

Desinfestação e introdução in vitro de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*

Ecléia Alexandra Poltronieri Buda Salles¹, Giovana Bomfim de Alcantara^{1*}, Marguerite Germaine Ghislaine Quoirin¹, Antonio Natal Gonçalves², Antonio Rioyei Higa¹

¹Universidade Federal do Paraná, Av. Pref. Lothário Meissner, 3400, CEP 80210-170, Curitiba, PR, Brasil

²Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Av. Pádua Dias, 11, CP. 9, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil

*Autor correspondente:
giobomfim@ufpr.br

Termos para indexação:

Acacia negra
Clones
Estaquia

Index terms:

Black wattle
Clones
Cutting

Resumo - A dificuldade em produzir clones de *Acacia mearnsii* por estaquia, em função das baixas taxas de enraizamento, constitui um empecilho para o uso desta técnica. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de um protocolo de desinfestação para introdução in vitro de segmentos nodais de clones selecionados de *A. mearnsii*, visando aprimorar o melhoramento genético da espécie para plantios florestais. A desinfestação de propágulos, provenientes de jardim clonal, foi realizada combinando diferentes produtos e concentrações (álcool etílico 70%, hipoclorito de sódio, *plant preservative mixture* e cloreto de mercúrio), tempo de imersão e tamanho dos segmentos nodais (4 mm e 10 mm). Segmentos nodais de 10 mm responderam melhor ao tratamento de desinfestação, com 80% de sobrevivência, combinando álcool etílico 70%, cloreto de mercúrio a 0,4% e hipoclorito de sódio a 2%.

Histórico do artigo:

Recebido em 21/12/2016
Aprovado em 29/11/2017
Publicado em 29/12/2017

Disinfection and in vitro establishment of *Acacia mearnsii* nodal segments

Abstract - Due to low rates of rooting it is difficult to propagate selected clones of *Acacia mearnsii* by cuttings. The purpose of this study was to define a protocol for disinfection of nodal segments for in vitro introduction, aiming to improve the species genetically for forest plantation. Combination of different products concentration (70% ethyl alcohol, sodium hypochlorite, plant preservative mixture and mercuric chloride), immersion period and size of nodal segment were tested. The best disinfection treatment was the combination of 70% ethanol, 0.4% mercuric chloride, sodium hypochlorite at 2% in nodal segments of 10 mm, with 80% survival.

doi: 10.4336/2017.pfb.37.92.1392

Introdução

Acacia mearnsii de Wild., Fabaceae, conhecida como acácia negra, é natural da Austrália. No Brasil, o gênero *Acacia* ocupa uma área de 148.311 ha (Anuário..., 2013), sendo a maioria de povoamentos de acácia negra. A madeira é utilizada para energia, carvão, cavaco para celulose e painéis. Da casca é retirado tanino, utilizado em diversos setores industriais (Anuário..., 2013).

Mediante o melhoramento genético desta espécie, deseje-se produzir clones dos materiais genéticos superiores, mas existe dificuldade no enraizamento das estacas para alguns indivíduos selecionados.

O rejuvenescimento apresenta-se como uma alternativa para que o material se torne responsivo na fase de enraizamento. Na silvicultura clonal de *Eucalyptus*, a micropropagação pela proliferação de gemas axilares tem sido utilizada com êxito no rejuvenescimento de

clones selecionados, visando à melhoria do processo de propagação de mudas por microestquia (Dutra et al., 2009; Xavier & Otoni, 2009).

Entre os principais inconvenientes encontrados na produção de mudas de espécies florestais pela micropropagação, aparece a contaminação do material por microrganismos, principalmente bactérias endógenas, representando sérias limitações para obtenção de um número suficiente de culturas assépticas que permitam dar prosseguimento ao cultivo *in vitro* (Xavier & Otoni, 2009). Isso ocorre em função da frequente presença de microrganismos associados aos explantes e da relativa ineficiência dos procedimentos de desinfestação superficial que costumam ser empregados (Golle et al., 2013).

