



Enraizamento in vitro e aclimatização de plântulas de *Corymbia citriodora*

Luiz Filipe Maravilha^{1*}, Miranda Titon¹, Vitória de Souza Canguçu¹, Fabiana Miranda Rocha¹, Marcio Leles Romarco de Oliveira¹

¹Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Campus JK, Rodovia MGT 367, Km 583, nº 5000, Alto da Jacuba, CEP 39100-000, Diamantina, MG, Brasil

*Autor correspondente:
filipemaravilha@gmail.com

Termos para indexação:

Cultura de tecidos
Ácido indolbutírico
Vedação

Index terms:

Tissue culture
Indolbutyric acid
Seal

Histórico do artigo:

Recebido em 19/11/2021
Aprovado em 24/10/2022
Publicado em 18/05/2023

Resumo - O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de concentrações de ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento in vitro de brotações juvenis de *Corymbia citriodora*, e formas de vedação na aclimatização de plântulas micropropagadas. Para o enraizamento, foram colocadas brotações em meio de cultura com quatro concentrações de AIB (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹). Na pré-aclimatização, plântulas germinadas in vitro e isentas de contaminação foram transplantadas para copos de polietileno contendo substrato. Os copos foram embalados em sacos plásticos por 10 dias e mantidos em sala de cultura. Posteriormente, foram aplicados três tratamentos: ausência de cobertura; saco plástico intacto e saco plástico perfurado. Na aclimatização, manteve-se o histórico dos tratamentos da pré-aclimatização. As plântulas foram transplantadas para tubetes contendo substrato e mantidas inicialmente em casa de vegetação e depois em casa de sombra. Os resultados demonstram que as concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de AIB foram eficientes no enraizamento de explantes juvenis de *C. citriodora*, sendo que a maior concentração utilizada proporcionou o maior número médio de raízes. Recomenda-se a ausência de cobertura na pré-aclimatização para maior taxa de sobrevivência, altura e massa seca das mudas na etapa de aclimatização.

In vitro rooting and acclimatization of *Corymbia citriodora* seedlings



Abstract - The objective of this study was to evaluate the effect of indolbutyric acid (IBA) concentrations on in vitro rooting of *Corymbia citriodora* juvenile shoots, and sealing forms on the acclimatization of micropropagated seedlings. For rooting, shoots were placed in a culture medium with four concentrations of IBA (0, 1.0, 2.0, and 4.0 mg L⁻¹). In pre-acclimatization, seedlings germinated in vitro and without contamination were transplanted into polyethylene cups containing substrate. The cups were packed in plastic bags for 10 days and kept in a culture room. Subsequently, three treatments were applied: no coverage; intact plastic bag, and perforated plastic bag. In acclimatization, the history of pre-acclimatization treatments was maintained. The seedlings were transplanted into tubes containing substrate and kept initially in a greenhouse and then in a shade house. The results demonstrate that concentrations of 1.0; 2.0 and 4.0 mg L⁻¹ of IBA were efficient in the rooting of juvenile explants of *C. citriodora*, and the highest concentration used provided the highest average number of roots. The absence of cover in pre-acclimatization is recommended for greater survival rate, height, and dry mass of seedlings in the acclimatization stage.

Introdução

Espécies pertencentes ao gênero *Corymbia*, e alguns de seus híbridos interespecíficos, assumem fundamental importância no setor florestal, principalmente pela adaptação a diferentes condições ambientais e pelos múltiplos produtos que podem ser obtidos (Trueman et al., 2018; Avelar et al., 2020). A busca por melhor qualidade do produto final, aumento da produtividade, resistência a pragas, doenças e distúrbios climáticos, além da expansão de cultivo em regiões não tradicionais, despertou o interesse das empresas florestais em incluir espécies e híbridos de *Corymbia* nos programas de melhoramento genético (Teixeira, 2015; Peres et al., 2019). Dentre as espécies, destaca-se *Corymbia citriodora* (Hook.) K. D. Hill & L. A. S. Johnson, cuja madeira é usada principalmente nas indústrias de energia, carvão vegetal e madeira serrada (Monteiro et al., 2020). Além disso, é fonte de produtos florestais não madeireiros, incluindo mel e óleo essencial de suas folhas (Lin et al., 2017).

As plantações comerciais de *C. citriodora* têm sido tradicionalmente estabelecidas por via seminal. Devido aos baixos níveis de enraizamento, geralmente inferiores a 5%, empresas da área florestal encontram dificuldades para realizar a propagação vegetativa da espécie (Reis et al., 2013). Diante desse fato, nos últimos anos houve um aumento das pesquisas no Brasil sobre a micropropagação de espécies de *Corymbia* e seus híbridos (Brondani et al., 2018; Souza et al., 2018, 2020a, 2020b; Trueman et al., 2018; Avelar et al., 2020)

A micropropagação, também denominada propagação vegetativa in vitro, está presente nos programas de pesquisa no setor florestal e tem sido aplicada para a multiplicação rápida de plantas livres de vírus, em menor tempo e espaço físico (Abiri et al., 2020). Contudo, apesar do avanço desse método, os obstáculos na indução da rizogênese e aclimatização ainda constituem grandes desafios para a propagação clonal de *Eucalyptus* e *Corymbia* (Trueman et al., 2018; Abiri et al., 2020).

