



# Regeneração de plântulas de *Eucalyptus grandis* a partir de organogênese direta *in vitro*

Rafael Augusto Arenhart<sup>1</sup> e Gilmar Roberto Zaffari<sup>2</sup>

**Resumo**—O *Eucalyptus grandis* é a espécie florestal que está entre as mais cultivadas no Brasil devido a seu rápido crescimento e por apresentar alta qualidade da madeira. Com o objetivo de clonar o *E. grandis* para a produção de mudas, este trabalho propôs melhorar o protocolo de micropropagação por organogênese direta. Segmentos nodais das plântulas germinadas *in vitro* foram inoculados em meio de cultura com diferentes níveis de reguladores de crescimento na fase de proliferação e enraizamento. Na fase de proliferação, a adição de reguladores de crescimento não promoveu aumento significativo quanto ao número e à altura de brotos em comparação ao meio de cultura ausente de reguladores. O efeito da adição de ANA e AIB ao meio de cultura promoveu elevada taxa de enraizamento e crescimento das raízes, porém o aumento da concentração de 0,5 para 1mg/L destes reguladores reduziu o crescimento das raízes. Os resultados deste trabalho evidenciam a possibilidade de micropropagação de *Eucalyptus grandis* a partir de organogênese direta.

**Termos para indexação:** micropropagação, reguladores de crescimento, clonagem.

## Seedling regeneration of *Eucalyptus grandis* by *in vitro* direct organogenesis

**Abstract**—*Eucalyptus grandis* is one of the most cultivated forestry species in Brazil due to its fast growth and good timber quality. With the objective of cloning *E. grandis* for seedling production, this study aimed to improve the micropropagation protocol by direct organogenesis. Micro cuttings from *in vitro* germinated seedlings were inoculated in culture medium with different levels of growth regulators during the multiplication and rooting stages. During the multiplication stage, the addition of growth regulators did not promote significant increase in bud number and height when compared to the control. Addition of ANA and IBA to the medium promoted higher rate of rooting and growth of roots, but an increase in concentration from 0,5 to 1mg/L of these growth regulators reduced the root growth. The results of this study evidenced the possibility of micropropagation of *Eucalyptus grandis* by *in vitro* direct organogenesis.

**Index terms:** micropropagation, growth regulators, cloning.

Aceito para publicação em 2/8/07.

<sup>1</sup>Biólogo, Univali/CTTMar, C.P. 360, 88302-202 Itajaí, SC, e-mail: rafaarenhart@yahoo.com.br.

<sup>2</sup>Eng. agr., Dr., Epagri/Estação Experimental de Itajaí, C.P. 277, 88301-970 Itajaí, SC, fone: (47) 3341-5244, e-mail: gzaffari@epagri.sc.gov.br.

## Introdução

O Brasil possui atualmente 5 milhões de hectares de florestas plantadas, sendo o gênero *Eucalyptus* responsável por 64% do total. As espécies do gênero *Eucalyptus* estão presentes comercialmente em 500 municípios brasileiros, situando o Brasil entre os dez maiores produtores florestais do mundo. O País apresenta tecnologia avançada na exploração e transformação da madeira, possuindo a maior produção mundial (Roxo, 2003).

As espécies de eucaliptos possuem grande capacidade de regeneração após o desfolhamento ou corte da parte aérea. Essa habilidade se deve à presença de gemas adventícias e de lignotúberes na base da árvore em muitas das espécies (Reis & Reis, 1997). Os brotos formados na rebrota podem ser usados na clonagem *in vitro* por serem materiais juvenis, com maior possibilidade de resposta na micropropagação.

A maior vantagem de se usar a organogênese como ferramenta para a produção de massa clonal é o seu potencial de desenvolver enormes taxas de multiplicação, produzindo grandes quantidades de plantas uniformes com qualidades selecionadas (Thorpe et al., 1991).

Devido à grande dificuldade de micropropagar plantas lenhosas e à diversidade de respostas obtidas conforme cada genótipo, o presente trabalho propôs estudar o efeito dos reguladores de crescimento nas fases de proliferação e enraizamento de explantes na organogênese direta de *Eucalyptus grandis*, visando aprimorar o protocolo de micropropagação.