Várias são as substâncias que podem ser empregadas nos procedimentos de desinfestação do material vegetal, dentre as quais destacam-se o etanol, o hipoclorito de sódio (Oliveira et al., 2013) e de cálcio, cloreto de mercúrio, cloreto de benzalcônio, peróxido de hidrogênio (Grattapaglia & Machado, 1998), ácido clorídrico e *plant preservative mixture* (Davey & Antony, 2010). Contudo, se faz necessário uma metodologia eficiente para o uso dos produtos químicos durante a desinfestação, determinando tempo e concentração adequada para maior eficácia no controle das contaminações, com menores danos aos explantes, garantindo assim o sucesso no estabelecimento *in vitro*. Diante destas evidências, torna-se necessário aprofundar os estudos da desinfestação e introdução *in vitro* de segmentos nodais de acácia negra, visando obter uma cultura asséptica e material responsivo para multiplicação dos clones selecionados. Neste sentido, os objetivos do presente trabalho foram verificar o efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO), cloreto de mercúrio (HgCl₂) e de *plant preservative mixture* em diferentes tempos de imersão e o tamanho de segmentos nodais (4 mm e 10 mm) na desinfestação de acácia negra.

Material e métodos

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Genética e Melhoramento Florestal (LAMEF) da Universidade Federal do Paraná.

Os testes de desinfestação foram realizados com material vegetal proveniente de jardim clonal, mantido em estufa, constituído por 11 clones diferentes e cepas formadas por mudas provenientes de sementes, fornecido

pela empresa Tanagro. As cepas foram acondicionadas em vasos de 5 L, com substrato composto por casca de pinus, vermiculita, calcário e NPK. Receberam fertirrigação semanal com solução nutritiva proposta por Bolle-Jones (1954) durante o primeiro ano e depois substituída por solução nutritiva preparada com produtos comerciais (NPK 18-18-18). As cepas foram mantidas podadas e receberam tratamento com fungicida tiofanato metílico (0,2% p/v), antes da coleta das brotações axilares.

Desinfestação e introdução *in vitro* de *Acacia mearnsii*

Para estabelecimento *in vitro* de acácia negra, testaram-se várias soluções desinfestantes como: hipoclorito de sódio (NaClO); cloreto de mercúrio (HgCl₂), álcool etílico e tiofanato metílico, cuja composição está apresentada na tabela 1. Após cada imersão em produto desinfestante, os explantes foram enxaguados em água destilada e autoclavada por três vezes. Todo o procedimento de desinfestação foi realizado dentro de câmara de fluxo laminar, previamente desinfestada com álcool etílico 70% e luz ultravioleta por 20 min.

Os tubos de ensaio utilizados na fase de estabelecimento de culturas assépticas possuíam 15,0 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, com capacidade de 50 mL, contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultura cada e tampados com tampas de polipropileno. Foram testados segmentos nodais com 4 mm ou 10 mm de comprimento.

O meio de cultura utilizado em todas as etapas foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) com todos os sais do meio reduzidos a $\frac{3}{4}$, vitaminas e compostos orgânicos do mesmo meio, 30 g L⁻¹ de sacarose e 7,5 g L⁻¹ de ágar bacteriológico (Himedia®). O pH do meio foi ajustado a $5,8 \pm 2$ com NaOH ou HCl 0,1 N e esterilizado em autoclave a 121 °C e 1,1 Kgf cm⁻² de pressão por 20 min. Os explantes permaneceram na sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e luminosidade de 2.800 lux. As variáveis mensuradas foram: porcentagem de sobrevivência e necrose dos explantes e contaminação por fungos e bactérias. As avaliações foram realizadas aos 15 dias.

As soluções de hipoclorito de sódio foram preparadas diluindo-se, com água destilada (v/v), solução concentrada a 12% de cloro ativo (Cloroquímica®). O cloreto de mercúrio (Labsynth®, 99,5% de pureza) foi pesado (p/v) conforme a concentração desejada, diluído

em água destilada e, após o uso, foi neutralizado com sulfeto de sódio nonahidratado ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$), que reage com o HgCl_2 formando um precipitado. Para cada 100 g de resíduo a 0,5%, usou-se 5 g de sulfeto de sódio.