Na fase de enraizamento, um dos fatores que influenciam diretamente o processo de formação de raízes laterais e adventícias é a presença e/ou ausência de auxina no meio de cultura. Sendo assim, o conhecimento do uso desse regulador de crescimento é fundamental para o estabelecimento de protocolos eficientes (Gallo et al., 2017). Dentre as auxinas sintéticas, o ácido indolbutírico (AIB) é amplamente utilizado em processos

de propagação in vitro e ex vitro, principalmente por ser fotoestável e menos tóxico para as plantas (Hartmann et al., 2011). No entanto, a concentração a ser aplicada deve ser testada para cada espécie e propágulo.

A aclimatização é considerada a fase final da micropropagação e envolve a transferência de materiais vegetais cultivados in vitro para condições externas. O objetivo é reduzir o estresse fisiológico causado pela diferença entre os ambientes e proporcionar o desenvolvimento tanto do sistema radicular, quanto da parte aérea. Contudo, esta é uma etapa crítica e podem ocorrer grandes perdas de explantes, fazendo-se necessário o controle de fatores, como temperatura, luz, umidade, substrato e nutrientes (Dutra et al., 2009; Oliveira et al., 2013).

Considerando a importância de *C. Citriodora* para o setor florestal, a obtenção de um protocolo de micropropagação eficiente e reprodutível é fundamental para o estabelecimento de condições ótimas para a propagação dessa espécie. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de concentrações de AIB no enraizamento in vitro de brotações juvenis de *C. citriodora*, e formas de vedação na aclimatização de plântulas micropropagadas.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Melhoramento Florestal e no Centro Integrado de Propagação de Espécies Florestais (CIPEF), do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), em Diamantina, MG, entre novembro de 2017 e abril de 2018.

As sementes de *Corymbia citriodora* utilizadas encontravam-se armazenadas no CIPEF em condições de câmara fria (temperatura de 6 °C e umidade relativa do ar de 40%), e foram coletadas em 50 árvores matrizes, no ano de 2016, em Área de Produção de Sementes (APS). O material botânico da espécie compõe o banco de dados do Herbário Dendrológico Jeanine Felfili (HDJF-UFVJM), cuja exsiccata possui registro HDJF-5968.

Os explantes utilizados no experimento de enraizamento in vitro foram brotações oriundas do 6º subcultivo, mantidas em meio de cultura MS para multiplicação (Murashige & Skoog, 1962), com 100% da concentração dos sais e vitaminas, suplementado com

0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 0,8 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), 30 g L⁻¹ de sacarose, 6,5 g L⁻¹ de ágar Dinâmica®, 0,01 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) e 0,5 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP).

Para o experimento de pré-aclimatização e aclimatização, foram utilizadas plântulas provenientes de germinação in vitro, com aproximadamente 80 dias de idade. Para tanto, sementes de *C. citriodora* foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar horizontal, em solução de fungicida Cuprocarb 500® na concentração de 1 g L⁻¹ durante 15 min e lavadas três vezes com água destilada e autoclavada. Em seguida, as sementes foram transferidas para uma solução de álcool 70% e mantidas por 30 s. Após esse procedimento, as sementes foram imersas durante 20 min em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo, adicionada de 5 gotas de detergente comercial Tween 20 para cada 100 mL de solução. Nesta etapa, as sementes foram selecionadas pelo método densimétrico, baseado na metodologia de Miranda et al. (2016), sendo utilizadas apenas aquelas que submergiram. Por fim, as sementes foram submetidas a seis enxagues em água destilada autoclavada.

Após a desinfestação, as sementes foram colocadas para germinar em tubos de ensaio de 25 x 150 mm, contendo 10 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com 50% dos sais e vitaminas, suplementado com 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 20 g L⁻¹ de sacarose, 0,8 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP) e 6,5 g L⁻¹ de ágar MERCK®. O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,80 ± 0,01 antes da inclusão do ágar, sendo autoclavado por 15 min à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm, e resfriado antes da inoculação do material seminal. Após a inoculação das sementes, os tubos de ensaio foram fechados com tampas de Kimble em polietileno e transferidos para a sala de cultura, com fotoperíodo de 16 h, intensidade luminosa de 40 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares (Philips TL-D Super 85, 16 W, 5000 K) e temperatura de 25 ± 2 °C.

Fase de enraizamento in vitro

Brotações foram inoculadas em tubos de ensaio de 25 x 150 mm contendo 10 mL de meio de cultura previamente preparado, autoclavado (15 min à temperatura de 121 °C e pressão de 1,0 atm) e resfriado. Utilizou-se o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) com 100% dos sais e vitaminas, suplementado com 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 0,8 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), 20

g L⁻¹ de sacarose e 6,0 g L⁻¹ de ágar Dinâmica®, sendo o pH ajustado para 5,80 ± 0,01 antes da inclusão do ágar. Os tratamentos foram constituídos pelas concentrações de 0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), adicionadas ao meio de cultura antes da autoclavagem. Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) constituído por três repetições, com cinco tubos por repetição e um explante por tubo, totalizando 60 tubos de ensaio. Os tubos de ensaio foram mantidos em sala de cultura, com fotoperíodo de 16 h, intensidade luminosa de 40 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares (Philips TL-D Super 85, 16 W, 5000 K) e temperatura de 25 ± 2 °C. Aos 30 dias, avaliou-se o percentual de enraizamento e o número de raízes adventícias por explante.

