

## ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE CLONES HÍBRIDOS DE *Eucalyptus globulus*

### *IN VITRO* ESTABLISHMENT OF *Eucalyptus globulus* HYBRID CLONES

Silvano Rodrigues Borges<sup>1</sup> Aloisio Xavier<sup>2</sup> Leandro Silva de Oliveira<sup>3</sup> Aline Pontes Lopes<sup>4</sup>

Wagner Campos Otoni<sup>5</sup> Elizabete Keiko Takahashi<sup>6</sup> Lucas Amaral de Melo<sup>7</sup>

#### RESUMO

O presente estudo teve como objetivos avaliar o comportamento de clones de *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden x *Eucalyptus globulus* Labill e *Eucalyptus urophylla* S.T.Blake x *Eucalyptus globulus* Labill e o efeito de diferentes introduções *in vitro* (aos 30, 90 e 150 dias após a poda do ápice das minicepas) na fase de estabelecimento *in vitro*. As minicepas, fornecedoras dos explantes para a introdução *in vitro*, foram conduzidas em minijardim clonal semi-hidropônico. Segmentos nodais de 21 clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e 8 clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* foram coletados, desinfestados e inoculados em meio de cultura MS, suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Após 30 dias em cultura, foram feitas as avaliações e concluiu-se que houve variação entre clones, bem como entre introduções *in vitro*, para as variáveis estudadas, sendo possível o estabelecimento *in vitro* da maioria dos clones.

**Palavras-chave:** Micropropagação; introdução *in vitro*; clonagem.

#### ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the behavior of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* clones and the effect of different *in vitro* insertions (at 30, 90 and 150 days after pruning the donor plants) in the *in vitro* establishment phase. The mini-stump plants, explant providers for the *in vitro* introductions, were cultivated under an indoor semi-hydroponic clonal mini-hedging. Nodal segment explants of 21 *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* clones and eight *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* clones were harvested, disinfected and inoculated in an MS culture medium, supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> of BAP and 0.1 mg L<sup>-1</sup> of NAA. After 30 days in culture, evaluations were made and it was concluded that there were variations among the clones, as well as *in vitro* introductions, for the studied variables, where the *in vitro* establishment was possible for most clones.

**Keywords:** Micropropagation; *in vitro* introduction; cloning

1. Engenheiro Florestal, Msc., Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP 36570-000, Viçosa (MG). borgesilvano@yahoo.com.br
2. Engenheiro Florestal, Dr., Professor Associado, Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP 36570-000, Viçosa (MG). xavier@ufv.br
3. Engenheiro Florestal, Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP 36570-000, Viçosa (MG). leandrooliveira@yahoo.com.br
4. Estudante do curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP 36570-000, Viçosa (MG). alinepntes@gmail.com
5. Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Associado, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, Campus Universitário, CEP 36570-000, Viçosa (MG). wotoni@ufv.br
6. Bióloga, Dr., Pesquisadora, Celulose Nipo-Brasileira S/A – CENIBRA, Rod. de ligação BR-381 a Belo Oriente, km 3, Caixa Postal 100, CEP 35195-000, Belo Oriente (MG). elizabete.takahashi@cenibra.com.br
7. Engenheiro Florestal, Msc., Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras (MG). samelinho@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 05/10/2009 e aceito em 21/06/2011

## INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus globulus* e seus híbridos são de grande interesse para o setor de celulose e papel, devido às características químicas, físicas e anatômicas da madeira de excelente qualidade para tal objetivo, notadamente alto rendimento em celulose e baixo teor de lignina (CARDOSO, 2002; ROSA, 2003; ALFENAS et al., 2004; XAVIER et al., 2007).

A micropropagação apresenta-se como técnica promissora para viabilizar a clonagem massal de híbridos de *Eucalyptus globulus*, os quais apresentam dificuldades de enraizamento pela propagação por estaquia, principalmente no que envolve material adulto (ALFENAS et al., 2004; ASSIS et al., 2004). Na propagação clonal de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* e seus híbridos, a micropropagação pela proliferação de gemas axilares, tem sido utilizada com êxito no rejuvenescimento de clones selecionados, visando à melhoria do enraizamento de estacas no processo de produção de mudas (TITON, 2001; ASSIS et al., 2004; XAVIER et al., 2009).

O sucesso de um protocolo de micropropagação depende claramente da etapa de estabelecimento *in vitro*. Isso, porque as etapas seguintes de multiplicação e posterior transferência para condições *ex vitro* só podem ser executadas após o estabelecimento de culturas assépticas e com bom vigor vegetativo (GEORGE e DEBERGH, 2008).