Tabela 1. Tratamentos de desinfestação de segmentos nodais de *Acacia mearnsii* utilizando tiofanato metílico, NaClO, álcool etílico e HgCl_2 .

Tratamentos	
T.1	Tiofanato metílico 0,2% (15 min) + NaClO 1% (10 min)
T.2	0,2% (15 min.) + NaClO 2% (10 min)
T.3	Álcool etílico 70% (20 s) + 0,2% (15 min) + HgCl_2 0,1% (15 min) + NaClO 1% (15 min.)
T.4	Álcool etílico 70% (15 s) + 0,2% (15 min) + HgCl_2 0,5% (15 min) + NaClO 1% (15 min)
T.5	Álcool etílico 70% (15 s) + 0,2% (15 min) + HgCl_2 0,5% (15 min) + NaClO 2% (15 min)
T.6	Tiofanato metílico 0,2% (15 min) + HgCl_2 0,5% (15 min) + NaClO 2% (15 min)
T.7	Álcool etílico 70% (15 s) + 0,2% (15 min) + NaClO 1,5% (15 min)
T.8	Álcool etílico 70% (15 s) + 0,2% (15 min) + NaClO 3% (15 min)

Em um segundo experimento, foram avaliadas diferentes concentrações de NaClO (2% ou 3%) por 10 min, seguido de HgCl_2 (0,25% ou 0,4%) por 5, 10 ou 15 min, em um esquema trifatorial ($2 \times 2 \times 3$) (Tabela 2). Os explantes foram imersos em álcool etílico 70% por 10 s e em solução de (tiofanato metílico) 0,2% (p/v) por 10 min, para então serem submetidos aos diferentes tratamentos com hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio. Após cada solução desinfestante utilizada, os explantes foram enxaguados por três vezes em água destilada e autoclavada. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), trifatorial $2 \times 2 \times 3$ (12 tratamentos), com quatro repetições e cinco explantes por parcelas.

Foram avaliados segmentos nodais de 4 mm e 10 mm em meio de cultura semi sólido de MS ($7,5 \text{ g L}^{-1}$). As soluções para estes testes foram álcool etílico a 70% por 10 s, HgCl_2 a 0,4% (p/v) por 15 min e NaClO a 2% e 3% (v/v) por 10 min e 15 min para desinfestação de segmentos nodais. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, devido a não uniformidade da temperatura da sala de crescimento, que variou em $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, com 5 blocos e 4 plantas por parcelas (Tabela 3).

Tabela 2. Desinfestação de segmentos nodais de *Acacia mearnsii* utilizando concentrações de NaClO e HgCl_2 e diferentes tempos de imersão de HgCl_2 .

Tratamentos	
T.1	NaClO 2% (10 min) + HgCl_2 0,25% (5 min)
T.2	NaClO 2% (10 min) + HgCl_2 0,25% (10 min)
T.3	NaClO 2% (10 min) + HgCl_2 0,25% (15 min.)
T.4	NaClO 2% (10 min) + HgCl_2 0,4% (5 min)
T.5	NaClO 2% (10 min) + HgCl_2 0,4% (10 min)
T.6	NaClO 2% (10 min) + HgCl_2 0,4% (15 min.)
T.7	NaClO 3% (10 min) + HgCl_2 0,25% (5 min)
T.8	NaClO 3% (10 min) + HgCl_2 0,25% (10 min)
T.9	NaClO 3% (10 min) + HgCl_2 0,25% (15 min.)
T.10	NaClO 3% (10 min) + HgCl_2 0,4% (5 min)
T.11	NaClO 3% (10 min) + HgCl_2 0,4% (10 min)
T.12	NaClO 3% (10 min) + HgCl_2 0,4% (15 min)

Tabela 3. Desinfestação de segmentos nodais de 4 mm e 10 mm de *Acacia mearnsii* utilizando cloreto de mercúrio combinado com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio por 10 min e 15 min.

