant propagation. **Ozone: Science and Engineering**, v.36, n.5, p.435-439, 2014
- CORREIA, A. C. G. **Micropropagação em biorreatores de imersão temporária e enraizamento de miniestacas e microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus***. 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011

- DA SILVA, A. L. L.; GOLLO, A. L.; BRONDANI, G. E.; HORBACH, M. A.; DE OLIVEIRA, L. S.; MACHADO, M. P.; DE LIMA, K. K. D.; DA LUZ COSTA, J. Micropropagation of *Eucalyptus saligna* sm. from cotyledonary nodes. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 1, p. 311–318, 2015
- DEWIR, Y. H.; CHAKRABARTY, D.; ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Effects of hydroponic solution EC, substrates, PPF and nutrient scheduling on growth and photosynthetic competence during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* plantlets. **Plant Growth Regulation**, v.46, n.3, p.241-251, 2005
- DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A Micropropagação de Eucalipto. *Pesquisa Florestal Brasileira*, v. 58, p. 49-59, 2009
- GAGO, J.; MARTÍNEZ-NUÑEZ, L.; LANDÍN, M.; FLEXAS, J.; GALLEGO, P. P. Modeling the effects of light and sucrose on *in vitro* propagated plants: A multiscale system analysis using artificial intelligence technology. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p.1-11, 2014
- GALLO, R. Produção de microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus* spp. pela micropropagação. 2014. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- GATTI, E.; SGARBI, E.; OZUDOGRU, E. A.; LAMBARDI, M. The effect of Plantform TM bioreactor on micropropagation of *Quercus robur* in comparison to a conventional *in vitro* culture system on gelled medium, and assessment of the microenvironment influence on leaf structure. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 151, n. 6, p. 1129–1136, 2 nov. 2017
- IVANOV, V.; SIVREV, D.; VULKOVA, I.; HAMZA, S.; DIMITROV, R.; POPOV, B. Application of ozone against the microflora in cell cultures growth medium. **Trakia Journal of Sciences**, v. 12, n. 1, p. 16–19, 2014
- JOVA, M. C.; KOSKY, R. G.; CUELLAR, E. E. Effect of liquid media culture systems on yam plant growth (*Dioscorea alata* L. ‘Pacala Duclos’). **Biotechnology, agronomy, society and environment**, v. 15, n. 4, p. 515–521, 2011
- KAUR, A.; SANDHU, J. S. High throughput *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from spindle leaf roll segments: Cost analysis for agribusiness industry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 1, p. 339–350, 2015
- LEMBRECHTS, R.; CEUSTERS, N.; DE PROFT, M. P.; CEUSTERS, J. Sugar and starch dynamics in the medium-root-leaf system indicate possibilities to optimize plant tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v.224, n.20, p.226-231, 2017
- MALYSZ, M.; CADORE, D.; TIBOLA, E.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J. M. Desinfestação e micropropagação de *Eucalyptus dunnii* maiden. **Perspectiva**, v. 35, n. 131, p. 69–77, 2011
- MARIATERESA, C.; MARIA, C. S. C.; GIUSEPPE, C. Influence of ozone treatments on *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* in continuous immersion bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 194–201, 2014

- MÁXIMO, W. P. F. Propagação de um híbrido comercial de *Eucalyptus urograndis* em biorreator de imersão temporária (BIT®). 2014.83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- MÁXIMO, W. P. F.; SANTOS, P. A. A.; MARTINS, G. S.; MENDONÇA, E. G.; PAIVA, L. V. *In vitro* multiplication of *Eucalyptus* hybrid via temporary immersion bioreactor: culture media and cytokinin effects. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 131-138, 2018
- MIHALJEVIC, I.; DUGALIC, K.; TOMAS, V.; VILJEVAC, M.; PRANJIC, A.; CMELIK, Z.; PUSKAR, B.; JURKOVIC, Z. *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of ‘oblacinska’ sour cherry. **Journal of Agricultural Sciences, Belgrade**, v. 58, n. 2, p. 117–126, 2013
- NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S.; PEREIRA, M. O. Alongamento *in vitro* de rebentos de *Eucalyptus dunnii* em função de diferentes genótipos e concentrações de ácido 1-naftil-acético (ANA). **Revista de Ciências Agrárias**, 2015
- NDAKIDEMI, C. F.; MNENEY, E.; NDAKIDEMI, P. A. Development of Sanitation Protocol for Leaf Explants of *B. huillensis* for *in vitro* Culture. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2013, n. December, p. 2425–2430, 2013
- OLIVEIRA, M. L.; XAVIER, A.; PENCHEL, R. M.; DOS REIS, J. P. Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Ciencia Florestal**, v. 24, n. 1, p. 37–45, 2014
- OLIVEIRA, M. L.; XAVIER, A.; PENCHEL, R. M.; SANTOS, A. F. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissemi-sólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis**, v. 39, p. 309–315, 2011
- OLIVEIRA, M. L. de. **Micropropagação de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreatores de imersão temporária**. 2009. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- OLIVEIRA, M. L. de; 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**, v. 35, n. 6, p. 1207–1217, 2011
- PAIS, A. K.; SOUZA, A. P. da S.; CARDOSO, JOSELITA DETEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; PEIXOTO, A. R.; PAZ, C. D. da. Sodium hypochlorite sterilization of culture medium in micropropagation of *Gerbera hybrida* cv. Essandre. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 36, p. 1995–1998, 2016
- POLZIN, F.; SYLVESTRE, I.; DÉCHAMP, E.; ILBERT, P.; ETIENNE, H.; ENGELMANN, F. Effect of activated charcoal on multiplication of African yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA®). **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 50, n. 2, p. 210–216, 2014
- RAMLAL, N. **Toward a rooting protocol for *Eucalyptus dunnii***. 2014.107f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – School of Animal, Plant and Environmental Sciences. University of the Witwaterstrand, Johannesburg.