O estabelecimento *in vitro* inicia-se com o manejo das plantas matrizes e a seleção dos explantes mais adequados para a micropropagação e termina com a obtenção de uma cultura livre de contaminantes e suficientemente adaptada às condições *in vitro* (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Nessa fase, a oxidação fenólica (SHARMA e RAMAMURTHY, 2000), a contaminação por fungos e bactérias e a recalitrância de alguns materiais genéticos têm sido os principais problemas encontrados (GEORGE, 2008).

Uma série de fatores influencia o sucesso da micropropagação, como o genótipo, o estado fisiológico da planta matriz, seleção, coleta e tipo de explante, a assepsia utilizada, meio de cultura (nutrientes, vitaminas, carboidratos, dentre outros), concentrações e tipos de reguladores de crescimento, condições de incubação (fotoperíodo, irradiância e temperatura) e habilidade do operador (HARTMANN et al., 2002;

GEORGE e DEBERGH, 2008).

O estado fisiológico da planta matriz tem grande influência no posterior comportamento das culturas *in vitro*. Plantas bem nutridas, sem sintomas de deficiência nutricional ou hídrica, em geral, fornecem explantes melhores. Outro aspecto refere-se à condição fitossanitária das plantas matrizes, pois determinará a facilidade em descontaminar o explante durante o isolamento, principalmente quanto à contaminação endógena (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Os resultados obtidos durante todo o processo de micropropagação, principalmente na iniciação das culturas, são diretamente influenciados pelo genótipo, sendo este, um dos fatores mais limitantes no sucesso da propagação *in vitro*. Isto se deve à especificidade das espécies e clones, quanto ao meio de cultura e condições ambientais, controladas por fatores genéticos (GAHAN e GEORGE, 2008). Dessa forma, ao se trabalhar com novos genótipos é necessário avaliar a resposta desses materiais ao cultivo *in vitro* e, posteriormente, fazer os ajustes necessários para otimizar o processo de micropropagação.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivos avaliar o efeito de diferentes introduções *in vitro* e o comportamento de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* na fase de estabelecimento *in vitro* pela técnica de micropropagação por gemas axilares.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Fontes de explantes

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa – UFV, localizado no município de Viçosa, Minas Gerais.

O material utilizado para obtenção dos explantes foi proveniente de minicepas de 21 clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e 8 clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus*, oriundos da empresa Celulose Nipo-Brasileira - Cenibra, localizada no município de Belo Oriente, Minas Gerais. Os clones utilizados nos experimentos originaram-se do programa de melhoramento genético da empresa Cenibra e foram gerados a partir de cruzamentos utilizando pólenes de *Eucalyptus globulus*, provenientes do Instituto Raiz,

em Portugal, e como genitores femininos, matrizes superiores de *Eucalyptus grandis* ou *Eucalyptus urophylla* da própria empresa (Tabela 1).

Os clones foram selecionados em testes de progênie híbrida avaliando-se as características silviculturais (DAP – diâmetro a altura do peito, altura, forma, dentre outras) aos três anos de idade. Nessa idade, foram produzidas mudas pelo processo de estaquia convencional para multiplicação do

TABELA 1: Clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* e seus genitores femininos e masculinos.

TABLE 1: *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* clones and their female and male parents.

Clones	Genitor Feminino	Genitor Masculino
	<i>Eucalyptus urophylla</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
C01	U03	G02
C02	U10	G07
C03	U02	G09
C04	U09	G07
C05	U01	G02
C06	U10	G04
C07	U09	G06
C08	U05	G06
C09	U04	G09
C10	U02	G02
C11	U04	G07
C12	U08	G09
C14	U06	G10
C15	U05	G09
C16	U14	G07
C17	U13	G08
C18	U08	G03
C19	U12	G02
C20	U04	G03
C21	U13	G10
C22	U11	G01

Clones	Genitor Feminino	Genitor Masculino
	<i>Eucalyptus grandis</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
C23	M16	G07
C24	M16	G04
C25	M16	G10
C26	M17	G07
C27	M19	G02
C28	M15	G06
C29	M18	G02
C30	M18	G11

material vegetativo, as quais foram conduzidas como minicepas em minijardim clonal, sob sistema semi-hidropônico de canaletão de areia, no Viveiro de Pesquisas Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa.