## Material e métodos

Os ensaios de micropropagação de *Eucalyptus grandis* utilizaram segmentos nodais de  $\pm 2$ cm de altura e 0,3cm de diâmetro, provenientes de plântulas germinadas *in vitro*, a partir de sementes do viveiro da Epagri/Estação Experimental de Itajaí, no período de março a dezembro de 2005.

No ensaio de proliferação os explantes foram inoculados em meio de cultura sólido de

Murashige & Skoog (1962) (MS), modificado segundo Cheng (1977), (MSM), na presença ou ausência dos reguladores de crescimento tidiazuron (TDZ), 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido 3-indolacético (AIA), isolados e/ou combinados em 13 tratamentos: P01 = MSM, P02 = MSM + 0,5mg/L de BAP, P03 = MSM + 1mg/L de BAP, P04 = MSM + 2mg/L de BAP, P05 = MSM + 0,5mg/L de BAP e 0,25mg/L de AIA, P06 = MSM + 1mg/L de BAP e 0,5mg/L de AIA, P07 = MSM + 2,0mg/L de BAP e 1mg/L de AIA, P08 = MSM + 0,5mg/L de TDZ, P09 = MSM + 1mg/L de TDZ, P10 = MSM + 2mg/L de TDZ, P11 = MSM + 0,5mg/L de TDZ e 0,25mg/L de AIA, P12 = MSM + 1mg/L de TDZ e 0,5mg/L de AIA e P13 = MSM + 2mg/L de TDZ e 1mg/L de AIA.

As plântulas obtidas no ensaio de proliferação foram utilizadas no ensaio de enraizamento e submetidas a dez tratamentos em meio MSM na presença e na ausência das auxinas ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indolbutírico (AIB) isoladas. Os tratamentos aplicados foram: E01 = MSM, E02 = MSM + 0,5mg/L de ANA, E03 = MSM + 1mg/L de ANA, E04 = MSM + 0,5mg/L de AIB, E05 = MSM + 1mg/L de AIB, E06 = MSM 50%, E07 = MSM 50% + 0,5mg/L de ANA, E08 = MSM 50% + 1mg/L de ANA, E09 = MSM 50% + 0,5mg/L de AIB e E10 = MSM 50% + 1mg/L de AIB.

Além dos sais minerais, vitaminas MS e dos reguladores de crescimento, os meios de cultura foram suplementados com sacarose como fonte de carbono, em concentração de 30g/L. O pH foi ajustado a 5,7, e os meios foram solidificados com ágar-ágar (7g/L). As culturas foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, com intensidade de luz de 40 a 50 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s e temperatura de 28  $\pm$  2°C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em 13 tratamentos na fase de proliferação e 10 tratamentos na fase de enraizamento, com cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de um frasco de cultura contendo um segmento nodal. As avaliações foram realizadas aos 60 e 30 dias para as fases de proliferação e enraizamento, respectivamente,

contando-se o número de brotos, o número e tamanho das raízes e a formação de calo. Os dados foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$  e submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância.

## Resultados e discussão

A utilização do meio MSM promoveu em média o desenvolvimento de três brotos por explante com altura média de 0,81cm (Tabela 1). Com a adição de BAP ou TDZ isoladamente ao meio MSM, os explantes não apresentaram diferenças significativas quanto ao número e à altura média dos brotos, comparando as concentrações entre si, e mesmo em relação ao meio P01. Este resultado pode ter ocorrido devido à excisão do ápice caulinar dos explantes submetidos aos tratamentos, o que pode ter induzido a quebra da dominância apical, não havendo a necessidade da aplicação exógena de citocininas (Taiz & Zeiger, 2004).

O nível endógeno de citocinina é um fator a se considerar neste resultado. Um alto nível endógeno faz com que a aplicação exógena não tenha efeito. Porém, concentrações menores dos reguladores de crescimento podem apresentar efeito maior na formação de gemas segundo Franclet & Boulay (1982), que reduziram a concentração de BAP de 1 para 0,1mg/L para proceder à fase de multiplicação de *Eucalyptus*.