- REGUEIRA, M.; RIAL, E.; BLANCO, B.; BOGO, B.; ALDREY, A.; CORREA, B.; VARAS, E.; SÁNCHEZ, C.; VIDAL, N. Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. **Trees - Structure and Function**, v.32, n.1, p.61-71, 2018
- ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 2, p. 91–120, 2000
- SHA VALLI KHAN, P. S.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, n. 2, p. 141–146, 2002
- SOTELO, M.; MONZA, J. Micropropagation of *Eucalyptus maidenii* elite trees. **Agrociencia**, v. 9, n. 1, p. 81–89, 2007
- TANISAVLJEVIĆ, A.; BOŠNJAK, D.; ŠTOLFA, I.; VUKOVIĆ, R.; KUJUNDŽIĆ, T. DRENJANČEVIĆ, M. Sterilization of different explant types in micropropagation of cab-6p and gisela 6 cherry rootstock. **Agriculture**, v. 23, n. 2, p. 31–37, 2017
- TIWARI, A. K.; TRIPATHI, S.; LAL, M.; MISHRA, S. Screening of Some Chemical Disinfectants for Media Sterilization During *In vitro* Micropropagation of Sugarcane. **Sugar Tech**, v. 14, n. 4, p. 364–369, 2012
- VARGAS, D. P.; FORMOSO, R. S.; DUTRA, L. F.; MEYER, N. A.; DOS SANTOS, J.; UENO, B. Esterilização química para o cultivo *in vitro* de porta-enxerto de pessegueiro. **Colloquium Agrariae**, v. 12, n. 1, p. 01–06, 2016
- VIVES, K.; ANDÚJAR, I.; LORENZO, J. C.; CONCEPCIÓN, O.; HERNÁNDEZ, M.; ESCALONA, M. Comparison of different *in vitro* micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT®). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 131, n. 1, p. 195–199, 2017
- WATT, P. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. **African Journal Of Biotechnology**, v. 11, n. 76, p 14025-14035, 2012

3. CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos objetivos propostos e nas condições em que foram realizados os experimentos do presente estudo, buscando avaliar o potencial de sistemas fotoautotrófico, a seleção de materiais com maior competência a micropropagação e o uso da esterilização com ozônio na produção de *Eucalyptus* spp. em biorreatores, foi possível concluir:

- 1) A propagação *in vitro* de clones de *Eucalyptus* para obtenção de brotações pode ser realizada em o uso de meio líquido com maiores incrementos de massa fresca, taxa de multiplicação e tamanho da maior brotação que os observados em meio semi-sólido.
- 2) O uso de tampas rígidas, sem trocas gasosas, nos frascos para cultivo *in vitro* pela micropropagação de clones de *Eucalyptus* spp., nas fases de multiplicação e alongamento, favorece as taxas de multiplicação, sendo o ambiente mais favorável para a propagação *in vitro* dos genótipos avaliados. As características de crescimento também são influenciadas pelo genótipo. O controle genético para as características avaliadas e a interação genótipo x ambiente, em ambientes com e sem trocas gasosas, permite a seleção e classificação de clones de *Eucalyptus* spp. mais aptos as fases de multiplicação e alongamento *in vitro*.
- 3) A redução do uso de sacarose no meio de cultivo e de sistemas que permitam aumento da produção em multiplicação e alongamento do material *in vitro* pela micropropagação, como diferentes qualidades e quantidades de luz, são fatores fundamentais a serem considerados nos estudos para implementação de protocolos de cultivo fotoautotrófico. O uso de sacarose adicionado no meio de cultivo *in vitro*, em geral estimulou a produção de clones de *Eucalyptus benthamii* e de *Eucalyptus dunnii* nas fases de multiplicação e alongamento.
- 4) A multiplicação e o alongamento dos genótipos de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii* pode ser promovido com o uso de lâmpadas fluorescentes,

LED branca e LED vermelho/azul durante seu cultivo *in vitro*, na fase de multiplicação e alongamento, com ou sem uso de sacarose. No geral, todas as qualidades e intensidades de luz testadas proporcionam bom desenvolvimento dos clones de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii* cultivados *in vitro*. O uso de LED branca e 30 g L⁻¹ de sacarose promove valores de clorofila total e de carotenoides mais próximos aos encontrados *ex vitro*.

- 5) O sistema de esterelização de biorreatores com utilização do ozônio (O₃) pode ser utilizada em completa substituição à autoclavagem, utilizando primeiro a ozonização do biorreator vazios com a exposição a 50 mg L⁻¹ de O₃ por 15 min em fluxo constante de 0,5 L min⁻¹ e posterior a ozonização do meio de cultura líquido por 90 min com concentração de 50 mg L⁻¹ e fluxo de 0,5 L min⁻¹. No entanto, novos estudos devem ser conduzidos buscando otimizar os resultados de multiplicação, alongamento, aclimatação *ex vitro*, assim como buscar protocolos e tecnologias que aliadas ao O₃ viabilize econômica e operacionalmente em larga escala os microjardins clonais.