As minicepas foram conduzidas em casa de vegetação com as laterais abertas e coberta com plástico transparente de polietileno. As plantas receberam solução nutritiva por gotejamento, aplicada quatro vezes ao dia, numa vazão total diária de 4 L m<sup>-2</sup>. A solução nutritiva foi composta de nitrato de cálcio (0,920 g L<sup>-1</sup>), cloreto de potássio (0,240 g L<sup>-1</sup>), nitrato de potássio (0,140 g L<sup>-1</sup>), monoamônio fosfato (0,096 g L<sup>-1</sup>), sulfato de magnésio (0,364 g L<sup>-1</sup>), hidroferro (40,0 mg L<sup>-1</sup>), ácido bórico (2,800 mg L<sup>-1</sup>), sulfato de zinco (0,480 mg L<sup>-1</sup>), sulfato de manganês (1,120 mg L<sup>-1</sup>), sulfato de cobre (0,100 mg L<sup>-1</sup>) e molibdato de sódio (0,040 mg L<sup>-1</sup>). A condutividade elétrica da solução nutritiva foi mantida em torno de 2,0 mS m<sup>-2</sup>.

### Coleta e preparo dos explantes

Dois dias antes da coleta das brotações dos clones, foi aplicada uma mistura de fungicida Orthocide 500® (Captan 50 % como princípio ativo) a 2,4 g L<sup>-1</sup> e óleo mineral Assist® a 10 mL L<sup>-1</sup>, conforme recomendações de Alfenas et al. (2004). As brotações utilizadas (Figura 1A) foram provenientes da primeira coleta (primeira introdução), terceira coleta (segunda introdução) e quinta coleta (terceira introdução), correspondendo a 30, 90 e 150 dias após a poda do ápice das minicepas, respectivamente. Segmentos nodais, medindo entre 3 e 4 cm, foram coletados retirando-se as folhas do terceiro e quarto nós (comumente dotados de um par de gemas axilares), a partir do ápice das brotações (Figura 1B). Posteriormente, os explantes foram imersos em água deionizada autoclavada e transportados ao laboratório de cultura de tecidos. Durante todo o processo, os equipamentos e materiais utilizados foram esterilizados com solução de álcool a 70 % (v/v).

### Introdução *in vitro*

Os segmentos nodais foram lavados cinco vezes em água corrente e imersos em solução fungicida contendo 2,4 g L<sup>-1</sup> de Orthocide 500® (Captan 50 % como p. a.) durante 15 minutos. Posteriormente, foram lavados cinco vezes em água desionizada autoclavada e imersos em solução de álcool a 70 % (v/v) por 30 segundos com agitação

constante, dentro da câmara de fluxo laminar horizontal. Em seguida, foram imersos em solução de NaOCl a 1 % (v/v) Clarix®, acrescida de Tween 20 (3 gotas/100 mL de solução) durante 15 minutos. Finalmente, os segmentos nodais foram lavados em água desionizada autoclavada, cinco vezes e os explantes preparados e inoculados verticalmente, sob condições assépticas, em tubos de ensaio de 15 cm x 2,5 cm, contendo 10 mL de meio de cultura.

O tempo desde a coleta dos explantes, em condições de campo, até a inoculação em meio de cultura foi inferior a três horas. Durante a coleta, o transporte e intervalos entre a desinfestação e inoculação, os explantes foram mantidos imersos em água deionizada autoclavada para evitar a desidratação.

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) adicionado de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina – Sigma Co.), 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma Co.), 100 mg L<sup>-1</sup> de mioinositol (Sigma Co.), 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP30 (Polivinilpirrolidona – Synth Ltda.), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Synth Ltda.) e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck S.A.). O meio de cultura foi preparado utilizando água deionizada e o pH ajustado para 5,8 ± 0,05 com NaOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>) e HCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>), antes da autoclavagem e da adição do ágar. A autoclavagem do meio de cultura

foi realizada à temperatura de 121 °C e pressão de aproximadamente 1 kgf cm<sup>-2</sup>, durante 15 minutos.

Após inoculação, os explantes foram mantidos durante sete dias no escuro, visando reduzir o processo de oxidação, em sala de cultura a 25 ± 2 °C e, posteriormente transferidos para fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de 80 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por tubos fluorescentes brancos frios (Philips TLTRS-75 110 W).

Foram utilizados dez clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e três clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* (Tabela 2) para realização de três introduções *in vitro* (aos 30, 90 e 150 dias após a primeira poda das minicepas). Nos demais clones, onze de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e cinco de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus*, realizou-se apenas uma introdução *in vitro*, aos 30 dias após a primeira poda das minicepas.

#### Condução e avaliações experimentais

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, compostas de parcelas com dez explantes, sendo os tratamentos constituídos de 21 clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e 8 clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus*.

