

Multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii*.

Lima, Bruno Henrique de¹; Dutra, Leonardo Ferreira²; Hansel, Fabrício Augusto³; Moritz, Aline⁴; Batista, Cristina do Rosário⁵.

¹Graduando de Biologia Bacharel (PUCPR), campos Curitiba, rua Imaculada Conceição, 1155 – Prado Velho, Curitiba, Paraná, fone (41) 3271-1515, Estagiário da Embrapa Florestas, Colombo, Paraná, email: bruno_primohl@hotmail.com; ²Eng. Agrônomo, Dr., Pesquisador da Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira Km 111, Cep 83411-000, Colombo, Paraná, email: leo@cnpf.embrapa.br; 3Químico, Dr., Analista A da Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira Km 111, CEP 83411-000, Colombo, Paraná, email: hansel@cnpf.embrapa.br; ⁴Graduanda de Biologia Bacharel (PUCPR), campos Curitiba, rua Imaculada Conceição, 1155 – Prado Velho, Curitiba, Paraná, fone (41) 3271-1515, Estagiária da Embrapa Florestas, Colombo, Paraná, email: alinemoritz6@hotmail.com; ⁵Graduanda de Biologia Bacharel (PUCPR), campos Curitiba, rua Imaculada Conceição, 1155 – Prado Velho, Curitiba, Paraná, fone (41) 3271-1515, Estagiária da Embrapa Florestas, Colombo, Paraná, email: cristinabatista3@hotmail.com.

INTRODUÇÃO

Dentre as espécies exóticas, as do gênero *Eucalyptus* demonstram seu potencial como matéria-prima de produtos florestais como celulose e madeira (KHUSPE et al., 1987). Entretanto, nem todas as espécies de *Eucalyptus* adaptam-se a climas com baixas temperaturas. Neste sentido, destaca-se o *E. Benthamii*.

De acordo com Paludzyszyn Filho et al. (2006), este é indicado para plantios em regiões com temperaturas mínimas absolutas de até -10°C, sob condições de aclimatação prévia por gradual abaixamento de temperatura na estação fria. Sob temperaturas abaixo desse limite, podem ocorrer atrasos no desenvolvimento em altura de plantas, porém são pouco expressivos (2%). Trata-se de uma espécie indicada para clima temperado ainda pouco estudada, porém, com indicações favoráveis de crescimento em países como África do Sul, China e Brasil. Plantios nos municípios paranaenses de Colombo e Guarapuava indicam alta tolerância a geadas e crescimento médio superior ao de *E. dunnii*. As primeiras observações indicam que a madeira tem maior aptidão para fins energéticos.

Das técnicas de clonagem, a micropropagação apresenta vantagens como a produção massal de genótipos selecionados, produção de plantas livres de patógenos, preservação de germoplasma *in vitro* e rejuvenescimento de material adulto (ELDRIDGE et al., 1994; HARTMANN et al., 1997). Com o sucesso no estabelecimento de plantas adultas *in vitro*, as fases seguintes da micropropagação, proliferação e alongamento, relacionam-se a estudos visando o enraizamento e produção de mudas.

Este trabalho teve por objetivo testar, a partir de ápices caulinares estabelecidos *in vitro*, um protocolo de proliferação e alongamento de *Eucalyptus benthamii*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os explantes foram retirados de brotações originárias de decepa de uma planta matriz de *Eucalyptus benthamii* com 17 anos de idade. Ápices caulinares foram desinfestados com hipoclorito de sódio (NaClO) à 2% durante 5 minutos + 5 gotas de tween-20/100 mL, seguida de tríplice lavagem com água destilada e autoclavada. Posteriormente, foram introduzidos em placas de Petri contendo 10 ml de meio de cultura WPM (McCown e Llyod, 1981), acrescido de 50 mg L⁻¹ de PVP 40000; 0,05 μmol L⁻¹ de ácido-1-naftaleno acético (ANA); 0,9 μmol L⁻¹ 6-benzil-aminopurina (BAP) e 20 g L⁻¹ de sacarose. O meio foi solidificado com 7g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

Após 30 dias de cultivo, correspondente ao estabelecimento, os explantes foram subcultivados oito vezes no meio de cultura, visando a proliferação, com intervalo de 28 dias entre os subcultivos. Nesta fase utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições e o número variável de explantes em cada subcultivo.

Após a multiplicação, procedeu-se o alongamento dos tufos, os quais foram inoculados em frascos contendo 20 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido de 50 mg L⁻¹ PVP 40000; 0,9 µmol L⁻¹ ANA e 0,2 µmol L⁻¹ BAP, com ou sem GA₃ (0,1 µmol L⁻¹) e 30 g L⁻¹ de sacarose. O meio foi solidificado com 7g L⁻¹ de ágar e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. Decorridos 30 dias foi realizada a avaliação dos explantes alongados, considerando-se aqueles entre 1 e 2 cm e maiores que 2 cm. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições com 8 tufos em cada tratamento.

Em todas as fases, os explantes permaneceram em sala de crescimento a 25± 2° C, 16 horas de fotoperíodo e intensidade luminosa de 85µmol m⁻² s⁻¹.

Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% para proliferação e a 10% para alongamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos primeiros subcultivos, o material praticamente não proliferou. Isso pode ter ocorrido devido a uma adaptação do explante ao meio, ou ainda o material não estar rejuvenescido o suficiente para emitir novas brotações. O aumento na produção de brotações foi verificado a partir do 6º subcultivo, com um declínio no 7º e posterior aumento no 8º (Figura 1). Embora este aumento a partir do 6º subcultivo, não se demonstrou significativamente diferente dos demais (p<0,05), este pode ser considerado alto, em valores absolutos, uma vez que nas primeiras proliferações o material praticamente não multiplicou, e a partir do 6º subcultivo o número de explantes praticamente dobrou, indicando o possível rejuvenescimento do material. O número de explantes contaminados e oxidados na etapa de proliferação foi baixo, 3 e 2%, respectivamente, demonstrando que os ápices caulinares são viáveis *in vitro* nas condições testadas, pois sobreviveram sete meses em meio de cultura.

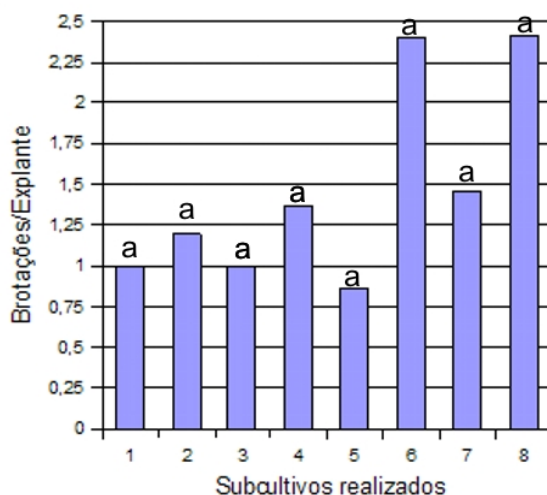


Figura 1. Média de brotações por explante nos subcultivos.

O tratamento sem GA₃ apresentou cerca de 10 gemas alongadas entre 1 e 2 cm, não diferindo do tratamento em que se utilizou GA₃, 14 gemas alongadas entre 1 e 2 cm. Entretanto, quando considerado as gemas com tamanho superior a 2 cm, o tratamento com GA₃ foi significativamente superior (p<0,1) ao tratamento sem GA₃, os quais produziram em média 15 e 1,5 gemas alongadas respectivamente (Figura 2).

Novos trabalhos envolvendo os testes de proliferação, alongamento e enraizamento *ex vitro*, estão sendo realizados com o objetivo de criar um protocolo de micropropagação para *Eucalyptus benthamii*.

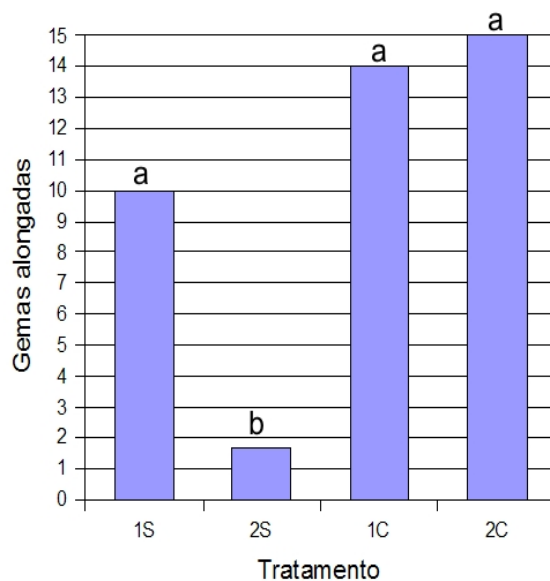


Figura 2. Número de Gemas alongadas; 1S (sem GA₃; 1 à 2 cm) e 2S (sem GA₃; > 2 cm), 1C (com GA₃; 1 à 2 cm) e 2C (com GA₃; > 2 cm). Médias significativamente diferentes a p<0,1 pelo teste de Tukey.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que é viável o subcultivo *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* durante um longo período, devido ao seu crescimento e seu baixo índice de contaminação. A relação citocinina/auxina usada foi efetiva na indução de brotações. Na fase de alongamento, a utilização de GA₃ é efetiva no crescimento de brotações maiores que 2 cm.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; WYK, G. V. *Eucalypt domestication and breeding*. Oxford: Clarendon, p. 228-246, 1994.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, JÚNIOR. F. T. and GENEVE, R. L. *Plant propagation: principle and practices*. 6. ed. Prentice-Hall, New Jersey, 1997.

HIGA, R. C. V. Aspectos ecológicos e silviculturais do *Eucalyptus benthamii* maiden et Cabbage. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo, n. 38, p. 121-123, Jan./Jun. 1999.

JOSHI, I.; BISHT, P.; SHARMA, V. K.; UNIYAL, D. P. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F₁ hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. X *E. Grandis* Hill ex Maiden). *Silvae Genetica*, v.52, n. 3-4, p. 110-113, 2003.

KHUSPE, S. S.; GUPTA, P. K.; KULKARNI, D. K.; MEHTA, V. and MASCARENHAS, A F. Increased biomass production by *Eucalyptus*. *Can J For Res* 17, p. 1361-1363, 1987.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Kopenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; Santos, P.E.T. dos; Ferreira, C.A. Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná. [recurso eletrônico]. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. **(Documentos/Embrapa Florestas, 129)**.

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

PALAVRAS-CHAVE

Ápice caulinar; propagação clonal; BAP; ANA e GA₃.