Tratamentos	
T.1*	Álcool etílico 70% (10 s) + HgCl_2 0,4% (15 min) + NaClO 2% (10 min)
T.2**	Álcool etílico 70% (10 s) + HgCl_2 0,4% (15 min) + NaClO 2% (15 min)
T.3**	Álcool etílico 70% (10 s) + HgCl_2 0,4% (15 min) + NaClO 3% (10 min)
T.4**	Álcool etílico 70% (10 s) + HgCl_2 0,4% (15 min) + NaClO 2% (10 min)
T.5**	Álcool etílico 70% (10 s) + HgCl_2 0,4% (15 min) + NaClO 3% (10 min)

* e ** - Explantes de 4 mm e 10 mm, respectivamente.

Foram realizados experimentos testando 1, 2, 3, 4, 6 e 8 h de imersão em solução de *plant preservative mixture*, acrescentando 1 ou 2 mL L^{-1} , no meio de cultura MS (Tabela 4). O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com oito blocos e 10 explantes por parcela.

As análises estatísticas foram realizadas com dados coletados aos 15 dias de introdução in vitro, das variáveis: porcentagem de fungos, bactérias, necrose e de sobrevivência. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, de homogeneidade (Levene), análise de variância (ANOVA) e, conforme a necessidade, ao teste de médias Bonferroni (para arranjos fatoriais) ou Tukey a 5% de significância, usando programa IBM SPSS Statistic 19® (IBM Corporation, NY, USA).

Tabela 4. Desinfestação de segmentos nodais de *Acacia mearnsii* com adição de *plant preservative mixture*, com diferentes tempos de exposição.

Tratamentos	
T 1	1 mL L ⁻¹ de <i>plant preservative mixture</i> no meio por 1 h.
T 2	1 mL L ⁻¹ de <i>plant preservative mixture</i> no meio por 2 h.
T 3	1 mL L ⁻¹ de <i>plant preservative mixture</i> no meio por 3 h.
T 4	1 mL L ⁻¹ de <i>plant preservative mixture</i> no meio por 4 h.
T 5	1 mL L ⁻¹ de <i>plant preservative mixture</i> no meio por 6 h.
T 6	1 mL L ⁻¹ de <i>plant preservative mixture</i> no meio por 8 h.
T 7	2 mL L ⁻¹ de <i>plant preservative mixture</i> no meio por 4 h.
T 8	2 mL L ⁻¹ de <i>plant preservative mixture</i> no meio por 6 h.
T 9	2 mL L ⁻¹ de <i>plant preservative mixture</i> no meio por 8 h.

Resultados

Em experimentos preliminares, com tratamentos utilizando diferentes agentes desinfestantes (tiofanato metílico, álcool etílico, NaClO e HgCl₂), em diferentes concentrações e tempos, os tratamentos que apresentaram a menor taxa de contaminação por fungos e bactérias foram os que utilizaram cloreto de mercúrio (0,5% p/v). Para *Acacia mearnsii*, tratamento com HgCl₂ a 0,1% não foi eficiente para a desinfestação de segmentos nodais provenientes do minijardim clonal do viveiro, pois em 10 dias havia 77% de contaminação por fungos. A maior porcentagem de sobrevivência (53%) foi verificada com

o uso de tiofanato metílico 0,2%, HgCl₂ 0,5% e NaClO 2% (Tratamento 6) (Tabela 5).

Tabela 5. Resultado da desinfestação de segmentos nodais de *Acacia mearnsii* aos 15 dias de introdução in vitro.

Tratamentos	Fungos (%)	Bactérias (%)	Necrose (%)	Sobrevivência (%)
1	100	75	21	0
2	100	69	36	0
3	77	60	24	0
4	18	18	23	43
5	8	38	20	35
6	31	16	0	53
7	86	31	3	0
8	81	21	3	0

Em que: T1 = Tiofanato metílico (15 min) + NaClO 1% (10 min); T2 = Tiofanato metílico 0,2% (15 min) + NaClO 2% (10 min); T3 = Álcool etílico 70% (20 s) + tiofanato metílico 0,2% (15 min) + HgCl₂ 0,1% (15 min) + NaClO 1% (15 min); T4 = Álcool etílico 70% (15 s) + tiofanato metílico 0,2% (15 min) + HgCl₂ 0,5% (15 min) + NaClO 1% (15 min); T5 = Álcool etílico 70% (15 s) + tiofanato metílico 0,2% (15 min) + HgCl₂ 0,5% (15 min) + NaClO 2% (15 min); T6 = Tiofanato metílico 0,2% (15 min) + HgCl₂ 0,5% (15 min) + NaClO 2% (15 min); T7 = Álcool etílico 70% (15 s) + tiofanato metílico 0,2% (15 min) + NaClO 1,5% (15 min); T8 = Álcool etílico 70% (15 s) + tiofanato metílico 0,2% (15 min) + NaClO 3% (15 min).