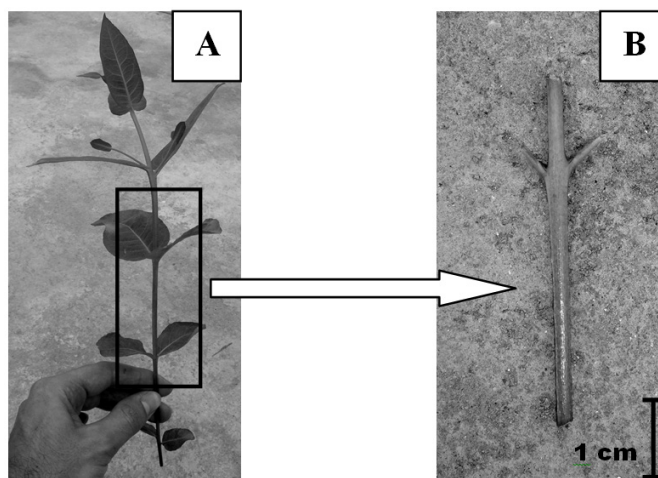


FIGURA 1: Obtenção de explantes para iniciação da micropropagação de clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus*: (A) brotação recém-coletada das minicepas, destacando a porção utilizada para obtenção dos explantes; (B) segmento nodal após preparo e padronização para introdução *in vitro*.

FIGURE 1: Obtainment of explants for starting micropropagation of *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* clones: (A) branch freshly taken from a mini-stump highlighting the region used in order to obtain the explants; (B) nodal segment after preparation and standardization for *in vitro* introduction.



TABELA 2: Número de introduções *in vitro* realizadas para os clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus*.TABLE 2: Number of *in vitro* introductions made for the *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* clones.

Híbrido	Nº de introduções	Clones
<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus globulus</i>	1	C02, C03, C05, C06, C07, C09, C10, C14, C19, C21 e C22
	3	C01, C04, C08, C11, C12, C15, C16, C17, C18 e C20
<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>Eucalyptus globulus</i>	1	C23, C25, C26, C27 e C30
	3	C24, C28 e C29

Aos 30 dias após a inoculação, foram avaliados a contaminação por fungos e bactérias, a oxidação, os explantes responsivos (explantes com brotações axilares maiores que 0,5 cm) e o número de brotações por explante responsivo. Os dados foram analisados por meio das médias e desvio padrão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na comparação entre híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus*, não foi observada tendência de melhores resultados para um cruzamento em relação ao outro, nas características estudadas.

A contaminação por bactérias teve uma amplitude de variação de 0 % (clone C28) a 72,5 % (clones C16, C17 e C19), sendo superior a 30 % para a maioria dos clones (Figura 2). Embora a contaminação por bactérias endógenas tenha sido alta para a maioria dos clones, ela não afetou a emissão de brotações axilares, uma vez que foi possível obter brotações viáveis em explantes com contaminação bacteriana. Por outro lado, a contaminação por fungos e a oxidação dos explantes afetaram negativamente a emissão de brotações axilares, pois causaram a morte dos explantes.

As contaminações por fungos ocorreram em menor proporção em relação às contaminações por bactérias, sendo ausentes nos clones C04, C16, C17 e C29 na primeira introdução *in vitro* e, também no clone C27, o qual teve apenas uma introdução (Figura 3). Na segunda introdução *in vitro*, apenas no clone C11 não foi observado o desenvolvimento de fungos, enquanto na terceira introdução todos os clones apresentaram alguns explantes contaminados (Figura 3C e 3D). O maior

percentual de contaminação fúngica foi de 58,3 % (clone C28) na segunda introdução, sendo que na maioria dos clones estes valores foram inferiores a 20 %.

Brondani et al. (2009) observaram baixa contaminação por bactérias (inferior a 9 %) e alta contaminação por fungos (41,3 %) no estabelecimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunii*, concluindo que a contaminação fúngica foi o fator que causou a maior perda de material nessa fase da micropropagação. Da mesma forma, Almeida et al. (2008) também obtiveram baixa contaminação por bactérias (inferior a 20 %) e alta contaminação por fungos (superior a 25 %) no estabelecimento *in vitro* de *Eucalyptus dunii*, diferindo dos resultados obtidos no presente estudo.