Fase de pré-aclimatização e aclimatização

Para a pré-aclimatização, plântulas germinadas in vitro e isentas de contaminação, foram transplantadas individualmente para copos de polietileno com capacidade de 330 mL, contendo 20 g de substrato autoclavado composto por 70% de vermiculita de granulometria média e 30% de substrato comercial Bioplant®.

Visando favorecer a luminosidade e manter a umidade, os copos contendo as plântulas foram colocados dentro de sacos plásticos de polietileno e estes amarrados com arame encapado, simulando uma estufa. Após a vedação, os copos foram mantidos em sala de cultura sob fotoperíodo de 16 h, intensidade luminosa de 40 μmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares (Philips TL-D Super 85, 16 W, 5000 K) e temperatura de 25 ± 2 °C. Após dez dias de pré-aclimatização, foram aplicados três tratamentos: ausência de cobertura; saco plástico intacto e saco plástico perfurado (dez furos, cinco de cada lado, com auxílio de uma agulha). A cada dois dias as plântulas eram irrigadas com solução de macro e micronutrientes MS na concentração de 50% dos sais e vitaminas.

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados (DBC), com três tratamentos, quatro blocos e seis copos com uma plântula por parcela. Os quatro blocos foram definidos em função da variação observada no tamanho das plântulas (Bloco 1 - pequenas, com altura aproximada de 5,0 cm; Bloco 2 e 3 - médias, aproximadamente 7,5 cm e Bloco 4 - grandes, aproximadamente 10,5 cm). Aos 14 dias após a aplicação dos tratamentos, avaliou-se o percentual de sobrevivência e a altura das plântulas.

Para mensuração da altura, utilizou-se uma régua milimetrada, tomando-se como referência o nível do substrato no copo até a gema apical.

Após 24 dias de pré-aclimatização (10 dias sob as mesmas condições e 14 com os tratamentos), as plantas foram transplantadas para tubetes de 180 cm³ contendo substrato comercial Trimix[®] adicionado de 8 g L⁻¹ de fertilizante de liberação controlada (Osmocote[®]) na proporção de 19-6-10 (NPK), com liberação entre 3 e 4 meses. Durante o processo de aclimatização, manteve-se o delineamento experimental e o histórico dos tratamentos da pré-aclimatização.

As plantas foram mantidas por 28 dias em casa de vegetação coberta com filme de polietileno transparente (150 µ de espessura) e tela de 50% de sombreamento, com irrigações diárias de 30 s a cada 20 min, por nebulização (nebulizador FOGGER, com vazão de 28 L h⁻¹). Aos 7, 14, 21 e 28 dias de aclimatização, avaliou-se o percentual de sobrevivência e a altura das mudas. A altura foi obtida com auxílio de uma régua milimetrada posicionada ao nível do substrato até a gema apical.

Após esse período, as mudas foram transferidas para casa de sombra coberta com tela de sombreamento de 50%, submetidas a cinco irrigações diárias de 5 min cada por microaspersão (microaspersor bailarina azul, com vazão de 85 L h⁻¹), por 14 dias. Aos 7 e 14 dias, também foi avaliado o percentual de sobrevivência e a altura das mudas.

Ao final do experimento, após 42 dias em viveiro, as mudas foram retiradas dos tubetes, destorroadas e lavadas em água corrente, sendo separadas em parte aérea e raízes. Em seguida, foram armazenadas em sacos de papel Kraft para secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C, até atingirem peso constante. Após a secagem, as amostras foram pesadas em balança analítica para determinação das variáveis: massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR). Para isso, utilizou-se a massa seca média das mudas sobreviventes em cada tratamento dentro de cada bloco.

Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) após terem atendido às pressuposições de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade (teste de Bartlett). No caso de significância, foi realizada a comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância ou análise de regressão e, em caso de não

significância, utilizou-se a estatística descritiva. As análises foram realizadas com auxílio do software R (R Core Team, 2021), utilizando o pacote ExpDes.pt versão 1.1.2 (Ferreira et al., 2021).

Resultados

Fase de enraizamento in vitro

Houve efeito significativo ($p < 0,05$) das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) sobre o percentual de enraizamento e o número de raízes formadas em explantes de *Corymbia citriodora*, aos 30 dias de cultivo in vitro. Não foi possível ajustar uma equação que explicasse biologicamente a tendência dos dados de percentual de enraizamento. O tratamento controle apresentou 53,3% de enraizamento e para os demais tratamentos constatou-se 100%.

O número médio de raízes ajustou-se ao modelo quadrático, em função das concentrações de AIB, com alto coeficiente de determinação (R^2) (Figura 1). Observou-se que o aumento das concentrações de auxina favoreceu a formação de raízes adventícias e que a maior concentração utilizada (4,0 mg L⁻¹) promoveu o maior número médio de raízes nos explantes de *C. citriodora* (17,3).