No ensaio que se avaliou duas concentrações de cloreto de mercúrio e três tempos de imersão com NaClO a 2% e 3%, não houve diferença significativa entre os tempos. Com NaClO a 3% e HgCl₂ a 0,4% houve a menor formação de fungos (33,3%) e maior porcentagem de sobrevivência, quando comparado aos tratamentos com NaClO (3%) e HgCl₂ a 0,25%, que apresentaram 65% de contaminação por fungos e apenas 5% de sobrevivência (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados da desinfestação de segmentos nodais de *Acacia mearnsii* utilizando concentrações de NaClO e HgCl₂ e diferentes tempos de imersão de HgCl₂, aos 15 dias de introdução in vitro.

	NaClO (2%)					NaClO (3%)			
	Tempo (min.)	Fungo (%)	Bactéria (%)	Necrose (%)	Sobrev. (%)	Fungo (%)	Bactéria (%)	Necrose (%)	Sobrev. (%)
HgCl ₂ 0,25%	5	55	30	0	15	60	30	0	10
	10	65	40	5	0	75	50	0	0
	15	70	25	5	0	60	35	0	5
Média		63,3 b	31,7 a	3,3 a	5,0 b	65,0 b	38,3 a	0,0 a	5,0 b
C.V. (%)		8	12,6	54,5	7,6	7,8	10,4	-	7,6
HgCl ₂ 0,40%	5	60	40	0	0	35	40	5	20
	10	55	40	10	0	35	40	0	25
	15	40	30	10	30	30	50	25	0
Média		51,7 a	36,7 a	6,6 b	10,0 a	33,3 a	43,3 a	10,0 b	15,0 a
C.V. (%)		9,9	10,8	27,3	38	15,3	9,2	18	25,3

Em que: Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Bonferroni a 5% de probabilidade C.V. (%) = coeficiente de variação da média. Sobrev. = sobrevivência.

No experimento com explantes de 4 mm foi observado 63% de sobrevivência após 15 dias da introdução in vitro. As maiores porcentagens de sobrevivência, de 60% a 80%, foram verificadas nos tratamentos que utilizaram explantes maiores, com 10 mm. Com este tamanho de explante a taxa de contaminação por fungos diminuiu, chegando a ausência de fungos com 3% de NaClO durante 10 min, mas houve contaminação por bactérias (15%) e a porcentagem de sobrevivência ficou em 80% (Tabela 7).

Tabela 7. Resultado da desinfestação de segmentos nodais de 4 mm e 10 mm de *Acacia mearnsii* utilizando cloreto de mercúrio (0,4%) e concentrações de hipoclorito de sódio por 10 min e 15 min, aos 15 dias de introdução in vitro.

NaOCl (%)	T (min.)	Tamanho expl. (mm)	Fungos (%)	Bactérias (%)	Necrose (%)	Sobreviventes (%)
2	10	4	25	5	8	63
2	10	10	6	21	3	71
3	10	10	0	15	5	80
2	15	10	3	30	3	65
3	15	10	5	15	0	80

Em que: Álcool etílico a 70% por 10 s, cloreto de mercúrio 0,4% (v/v) por 15 min. T = tempo de imersão.

Plant preservative mixture na assepsia de segmentos nodais de *Acacia mearnsii*

Após 15 dias da introdução in vitro de segmentos nodais de *A. mearnsii*, foi verificada baixa porcentagem de sobrevivência, sendo os melhores resultados obtidos após 4 h, 6 h e 8 h de imersão utilizando 1 mL L⁻¹ ou 2 mL L⁻¹ de *plant preservative mixture* no litro de meio de cultura. Foi verificada alta contaminação, principalmente com fungos, com 1 h, 2 h e 3 h de imersão, utilizando 1 mL L⁻¹ de *plant preservative mixture* no meio de cultura (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados da desinfestação de segmentos nodais de *Acacia mearnsii* utilizando tratamentos com 1 mL ou 2 mL de *plant preservative mixture*, com diferentes tempos de exposição, aplicados a segmentos nodais de *A. mearnsii* aos 15 dias da aplicação.