Ao comparar as três introduções *in vitro*, observa-se tendência de aumento na contaminação por fungos e bactérias na segunda e terceira introdução, com algumas exceções (Figuras 2C, 2D, 3C e 3D). Isso pode estar associado às condições ambientais, bem como às superfícies cortadas deixadas nas plantas matrizes, quando das podas sucessivas, para coleta do material propagativo, o que pode ter facilitado a contaminação endógena dos tecidos por micro-organismos. Sharma e Ramamurthy (2000) observaram aumento na contaminação de explantes coletados em épocas mais quentes do ano, chegando a comprometer o estabelecimento *in vitro* de *Eucalyptus tereticornis* nesse período.

Em relação à oxidação fenólica dos explantes, observou-se um comportamento variado, tanto entre clones, quanto entre introduções *in vitro*, sendo que a maioria dos clones apresentou oxidação inferior a 30 % (Figura 4). O valor máximo de explantes oxidados foi observado no

clone C29 na segunda introdução, com média de 56,3 %. Nenhuma tendência foi observada entre as introduções *in vitro*, sendo que, de modo geral, os valores foram bem próximos para um mesmo clone (Figura 4C e 4D).

Vários clones não apresentaram oxidação ou esta ocorreu em baixa intensidade. Esses resultados estão próximos aos encontrados por Brondani et al. (2009), que obtiveram oxidação fenólica inferior a 6 % dos explantes, no estabelecimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunii*.

A oxidação fenólica tem sido um problema

associado com a micropropagação de espécies lenhosas, sendo relatada em diversos trabalhos (SHARMA e RAMAMURTHY, 2000; ROCHA, 2005; CYSNE, 2006; PINTO et al., 2008; SILVA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008; BRONDANI et al., 2009). Essa ocorre pelo corte que danifica as células dos tecidos, promovendo a liberação de compostos fenólicos precursores da síntese de lignina, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000), podendo levar à morte dos tecidos.