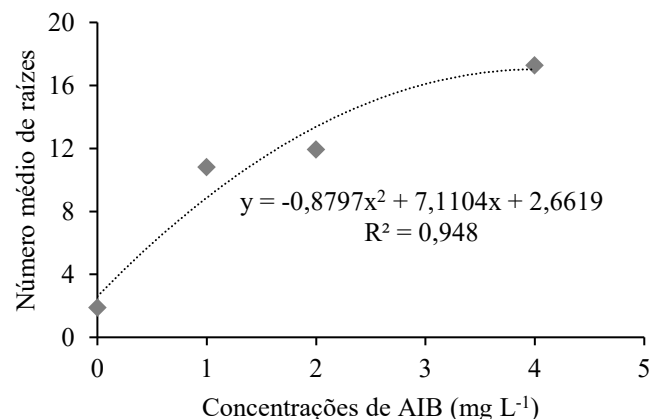


Figura 1. Número médio de raízes (y) de explantes de *Corymbia citriodora* cultivados in vitro, em função das concentrações de ácido indolbutírico (AIB) (x), aos 30 dias.

Figure 1. Mean number of roots (y) of *Corymbia citriodora* explants cultivated in vitro, as a function of indolbutyric acid (IBA) concentrations (x), at 30 days.

Fase de pré-aclimatização e aclimatização

Na fase de pré-aclimatização, aos 14 dias após a aplicação dos tratamentos, não foi constatado efeito estatístico significativo ($p > 0,05$) das formas de vedação sobre a sobrevivência e altura das plântulas de *C. citriodora*. Durante esse período de cultivo em sala de cultura, observou-se 100% de sobrevivência das plântulas em todos os tratamentos. A média geral da altura foi de 11,9 cm, variando de 11,5 cm (saco plástico intacto) a 12,3 cm (saco plástico perfurado).

Na fase de aclimatização em casa de vegetação, o percentual de sobrevivência das mudas de *C. citriodora* cultivadas na ausência de cobertura diminuiu 4,2% dos 7 aos 14 dias, e se manteve constante até o 28º dia (Figura 2A). Para os demais tratamentos, a taxa de sobrevivência decresceu durante todo o tempo de avaliação. Com relação à altura média ao longo do tempo (Figura 2B), os valores mantiveram-se crescentes em todos os tratamentos até o fim das avaliações.

Aos 28 dias de cultivo em casa de vegetação, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos, quanto ao percentual de sobrevivência e altura média das mudas de *C. citriodora* (Figura 3). O tratamento que consistiu na retirada total do saco plástico expressou o maior percentual de sobrevivência (95,8%) e mostrou-se estatisticamente diferente do tratamento em que o saco plástico foi mantido intacto (Figura 3A). A melhor resposta em altura média das mudas (16,4 cm) foi observada na ausência de cobertura, diferindo estatisticamente dos outros tratamentos (Figura 3B).

Aos 14 dias de aclimatização em casa de sombra, observou-se que os tratamentos testados influenciaram significativamente ($p < 0,05$) o percentual de sobrevivência e a altura média das mudas de *C. citriodora* (Figura 4). Assim como em casa de vegetação, a ausência de cobertura promoveu maior taxa de sobrevivência (95,8%) (Figura 4A) e melhor resposta em altura média (18,6 cm) (Figura 4B), diferindo estatisticamente dos outros tratamentos.

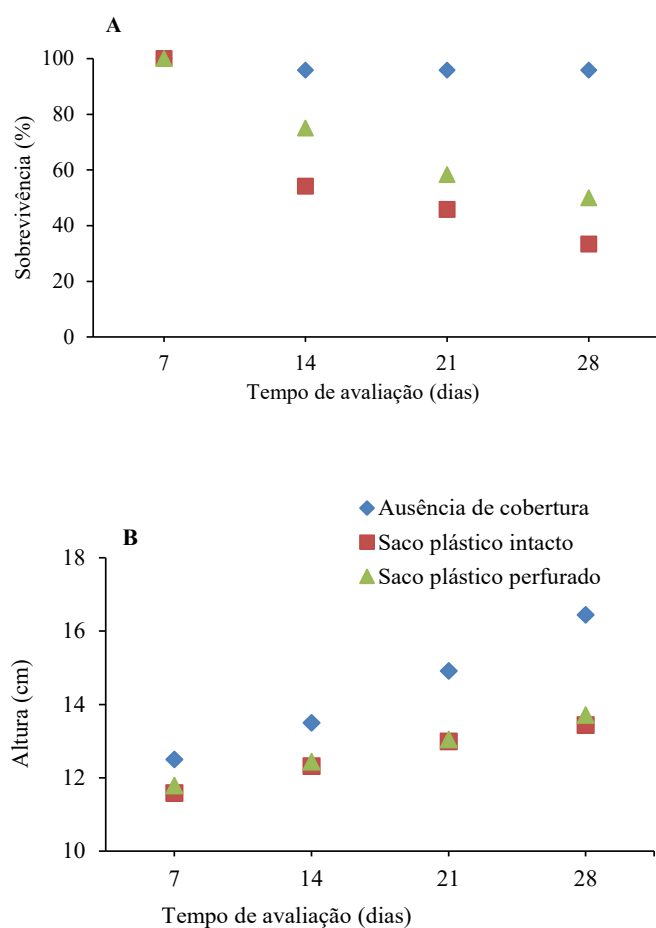


Figura 2. Percentual de sobrevivência (A) e altura média (B) das mudas de *Corymbia citriodora*, dos 7 aos 28 dias de aclimatização em casa de vegetação, em resposta a três formas de vedação.

