

Multiplicação e alongamento do híbrido *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden.

Brondani, Gilvano Ebling¹; Dutra, Leonardo Ferreira²; Grossi, Fernando³; Wendling, Ivar⁴; Azevedo, Jefferson Hornig⁵; Hansel, Fabrício Augusto⁶.

¹Eng. Florestal, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da UFPR, Av. Lothário Meissner, 3400, Jardim Botânico, CEP 80210-170, Curitiba (PR), Bolsista do CNPq, email: gebrondani@yahoo.com.br; ²Eng. Agrônomo, Dr., Pesquisador da Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira Km 111, CEP 83411-000, Colombo (PR) email: leo@cnpf.embrapa.br; ³Eng. Florestal, Dr., Professor do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da UFPR, Lothário Meissner, 3400, Jardim Botânico, CEP 80210-170, Curitiba (PR), email: f_grossi@ufpr.br; ⁴Eng. Florestal, D.S., Pesquisador da Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira Km 111, CEP 83411-000, Colombo (PR), email: ivar@cnpf.embrapa.br; ⁵Aluno de Graduação em Engenharia Florestal da UFPR, Av. Lothário Meissner, 3400, Jardim Botânico, CEP 80210-170, Curitiba (PR), email: jhaz@ufpr.br; ⁶Químico, Dr., Analista A da Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira Km 111, CEP 83411-000, Colombo (PR), email: hansel@cnpf.embrapa.br.

INTRODUÇÃO

As espécies *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus benthamii* apresentam tolerância a baixas temperaturas, fator limitante à expansão do cultivo de eucalipto na região sul do Brasil. Um híbrido interespecífico entre estes materiais possivelmente permitirá explorar-se as vantagens advindas deste cruzamento.

O desenvolvimento da clonagem em espécies puras e em híbridos interespecíficos do gênero *Eucalyptus* por meio do enraizamento de estacas foi o marco inicial da propagação vegetativa assumir posição de destaque e despertar o interesse das empresas e pesquisadores, com conseqüente busca de aprimoramento e inovações tecnológicas (TITON et al., 2003). Atualmente a técnica de miniestaquia é empregada na maioria das empresas florestais, sendo que para DEL PONTE et al. (2001), a principal aplicação desse método tem sido na produção de mudas clonais de materiais selecionados.

Da mesma forma, a micropropagação também está sendo empregada para multiplicação massal de indivíduos selecionados (XAVIER e COMÉRIO, 1996; WATT et al., 2003) com inúmeras vantagens e aplicações comprovadas, como a promoção de uniformidade dos plantios, adaptações dos clones específicos para determinados sítios e maximização da produção de madeira em quantidade e qualidade desejáveis para determinados fins, em comparação com plantios oriundos de mudas produzidas por sementes (XAVIER e COMÉRIO, 1996). Além disso, proporciona a manutenção das características favoráveis evitando a variabilidade encontrada em árvores obtidas a partir de sementes (HIGASHI et al., 2000).

Na micropropagação de espécies lenhosas, as citocininas são indispensáveis para a quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares, sendo o tipo de citocinina e a sua concentração os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. As concentrações de citocininas para a multiplicação variam de 0,1 a 5,0 mg L⁻¹, em que as concentrações de auxina são freqüentemente baixas se comparadas com as das citocininas para manter um balanço auxina/citocinina menor que 1 na fase de proliferação de gemas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Como meio de multiplicação, para obter ao mesmo tempo culturas alongadas, tem sido utilizado o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com BAP (0,08 mg L⁻¹) e ANA (0,1 mg L⁻¹), sendo que repicagens sucessivas para novos meios de multiplicação devem ser feitas a cada 3 a 4 semanas (ALFENAS et al., 2004). Entretanto, devido a diferenças no comportamento das espécies, essas concentrações de reguladores de crescimento são variáveis.

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo testar diferentes concentrações de BAP e ANA na multiplicação e alongamento de híbridos de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii*.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se brotações do clone H12 do híbrido *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* oriundas de propágulos cultivados *in vitro* e subcultivadas duas vezes. Estas foram cultivadas em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) contendo 0,25 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0,01 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), 250 mg L⁻¹ de PVP-40, 30g L⁻¹ de sacarose, 6g L⁻¹ de ágar e pH 5,8.

Na multiplicação, explantes de aproximadamente 0,5 mm e contendo uma a duas gemas, foram inoculados em frascos de 5 cm x 7 cm, contendo 40mL do meio de cultura ½ MS suplementado com 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ de ANA. Aos 30 dias procedeu-se a troca do meio de cultura e aos 30 e 60 dias de cultivo foi avaliado o número de gemas formadas por explante. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições e 4 explantes por repetição.

Visando o alongamento das brotações, tufos do clone H12 contendo de 10 a 20 gemas obtidas na fase de multiplicação foram inoculados em frascos (5 cm x 7 cm) contendo 20mL do meio de cultura ½ MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹ de ANA e 0,05 mg L⁻¹ de BAP. Aos 30 dias procedeu-se a troca do meio de cultura e aos 30 e 60 dias avaliou-se o número de brotações alongadas e o comprimento total das mesmas por explante. Consideraram-se brotações alongadas as que apresentaram comprimento acima de 0,8 cm. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições e 4 explantes por repetição.

Em ambos os ensaios, o meio de cultura foi acrescido de 250mg L⁻¹ de PVP-40, 30g L⁻¹ de sacarose, 6g L⁻¹ de ágar e pH 5,8. Adicionou-se o ágar após a correção do pH do meio nutritivo e então este foi autoclavado a temperatura de 121 °C (1,0 kgf cm⁻²) durante 20 minutos. Os explantes foram cultivados em sala de incubação com temperatura mantida entre 26°C (±2°C), fotoperíodo de 16 horas luz e luminosidade de 84µmol m⁻² s⁻¹.