Em relação ao processo de indução de

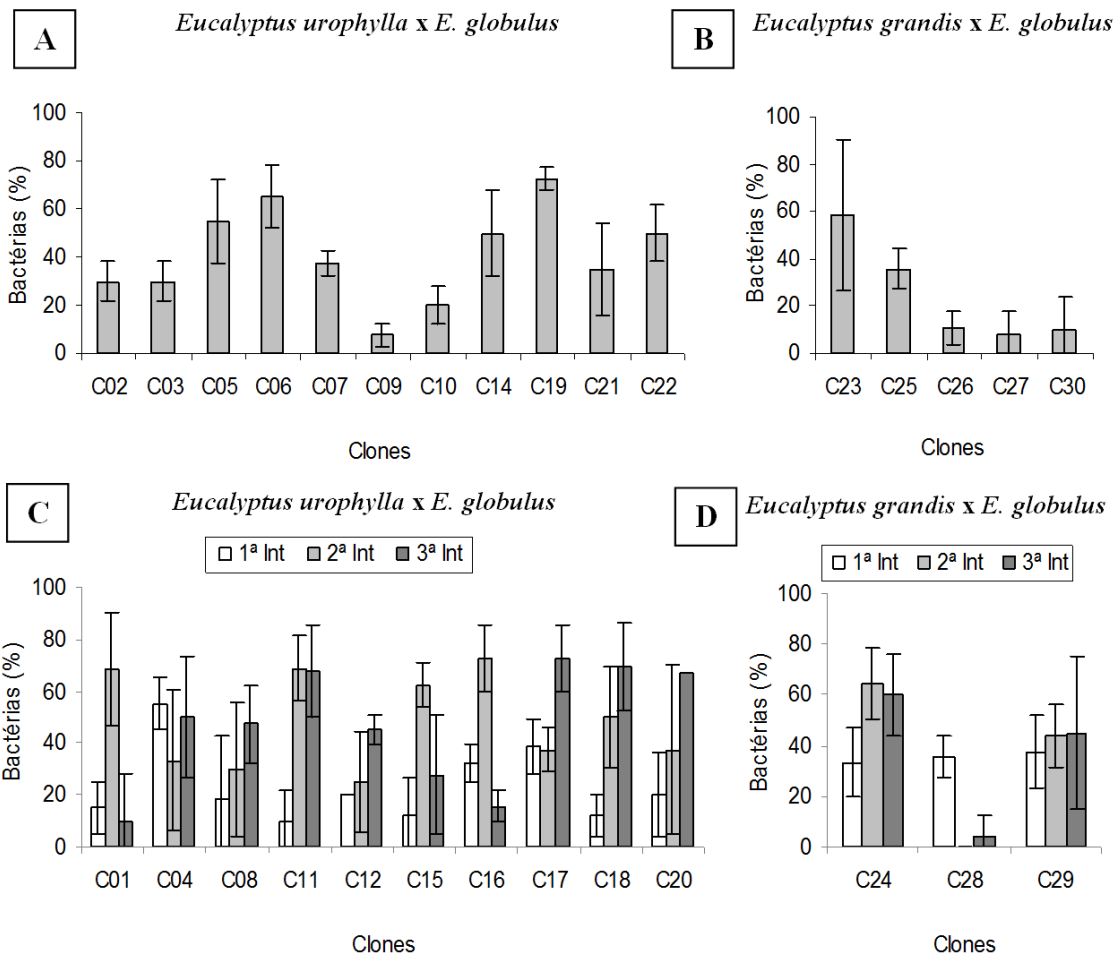


FIGURA 2: Média de explantes contaminados com bactérias em clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* com uma (A e B) e três (C e D) introduções *in vitro* (Int – 30, 90 e 120 dias após a primeira poda das minicepas), aos 30 dias após a inoculação. Barras verticais indicam o desvio padrão das médias (n = 20).

FIGURE 2: Mean values of bacterial contamination of explants of *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* clones with one (A and B) and three (C and D) *in vitro* introductions (Int – 30, 90 and 120 days after the first cut of the mini-stumps), 30 days after inoculation of the plant material. Vertical bars indicate the standard deviation of the means (n= 20).

brotações, aos 30 dias após a inoculação, exceto os clones C15 (na primeira introdução) e C25, todos os demais apresentaram brotações aptas a serem transferidas para a etapa de multiplicação *in vitro*. Altos percentuais de explantes com brotações foram obtidos para alguns clones, sendo que o clone C14 foi o mais responsivo com 95 % (Figura 5). Uma pequena tendência de aumento na resposta dos explantes pode ser observada na segunda e terceira introdução para a maioria dos clones (Figura 5C e 5D).

Alguns clones apresentaram altas taxas

de explantes sem resposta à indução de brotações. Os valores médios de explantes sem resposta entre clones variaram de 0 % (clones C10, C14 e C23) a 80 % (clones C19 e C15, na primeira introdução), apesar de os explantes se manterem vivos, observado pela manutenção da coloração verde dos explantes (ERIG e SCHUCH, 2005).

De acordo com Sharma e Ramamurthy (2000) para o sucesso da micropropagação é necessário que apenas alguns explantes emitam brotações livres de contaminação. No entanto, quando se necessita de grande quantidade de material