Figure 2. Survival percentage (A) and average height (B) of *Corymbia citriodora* seedlings, from 7 to 28 days of acclimatization in a greenhouse, in response to three forms of sealing.

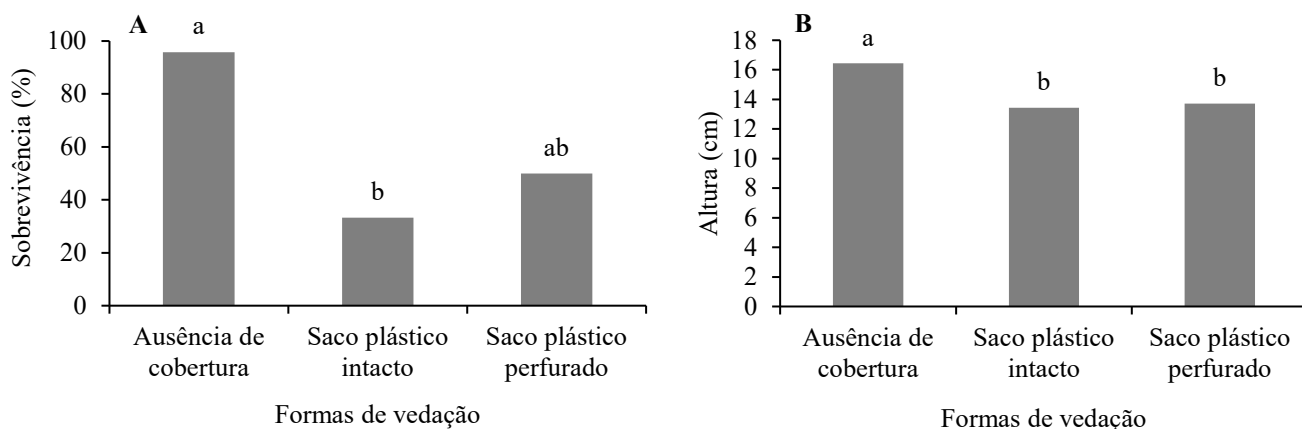


Figura 3. Percentual de sobrevivência (A) e altura média (B) das mudas de *Corymbia citriodora* em resposta a três formas de vedação, aos 28 dias de cultivo em casa de vegetação. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Figure 3. Survival percentage (A) and average height (B) of *Corymbia citriodora* seedlings in response to three forms of sealing, at 28 days of cultivation in a greenhouse. Means followed by the same letter do not differ, according to the Tukey test ($p > 0.05$).

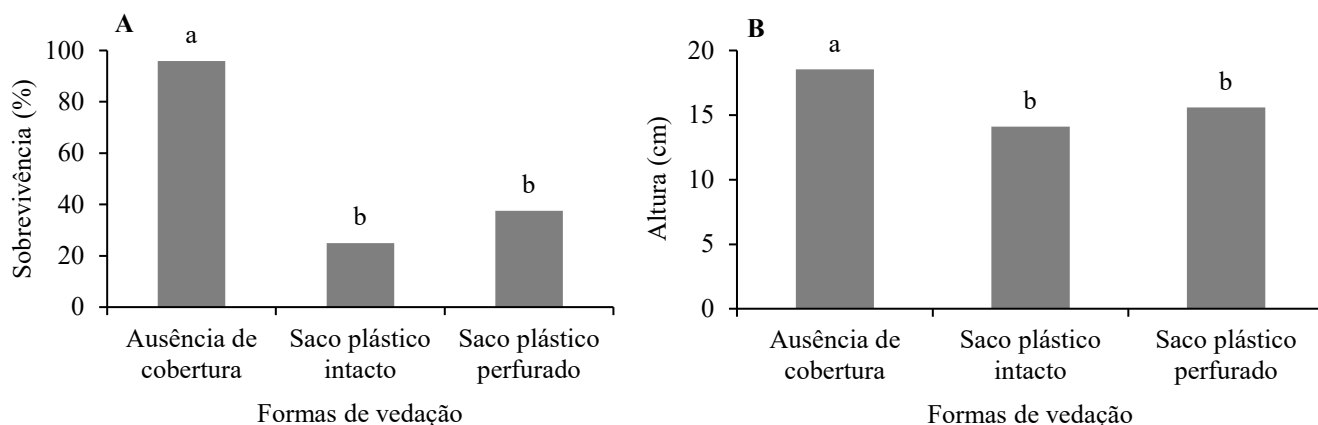


Figura 4. Percentual de sobrevivência (A) e altura média (B) das mudas de *Corymbia citriodora* em resposta a três formas de vedação, aos 14 dias de cultivo em casa de sombra. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Figure 4. Survival percentage (A) and average height (B) of *Corymbia citriodora* seedlings in response to three forms of sealing, at 14 days of cultivation in a shade house. Means followed by the same letter do not differ, according to the Tukey test ($p > 0.05$).