A adição de 2mg/L de BAP mais 1mg/L de AIA (P07) resultou no decréscimo significativo do número médio dos brotos em relação ao controle (P01) e ao tratamento MSM adicionado de 1mg/L de BAP (P03). A presença de reguladores de crescimento no meio de cultura dos tratamentos P12 e P13 promoveu efeito inibitório na altura média dos brotos. O aumento das concentrações de BAP, TDZ e AIA isoladas e/ou combinadas resultou na diminuição do número e da altura média dos brotos em todos os tratamentos. Embora nem sempre necessárias na fase de multiplicação, as auxinas são usadas para o crescimento de partes aéreas. As auxinas podem anular o efeito inibitório que as citocininas exercem sobre o alongamento das culturas conforme ►

Tabela 1. Valores médios do número e altura dos brotos em explantes do tipo segmento nodal de *E. grandis* em meio de cultura Murashigue & Skoog (1962), modificado segundo Cheng (1977) (MSM), adicionado ou não de reguladores de crescimento na fase de proliferação, após 60 dias de cultivo in vitro Itajaí, 2006

Tratamentos				Broto <sup>(1)</sup>	
MSM	TDZ	BAP	AIA	Número	Altura
-----mg/L-----					cm
P01	-	-	-	3,00 a	0,81 a
P02	-	0,5	-	2,80 ab	0,47 ab
P03	-	1,0	-	3,00 a	0,37 ab
P04	-	2,0	-	1,20 abc	0,16 ab
P05	-	0,5	0,25	2,40 abc	0,28 ab
P06	-	1,0	0,5	2,80 ab	0,16 ab
P07	-	2,0	1,0	0,40 bc	0,04 b
P08	0,5	-	-	2,20 abc	0,38 ab
P09	1,0	-	-	1,00 abc	0,18 ab
P10	2,0	-	-	1,60 abc	0,14 ab
P11	0,5	-	0,25	0,40 bc	0,42 ab
P12	1,0	-	0,5	0,40 bc	0,02 b
P13	2,0	-	1,0	0,00 c	0,00 b
<b>CV (%)</b>				<b>22,86</b>	<b>43,22</b>

<sup>(1)</sup>Médias acompanhadas de letras iguais nas colunas não diferem significativamente no nível de 5% pelo teste Tukey. Nota: TDZ = tiazurion, BAP = 6-benzilaminopurina, AIA = ácido 3-indolacético, CV = coeficiente de variação.

Lundergan & Janick (1979). O uso de citocinina estimula maior produção de partes aéreas, mas seu excesso é tóxico e caracteriza-se pela falta de alongamento das culturas e redução no tamanho das folhas (Grattapaglia & Machado, 1998). Este efeito tóxico pode ter ocorrido no tratamento P04, onde houve menor crescimento em altura da plântula.

A presença de TDZ isolado e/ou combinado com AIA ao meio de cultura MSM promoveu a formação de calo em 100% dos explantes, independentemente da concentração. Os tratamentos que não continham TDZ também induziram a formação de calo, porém em menor intensidade (Figura 1). A forte indução de calo nos tratamentos adicionados de TDZ pode estar relacionada ao fato de este apresentar uma forma de ação diferente de outras citocininas durante os processos de desdiferenciação e rediferenciação celular, como citam Kaneda et al. (1997),

e também ao acúmulo de auxinas e citocininas endógenas nos tecidos pela ação do TDZ (Murthy et al., 1995). A elevada taxa de formação de calo pelo TDZ também é mostrada em Alves et al. (2004) com segmentos do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

No ensaio de enraizamento, a utilização do meio MSM com 100% (E01) e com 50% (E06) da concentração dos sais, adicionados de ANA ou AIB (E02 a E10), não promoveu diferenças significativas no número médio de raízes (Tabela 2). A indução de raízes nos meios MSN e MSN 50% isentos de reguladores de crescimento foi no máximo de 20%, confirmando o papel da auxina na rizogênese. Os tratamentos que continham ANA, independentemente da concentração salina do meio de cultura, e aqueles com AIB em MSM induziram o enraizamento em mais de 80% dos explantes (dados não mostrados).