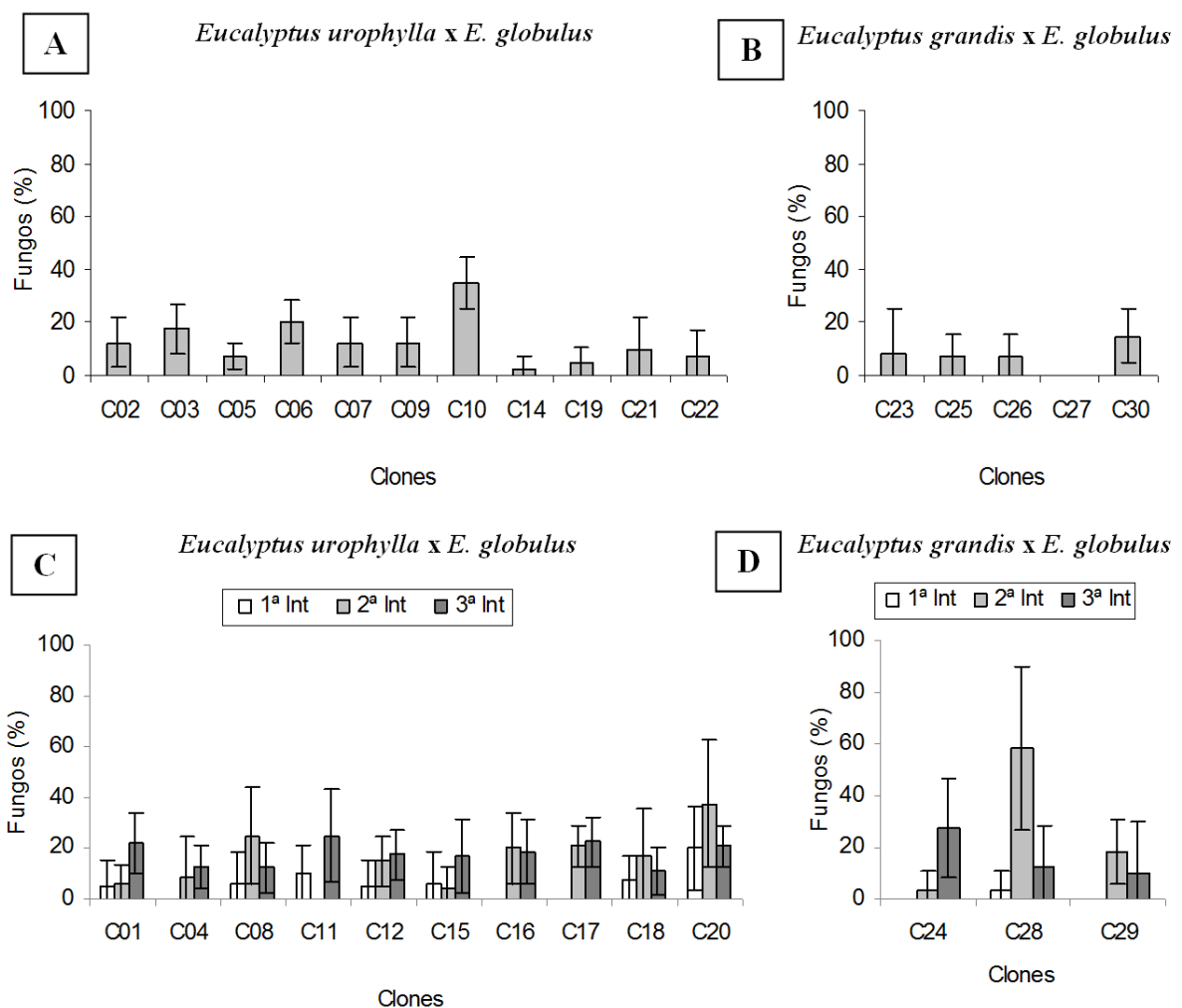


FIGURA 3: Média de explantes contaminados com fungos em clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* com uma (A e B) e três (C e D) introduções *in vitro* (Int – 30, 90 e 120 dias após a primeira poda das minicepas), aos 30 dias após a inoculação. Barras verticais indicam o desvio padrão das médias (n = 20).

FIGURE 3: Mean values of fungal contamination of explants of *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* clones with one (A and B) and three (C and D) *in vitro* introductions (Int – 30, 90 and 120 days after the first cut of the mini-stumps), 30 days after inoculation of the plant material. Vertical bars indicate the standard deviation of the means (n= 20).

micropropagado, maiores taxas de explantes com brotações podem ser necessárias para aumentar rapidamente a quantidade de material produzido.

Gomes e Canhoto (2003) obtiveram 10 % de explantes com brotações para segmentos nodais de *Eucalyptus nitens*, atribuindo a baixa indução de brotações ao alto nível de contaminação, que foi superior a 50 %. Por outro lado, Kapoor e Chauhan (1992) observaram 72 % de explantes responsivos em um híbrido de *Eucalyptus torelliana* x *Eucalyptus citriodora*, e Yang et al. (1995) obtiveram até 100 % de explantes com brotações em *Eucalyptus grandis*

x *Eucalyptus urophylla*. Dessa forma, observa-se que resultados variados, para explantes responsivos na fase de estabelecimento *in vitro*, são obtidos em função do material vegetal e das condições de cultivo utilizadas.

Seguindo o mesmo padrão das demais características estudadas, o número médio de brotações por explante variou entre clones e entre introduções *in vitro* (Figura 6). O clone C16 apresentou o valor médio máximo de 3,7 brotos por explante. De modo geral, observou-se tendência de aumento na produção de brotos na segunda e