Os dados foram submetidos a análise de variância e analisados por regressão polinomial, a 5% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na transferência do meio de cultura, aos 30 dias, o ponto correspondente a maior produção de gemas ficou em torno de 0,31 mg L⁻¹ de BAP produzindo 6,9 gemas por explante do clone H12, enquanto aos 60 dias, o ponto de maior produção de gemas foi de 0,30 mg L⁻¹ de BAP correspondendo a uma estimativa de produção de gemas axilares de 20,2 gemas por explante (Figura 1).

Concentrações de BAP acima de 0,75 mg L⁻¹ não resultaram em ganhos quanto a proliferação de gemas, sendo que na concentração de 1 mg L⁻¹ de BAP ocorreu sintomas de hiperhidricidade seguido de oxidação dos explantes. Além disso, segundo ALFENAS et al. (2004) concentrações elevadas de BAP podem propiciar o acúmulo desse regulador de crescimento nos tecidos e prejudicar o posterior enraizamento das brotações.

Na fase de alongamento das brotações do clone H12, verifica-se que aos 60 dias obteve-se 3,8 brotos alongados por tufo na presença de 0,49 mg L⁻¹ de ANA (Figura 5A). Na concentração de 1 mg L⁻¹ de ANA foi observado indução de calo, resultando em efeito negativo no alongamento das brotações. GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) afirmam que concentrações excessivas de auxina podem favorecer demasiadamente o enraizamento ou formação de calo.

Embora aos 60 dias o comprimento das brotações tenha sido maior do que aos 30 dias, não houve diferença entre as concentrações de ANA, sendo os valores médios compreendidos entre 2,4 e 1,1 cm por broto, respectivamente.

Cabe ressaltar que na determinação de um protocolo de micropropagação, os esforços devem ser concentrados na otimização do balanço de citocinina e auxina, a fim de produzir partes aéreas suficientemente alongadas para permitir a passagem direta para o enraizamento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

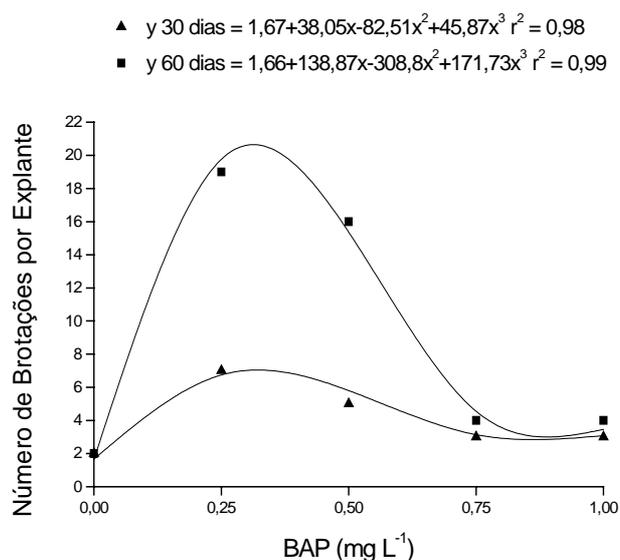


Figura 1 – Número médio de brotações por explante do clone H12 (*Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii*) aos 30 e 60 dias após a inoculação em função dos tratamentos de BAP.

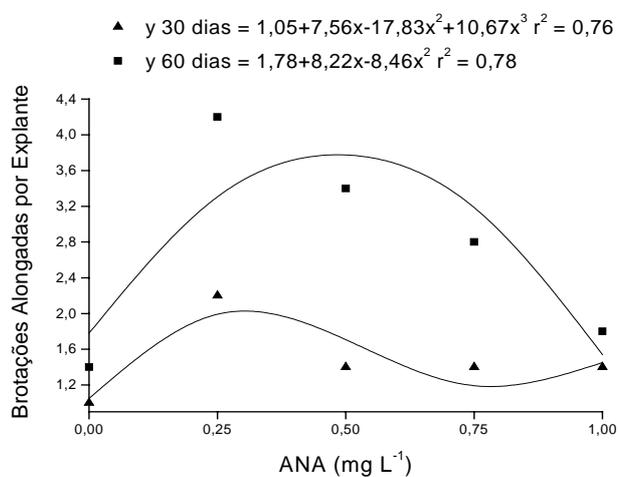


Figura 2 – Número médio de brotações alongadas por tufo, comprimento médio das brotações alongadas por tufo do clone H12 (*Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii*) aos 30 e 60 dias após a inoculação em função dos tratamentos de ANA.

CONCLUSÃO

A concentração de BAP que resultou em maior valor médio de proliferação de gemas axilares por explante do clone H12, tanto aos 30 (6,9 brotos) quanto aos 60 (20,2 brotos) dias após a inoculação, foi estimada em 0,30 mg L⁻¹ de BAP. Em relação à fase de alongamento das brotações, a concentração de 0,49 mg L⁻¹ de ANA promoveu o maior número de brotações alongadas, cerca de 4 por explante, com comprimento médio de 2,4 cm aos 60 dias após a inoculação de explantes de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. de. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442 p.

DEL PONTE, E. M.; MATTEI, V. L.; PETERS, J. A.; ASSIS, T. F. de. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPQ, 1998. p. 183-260.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; GONÇALVES, A. N. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. São Paulo: ESALQ - USP, 2000. 11 p. (**Circular Técnica-IPEF, 192**).

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.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; REIS, G. G. dos. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2003.

WATT, M. P.; BERJAK, P.; MAKHATHINI, A.; BLAKEWAY, F. *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 233-240. 2003.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.

PALAVRAS-CHAVE

Eucalipto; micropropagação; benzilaminopurina; ácido naftalenoacético; clonagem.