<i>Plant preservative mixture</i> no meio	T (h)	Fungos (%)	Bact. (%)	Necrose (%)	Sobrev. (%)
1 mL L ⁻¹	1	93	48	38	0
1 mL L ⁻¹	2	93	36	45	0

Continua...

Tabela 8. continuação.

<i>Plant preservative mixture</i> no meio	T (h)	Fungos (%)	Bact. (%)	Necrose (%)	Sobrev. (%)
1 mL L ⁻¹	3	86	45	39	0
1 mL L ⁻¹	4	16	39	12	33
1 mL L ⁻¹	6	16	31	22	31
1 mL L ⁻¹	8	26	28	21	25
2 mL L ⁻¹	4	10	35	19	36
2 mL L ⁻¹	6	18	28	11	43
2 mL L ⁻¹	8	25	33	21	21

Em que: Solução de imersão com 40 ml L⁻¹ de *plant preservative mixture*. T = tempo; Bact.= bactérias; Sobrev.= sobrevivência.

Discussão

Alguns autores obtêm explantes assépticos com o uso de solução de hipoclorito de sódio sem a necessidade do cloreto de mercúrio. Ribas et al. (2003), utilizando solução de hipoclorito de sódio a 0,25% durante 10 min, obtiveram 71,53% de sobrevivência para a desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg.), independente da época do ano (verão ou outono). Para introdução in vitro de segmentos nodais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), foi testado hipoclorito de sódio na desinfestação dos explantes, sendo este parcialmente eficiente na descontaminação, mas o seu uso isolado não foi satisfatório para o estabelecimento em longo prazo devido à recontaminação, principalmente por bactérias (Dutra et al., 2008). Neste sentido, em muitos estudos a desinfestação com cloreto de mercúrio ainda se faz necessária.

A desinfestação in vitro de segmentos nodais de plantas adultas de teca (*Tectona grandis* Linn. f.) foi observada com 15 min de exposição ao cloreto de mercúrio (0,1%) e com 30 min ao hipoclorito de sódio a 2,5% (Fermino Júnior et al., 2009). Entretanto, assim como no caso de acácia negra, nesses tratamentos com 15 min ou mais de exposição ao cloreto de mercúrio foram registradas porcentagens de oxidação. Outro trabalho em que houve efeito positivo do cloreto de mercúrio na etapa de desinfestação foi com corango-de-batata (*Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken), utilizando o tratamento com álcool etílico 70%, hipoclorito de sódio 1% e cloreto de mercúrio a 0,1% por 5 min (Flores et al., 2006). Para álamo (*Populus deltoides* Marsh), o melhor tratamento

de desinfestação foi álcool 75% por 8 s e cloreto de mercúrio 0,1% por 3 min (Ling & Yan, 2013).

A maior necrose verificada no presente trabalho com o aumento no tempo de imersão de HgCl_2 sugere que o aumento na concentração do desinfestante ou nos períodos de imersão, visando melhorar a eficiência, deve ser cuidadosamente avaliado, pois pode propiciar uma maior desinfestação, mas ocasionar necrose nos tecidos. Injúrias nos explantes, provocadas pela imersão em solução desinfestante, causam estresse e estimulam a atividade da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), relacionada à formação de compostos fenólicos (Taiz & Zeiger, 2013), provocando necrose do explante. Maiores tempos de contato dos segmentos nodais de cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC.) com o hipoclorito de sódio provocaram injúrias nos explantes e, conseqüentemente, oxidação fenólica (Golle et al., 2013). Tratamentos com cloreto de mercúrio, em baixas concentrações (0,01%), não foram eficientes contra bactérias e causaram altas taxas de oxidação em maiores concentrações (até 0,5%) para segmentos nodais de *I. paraguariensis* (Dutra et al., 2008). Isso demonstra a dificuldade de introduzir in vitro segmentos nodais de espécies lenhosas.