Constatou-se que as varáveis massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR), avaliadas ao final do experimento, foram significativamente influenciadas ($p < 0,05$) pelos tratamentos (Figura 5). Os três

tratamentos diferiram estatisticamente entre si, sendo que o melhor resultado para MSPA (Figura 5A) e MSR (Figura 5B) foi verificado em plântulas com ausência de cobertura (1,5 g e 0,4 g, respectivamente).

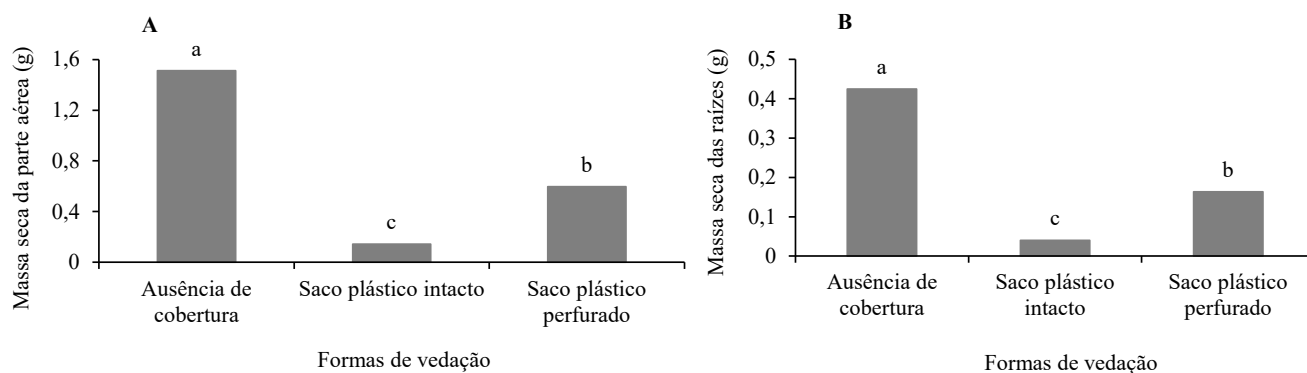


Figura 5. Massa seca da parte aérea (A) e das raízes (B) de mudas de *Corymbia citriodora* em resposta a três formas de vedação, ao final do experimento. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Figure 5. Dry mass of shoot (A) and roots (B) of *Corymbia citriodora* seedlings in response to three forms of sealing, at the end of the experiment. Means followed by the same letter do not differ, according to the Tukey test ($p > 0.05$).

Discussão

A etapa de enraizamento é uma das mais importantes em espécies florestais, especialmente em espécies como *Corymbia citriodora*, que apresenta recalcitrância ao enraizamento, com níveis abaixo de 5% (Reis et al., 2013). A rizogênese ocorre em uma a três semanas e pode ser dividida em indução, iniciação e alongação, sendo cada fase influenciada pela concentração e tempo de exposição à auxina (Grattapaglia & Machado, 1998).

O enraizamento das brotações verificado na ausência de ácido indolbutírico (AIB) indica que, provavelmente, o acúmulo de auxinas endógenas de origem foliar resultou em aumento da atividade metabólica do tecido e, conseqüentemente, contribuiu para o processo de formação das raízes, principalmente na fase de indução (Costa et al., 2013; Pacurar et al., 2014; Lafetá et al., 2016). Entretanto, devido ao baixo valor, os resultados deste estudo corroboram com os obtidos por outros autores (Dias et al., 2012; Lerin et al., 2021), que apontam a necessidade da utilização de auxinas na propagação in vitro para promover o aumento do percentual de enraizamento dos explantes.

Quanto ao número de raízes, a resposta quadrática com elevado coeficiente de determinação indica que o modelo foi capaz de explicar os dados coletados (Silva & Santana, 2014). Na concentração mais alta de AIB utilizada, o número médio de raízes observado foi superior, o que

pode resultar em uma maior e melhor distribuição de raízes ao redor da planta, aumentando assim a área de absorção de água e nutrientes (Radmann et al., 2014, Lima et al., 2018). Isso evidencia a importância de se definir concentrações de auxina adequadas para cada espécie ou genótipo, visando à formação de um sistema radicular funcional e bem estruturado, essencial para assegurar maior sobrevivência na fase de aclimatização (Xavier et al., 2013).

Na transferência da plântula de uma condição in vitro para uma condição ex vitro, ela passa de uma situação heterotrófica, com alta disponibilidade de nutrientes e suprimento externo de energia (sacarose no meio), para uma situação que exige autossuficiência (Grattapaglia & Machado, 1998; Silveira et al., 2020). Durante esse processo, o estresse hídrico é geralmente o maior problema. Uma planta, embora pareça perfeita in vitro, pode apresentar desordens anatômicas, como estômatos disfuncionais e cera epicuticular delgada ou inexistente, que dificultam o controle da transpiração, resultando em rápida perda de água (Hazarika, 2006; Hoang et al., 2017).