O efeito da redução da concen-

tração de sais para 50% do meio MSM, associado à presença de ANA na concentração de 0,5mg/L (E07), promoveu maior desenvolvimento das raízes em relação ao tratamento MSM 50% (E02). Todos os demais tratamentos, independentemente da concentração dos sais e da presença ou ausência de regulador de crescimento, não diferiram entre si quanto ao comprimento das raízes.

Várias espécies enraízam na presença de níveis muito baixos ou mesmo na ausência de auxinas no meio de cultura, como cita Anderson (1984). Porém, no presente trabalho, não houve resposta positiva na indução de raízes mediante a adição dos reguladores ANA e AIB (Figura 2).

Os resultados obtidos tanto em meio MSM quanto em meio MSM com 50% dos sais, adicionados de ANA e AIB, apresentaram o mesmo padrão de resposta tanto em relação ao número quanto em relação ao tamanho das raízes.

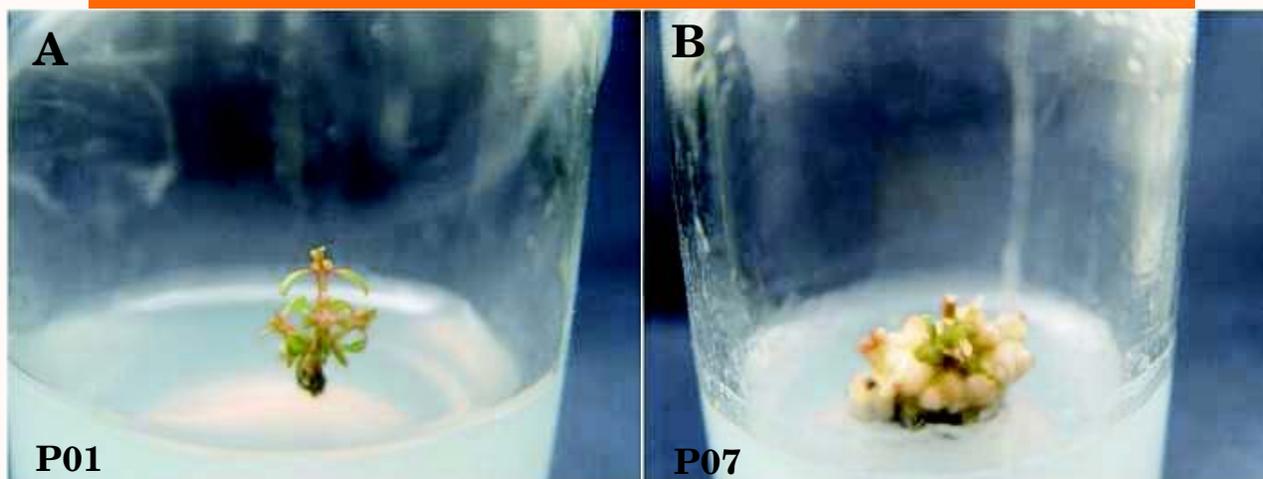


Figura 1. (A) Número de brotos e (B) formação de calo em segmentos nodais de *E. grandis* na fase de proliferação, após 60 dias de cultivo in vitro, em meio de cultura Murashige & Skoog (1962), modificado segundo Cheng (1977) (MSM). P01 = MSM, P07 = MSM + 2mg/L de TDZ. Itajaí, 2006

Tabela 2. Valores médios do número e comprimento das raízes em plântulas de *E. grandis* cultivadas em meio de cultura Murashige & Skoog (1962), modificado segundo Cheng (1977) (MSM), com e sem redução de sais, adicionado ou não de auxina, após 30 dias de cultivo in vitro. Itajaí, 2006

Tratamento	ANA	AIB	Raiz <sup>(1)</sup>	
			Número	Comprimento
	-----mg/L-----			cm
E01 MSM	-	-	0,20 ns	0,70 ab
E02 MSM	0,5	-	1,60 ns	1,22 ab
E03 MSM	1,0	-	5,00 ns	1,10 ab
E04 MSM	-	0,5	4,00 ns	2,18 ab
E05 MSM	-	1,0	4,00 ns	0,83 ab
E06 MSM 50%	-	-	0,00 ns	0,00 b
E07 MSM 50%	0,5	-	1,80 ns	2,76 a
E08 MSM 50%	1,0	-	3,40 ns	2,09 ab
E09 MSM 50%	-	0,5	0,80 ns	0,66 ab
E10 MSM 50%	-	1,0	5,00 ns	0,65 ab
<b>CV (%)</b>			<b>34,82</b>	<b>30,90</b>

<sup>(1)</sup>Médias acompanhadas de letras iguais nas colunas não diferem significativamente no nível de 5% pelo teste Tukey. Nota: ANA = ácido naftalenoacético, AIB = ácido indolbutírico, CV = coeficiente de variação, ns = não-significativo.