Correia & Graça (1995) introduziram in vitro brotos apicais de acácia negra, com nove meses de idade, tratados por imersão de 15 min em solução de fungicida Benomyl® (0,5 g L⁻¹) seguida por detergente comercial em 3% v/v e NaClO a 1% (v/v) com Tween 20% a 0,01% (v/v), sob agitação, e constataram que a redução do tamanho do explante de 10 mm para 5 mm permitiu diminuir a contaminação de 80% para 10% e aumentar a taxa de sobrevivência. O mesmo não ocorreu no presente estudo, pois as maiores porcentagens de sobrevivência (60% a 80%) foram verificadas nos tratamentos que utilizaram explantes maiores, com 10 mm.

Em tratamentos para introdução in vitro de acácia negra, o *plant preservative mixture* não foi eficaz para se obter culturas livres de microrganismos e sadias. Entretanto, diferentemente do observado no presente trabalho em desinfestação de segmentos nodais oriundos de minicepas de erva-mate (*I. paraguariensis*) o *plant preservative mixture*, também adicionado ao meio de cultura, foi eficaz para o controle da contaminação, mas proporcionou altas taxas de oxidação (100%), apresentando efeito fitotóxico para a cultura (Dutra et al., 2008).

Conclusões

Segmentos nodais de *A. mearnsii* com 10 mm respondem melhor ao tratamento de desinfestação e sobrevivência, com a combinação de álcool etílico 70%, cloreto de mercúrio a 0,4% e hipoclorito de sódio a 2%. A utilização do produto *plant preservative mixture* no meio de cultura e como solução desinfestante não proporciona resultados satisfatórios para segmentos nodais de *A. mearnsii*.

Protocolos de desinfestação e regeneração in vitro ainda não estão consolidados para *Acacia mearnsii* e variam muito de acordo com o genótipo, mas são importantes visando aprimorar o melhoramento genético da espécie por meio de plantios clonais.

Referências

- Anuário estatístico da ABRAF 2013: ano base 2012. Brasília, DF: ABRAF, 2013. 149 p.
- Bolle-Jones, E. W. Nutrition of *Hevea Brasiliensis*. II. Effect of nutrient deficiencies on growth, chlorophyll, rubber and mineral contents of Tjirandji seedlings. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaya**, v. 14, p. 209-230, 1954.
- Correia, D. & Graça, M. E. C. In vitro propagation of Black wattle (*Acacia mearnsii* De Wild.). **IPEF**, n. 48/49, p. 117-125, 1995.
- Davey, M. R. & Anthony, P. **Plant cell culture: essential methods**. Chichester, UK: Wiley-Blackwell, 2010. 359 p.
- Dutra, L. F. et al. A micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 49-59, 2009. DOI: 10.4336/2009.pfb.58.49.
- Dutra, L. F. et al. **Introdução ao cultivo in vitro de Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008. (Embrapa Florestas. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 38).
- Fermínio Júnior, P. C. P. et al. Estabelecimento, germinação e multiplicação in vitro de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 84, p. 427-435, 2009.
- Flores, R. et al. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 845-851, 2006.
- Golle, D. P. et al. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* DC. (Myrtaceae). **Revista Cerne**, v. 19, n. 1, p. 77-82, 2013.
- Grattapaglia, D. & Machado, M. A. Micropropagação. In: Torres, A. C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 1998. p. 183-260.
- Ling, W. & Yan, X. Research on tissue culture and propagation of *Populus deltoids* cl."725". **Journal of Anhui Agricultural University**, v. 40, p. 612-617, 2013.

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

Oliveira, L. S. de et al. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013. DOI: 10.4336/2013.pfb.33.76.481.

Ribas, L. L. F. et al. Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polyneuron*. **Revista Ciência Florestal**, v. 13, n. 1, p. 115-122, 2003.

Taiz, L. & Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

Xavier, A. & Otoni, W. C. Aplicações da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**, v. 33, n. 2, p. 303-307, 2009.