Segundo Grattapaglia & Machado (1998), tratamentos de redução gradual de umidade são recomendados, para aumentar a sobrevivência no transplante. Entretanto, no presente estudo, a ausência de cobertura plástica na pré-aclimatização resultou em maior percentual de sobrevivência, altura e massa seca (parte aérea e

raízes) das mudas na etapa de aclimatização. É possível inferir que este tratamento permitiu maior troca gasosa entre o ar atmosférico e o ambiente no interior dos recipientes, promovendo melhor transpiração das folhas e impedindo o acúmulo de etileno, que em determinadas concentrações pode desencadear efeitos adversos quanto à diferenciação, desenvolvimento, morfologia e crescimento das plantas (Saldanha et al., 2012; Sá et al., 2012). Além disso, é importante ressaltar que a pré-aclimatização foi realizada em sala de crescimento, ambiente intermediário entre a cultura *in vitro* e a casa de vegetação, com temperatura, irradiância e fotoperíodo controlados. Provavelmente, devido a essas condições, não houve necessidade de estufa sobre as plantas.

Saldanha et al. (2012) e Miranda et al. (2016), em estudos sobre tipos de vedação no cultivo *in vitro* de *Pfaffia glomerata* e *Eremanthus incanus*, respectivamente, verificaram que o uso de membrana porosa em substituição a um sistema fechado possibilitou melhor desenvolvimento dos explantes. De acordo com Souza et al. (2019), a utilização dessas membranas no cultivo de plantas pode melhorar o processo de aclimatização *ex vitro*, aumentando a taxa de sobrevivência.

Resultados contrastantes ao do presente estudo foram encontrados por Moura et al. (2012), que trabalharam com formas de vedação *ex vitro* e observaram que o uso de cobertura de plástico transparente favoreceu a aclimatização de plântulas micropropagadas de *Bowdichia virgilioides*. Segundo os autores, este fato deve ser atribuído à umidade relativa, que era maior no interior do saco plástico, mais próxima daquela encontrada no interior do tubo de ensaio.

Além dos fatores ambientais embutidos no sistema, fica evidente que a forma de vedação mais adequada para adaptação às condições *ex vitro* varia muito entre espécies. No caso de *C. citriodora*, a presença de mecanismos de controle estomático contribuiu para reduzir a taxa de transpiração em condições de déficit hídrico (Abreu et al., 2015), dispensando a utilização de cobertura plástica na pré-aclimatização. Isso é vantajoso, por reduzir os custos de produção de mudas e permitir que as plantas micropropagadas sejam transferidas para a condição *ex vitro* sem passar por uma adaptação gradual de umidade.

Conclusões

As concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) foram eficientes no enraizamento de explantes juvenis de *Corymbia citriodora*, sendo que a maior concentração utilizada proporcionou o maior número médio de raízes. Recomenda-se a ausência de cobertura na pré-aclimatização, para melhores resultados na etapa de aclimatização.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Conflito de interesses

Os autores não têm conflito de interesses a declarar.

Contribuição de Autoria

Luiz Filipe Maravilha: conceituação, análise formal, investigação, metodologia, escrita - primeira redação, escrita - revisão e edição.

Miranda Titon: conceituação, análise formal, investigação, metodologia, supervisão, escrita - revisão e edição.

Vitória de Souza Canguçu: investigação, escrita - revisão e edição.

Fabiana Miranda Rocha: investigação, escrita - revisão e edição.

Marcio Leles Romarco de Oliveira: escrita - revisão e edição.

Referências

Abiri, R. et al. The prospect of physiological events associated with the micropropagation of *Eucalyptus* sp. **Forests**, v. 11, n. 11, p. 1211, 2020. <https://doi.org/10.3390/f11111211>.

Abreu, M. C. et al. Valores limítrofes para transpiração, desenvolvimento e crescimento de *Corymbia citriodora* (Hook.) K. D. Hill & L. A. S. Johnson em resposta à deficiência hídrica no solo. **Revista Árvore**, v. 39, n. 5, p. 841-852, 2015. <https://doi.org/10.1590/0100-67622015000500007>.

Avelar, M. L. M. et al. *In vitro* establishment of *Eucalyptus* and *Corymbia* species from epicormic shoots. **Revista Árvore**, v. 44, e4427, 2020. <https://doi.org/10.1590/1806-908820200000027>.