Figura 2. Aspecto geral da fase de enraizamento de plântulas de *E. grandis* após 30 dias de inoculação em meio de cultura Murashige & Skoog (1962), modificado segundo Cheng (1977) (MSM), adicionado de 1mg/L ANA (E04). Itajaí, 2006

O aumento das concentrações de ANA e AIB nos tratamentos não promoveu maior indução de primórdios radiculares em explantes de *E. grandis*, diferindo das afirmações de Gratapaglia & Machado (1998) sobre a rizogênese. Estes autores relacionam o genótipo, o nível endógeno de hormônios e o número de sinalizadores na célula como os fatores que afetam a resposta do explante aos reguladores de crescimento. Para segmentos de *E. grandis*, ANA e AIB foram eficientes na rizogênese. Rahim et al. (2003), porém, só conseguiram o enraizamento de segmentos de *Eucalyptus camaldulensis* em meio de cultura MS adicionado de 0,5mg/L de AIB, enquanto as mesmas concentrações de ANA e AIA não resultaram na indução de primórdios radiculares.

### Conclusões

A proliferação de brotos por organogênese direta em segmentos nodais é possível e independe da adição de citocininas ao meio de cultura.

O enraizamento das plântulas de eucalipto *in vitro* é possível, independentemente da concentração salina 50% ou 100% de MS e da presença das auxinas ANA e AIB no meio de cultura.

### Literatura citada

1. ALVES, E.C.S. de; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* w. Hill ex maiden x *E. urophylla* s. t. blake. *Revista Árvore*, Viçosa, MG, v. 28, n. 5, set./out. p. 643-653, 2004.
2. ANDERSON, W.C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of Rhododendron. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Mount Vernon, v. 109, p. 343-347, 1984.
3. CHENG, T.Y. Factors affecting adventitious bud formation on cotyledon culture of Douglas Fir. *Plant Science Letters*, Amsterdam, v. 9, p. 179-187, 1977.
4. FRANCLLET, A.; BOULAY, M. Micropropagation of frost resistant *Eucalyptus* clones. *Australian Forest Research*, Melbourne, v. 13, n. 1, p. 83-89, 1982.
5. GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.C.; BUSO, J.A.(Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-CBAB. 1998. v. 1, p. 183-260.
6. KANEDA, Y.; TABELI, Y.; NISHIMURA, S. et al. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Cell Reports*, New York, v. 17, p. 8-12, 1997.
7. LUNDERGAN, C.; JANICK, J. Low temperature storage of *in vitro* apple shoots. *HortScience*, Alexandria, v. 14, p. 514, 1979.
8. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised Medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
9. MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. TDZ-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulators levels and significance of cotyledons. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 94, p. 268-276, 1995.
10. RAHIN, F.; JABEEN, M.; ILAHI, I. Mass propagation in *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. *Asian Journal of Plant Sciences*, Sargodha, Faisalabad, v. 2, n. 2, p. 184-187, 2003.
11. REIS, G.G. dos; REIS, M.G.F. Fisiologia da brotação de eucalipto com ênfase nas suas relações hídricas. *Série Técnica I P E F*, Piracicaba, SP, v. 11, n. 30, p. 9-22, maio, 1997.
12. ROXO, C.A. Proposta de agenda do setor brasileiro de florestas plantadas. In: SEMINÁRIO "A QUESTÃO FLORESTAL E O DESENVOLVIMENTO", 2003, Rio de Janeiro, RJ. *Anais...* Rio de Janeiro: BNDSES, 2003.
13. TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
14. THORPE, T.A.; HARRY, I.S., KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. *Micropropagation-Technology and Application*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 310-312. ■