- Brondani, G. E. et al. Mini-incubators improve the adventitious rooting performance of *Corymbia* and *Eucalyptus* microcuttings according to the environment in which they are conditioned. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2 (suppl. 1), p. 2409-2423, 2018. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170284>.
- Costa, C. T. da et al. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 133, 2013. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00133>.
- Dias, P. C. et al. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 453-462, 2012. <https://doi.org/10.4336/2012.pfb.32.72.453>.
- Dutra, L. F. et al. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 49-59, 2009. <https://doi.org/10.4336/2009.pfb.58.49>.
- Ferreira, E. B. et al. **ExpDes.pt**: experimental designs package. R package version 1.2.1. 2021. Disponível em: <http://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>. Acesso em: 10 Nov. 2021.
- Gallo, R. et al. IBA and microcutting collections in the micropropagation of *Eucalyptus* spp hybrid clones. **Revista Árvore**, v. 41, n. 6, e410605, 2017. <https://doi.org/10.1590/1806-90882017000600005>.
- 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.
- Hartmann, H. T. et al. **Plant propagation**: principles and practices. 8. ed. Boston: Prentice-Hall, 2011. 915 p.
- Hazarika, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038>.
- Hoang, N. N. et al. 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. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1219-2>.
- Lafetá, B. O. et al. Ácido indol-3-butírico (AIB) no enraizamento de estacas de fedegoso gigante. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 88, p. 489-496, 2016. <https://doi.org/10.4336/2016.pfb.36.88.1084>.
- Lerin, J. et al. Histomorphology and proteomics during rooting of *in vitro* shoots in *Cariniana legalis* (Lecythidaceae), a difficult-to-root endangered species from the Brazilian Atlantic Forest. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 144, n. 2, p. 325-344, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01955-7>.
- Lima, C. C. et al. Efeito de diferentes concentrações de AIB e procedências geográficas no enraizamento de estacas de paricá. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 3, p. 1282-1292, 2018. <https://doi.org/10.5902/1980509833380>.
- Lin, Y. et al. Landrace origins and phenotypic diversity through seedling morphology in *Corymbia citriodora* subsp. *citriodora*. **Australian Forestry**, v. 80, n. 1, p. 43-56, 2017. <https://doi.org/10.1080/00049158.2016.1275494>.
- Miranda, N. A. et al. Meio de cultura, reguladores de crescimento e formas de vedação de tubos de ensaio na multiplicação *in vitro* de candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less). **Scientia Forestalis**, v. 44, n. 112, p. 1009-1018, 2016. <https://doi.org/10.18671/scifor.v44n112.22>.
- Monteiro, T. C. et al. Water flow in different directions in *Corymbia citriodora* wood. **Maderas. Ciencia y Tecnología**, v. 22, n. 3, p. 385-394, 2020. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2020005000312>.
- Moura, L. C. et al. Micropropagação de sucupira-preta por meio de gemas axilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 12, p. 1691-1698, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012001200003>.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Oliveira, L. S. de et al. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013. <https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.76.481>.
- Pacurar, D. I. et al. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. **Physiologia Plantarum**, v. 151, n. 1, p. 83-96, 2014. <https://doi.org/10.1111/ppl.12171>.
- Peres, L. C. et al. Clonal selection of *Corymbia* for energy and charcoal production. **Advances in Forestry Science**, v. 6, n. 3, p. 749-753, 2019. <https://doi.org/10.34062/afs.v6i3.8293>.
- R Core Team. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2021. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 10 nov. 2021.
- Radmann, E. B. et al. Interação entre o genótipo e AIB no enraizamento de estacas semilenhosas de porta enxertos de pessegueiro. **Nativa**, v. 2, n. 4, 229-233, 2014. <https://doi.org/10.31413/nativa.v2i4.1726>.
- Reis, C. A. F. et al. *Corymbia citriodora*: estado da arte de pesquisas no Brasil. Colombo: Embrapa Florestas, 2013. 59 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 255). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/974349/1/Doc.255ReisAinfo1.pdf>.
- Sá, A. J. et al. Sealing and explant types on the mangaba micropropagation. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 4, p. 406-414, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542012000400004>.
- Saldanha, C. W. et al. A lowcost 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. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0162-5>.
- Silva, E. N. & Santana, A. C. Modelos de regressão para estimação do volume de árvores comerciais, em florestas de Paragominas. **Revista Ceres**, v. 61, n. 5, p. 631-636, 2014. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201461050005>.
- Silveira, A. A. C. et al. Micropropagation of *Bambusa oldhamii* Munro in heterotrophic, mixotrophic and photomixotrophic systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 141, n. 2, p. 315-326, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01788-4>.

- Souza, D. M. S. C. et al. Light quality in the *in vitro* introduction of *Corymbia* hybrid clones. **Revista Árvore**, v. 42, n. 6, p. 1-9, 2018. <https://doi.org/10.1590/1806-90882018000600004>.
- Souza, D. M. S. C. et al. Light quality, 6-benzyladenine and number of subcultures for *in vitro* multiplication of hybrid clones of *Corymbia*. **Scientia Forestalis**, v. 48, n. 128, e3282, 2020a. <https://doi.org/10.18671/scifor.v48n128.03>.
- Souza, D. M. S. C. et al. Mixotrophism effect on *in vitro* elongation and adventitious rooting of *Eucalyptus dunnii*. **Cerne**, v. 25, n. 4, p. 394-401, 2019. <https://doi.org/10.1590/01047760201925042638>.
- Souza, D. M. S. C. et al. Photomixotrophism on *in vitro* elongation of *Corymbia* hybrid clones. **Scientia Forestalis**, v. 48, n. 128, e3436, 2020b. <https://doi.org/10.18671/scifor.v48n128.11>.
- Teixeira, B. M. dos R. Clones de eucalipto. **Revista Opiniões**, v. 12, n. 41, p. 31, 2015.
- Trueman, S. J. et al. Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, v. 9, n. 2, p. 84, 2018. <https://doi.org/10.3390/f9020084>
- Xavier, A. et al. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2 ed. rev. ampl. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2013. 279 p.