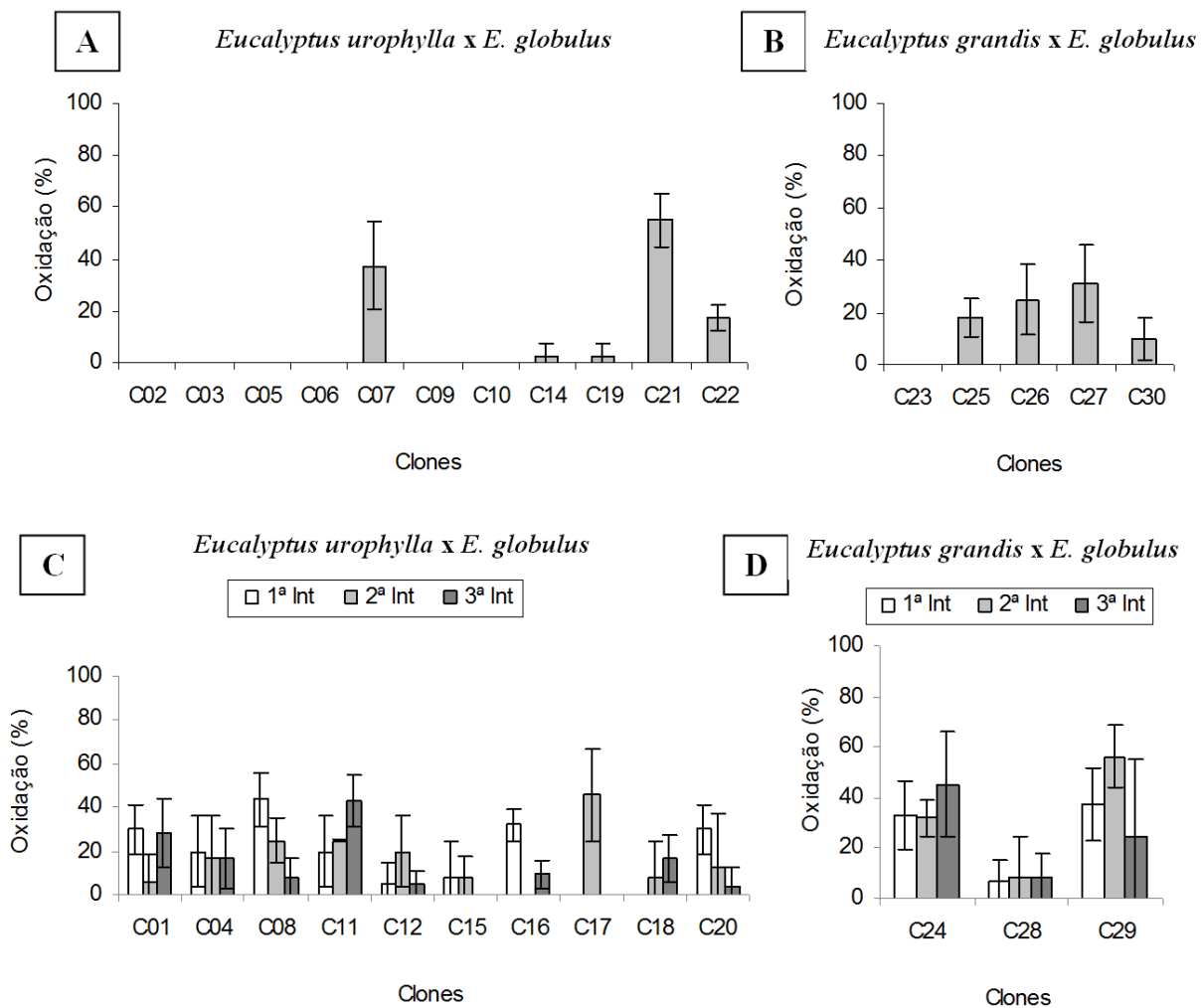


FIGURA 4: Média de explantes oxidados em clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* com uma (A e B) e três (C e D) introduções *in vitro* (Int – 30, 90 e 120 dias após a primeira poda das minicepas), aos 30 dias após a inoculação. Barras verticais indicam o desvio padrão das médias (n = 20).

FIGURE 4: Mean values of oxidized explants of *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* clones with one (A and B) and three (C and D) *in vitro* introductions (Int – 30, 90 and 120 days after the first cut of the mini-stumps), 30 days after inoculation of the plant material. Vertical bars indicate the standard deviation of the means (n= 20).



terceira introdução, com algumas exceções (Figura 6C e 6D).

Em termos gerais, a formação das primeiras brotações axilares iniciou-se aos sete dias após a inoculação em meio de cultura de indução, estando aptas para transferência para o primeiro subcultivo, em meio de multiplicação, a partir do 25º dia após a inoculação.

Sharma e Ramamurthy (2000), estudando o estabelecimento *in vitro* de *Eucalyptus tereticornis*, também encontraram grandes variações na contaminação por fungos e bactérias, oxidação e produção de brotos entre os meses do ano, bem

como entre os genótipos estudados.

Na definição da posição de coleta dos explantes na planta matriz, foi observado, em testes preliminares, que explantes mais tenros, coletados de porções mais apicais dos ramos (primeiro e segundo par de folhas), apresentaram alta oxidação, já detectada durante o processo de desinfestação. Da mesma forma, explantes coletados de partes mais lignificadas dos ramos (após o quarto par de folhas) não apresentaram emissão satisfatória de brotações, sendo observada grande formação de calos na base dos explantes (parte inserida no meio de cultura) com subsequente escurecimento do meio de cultura.

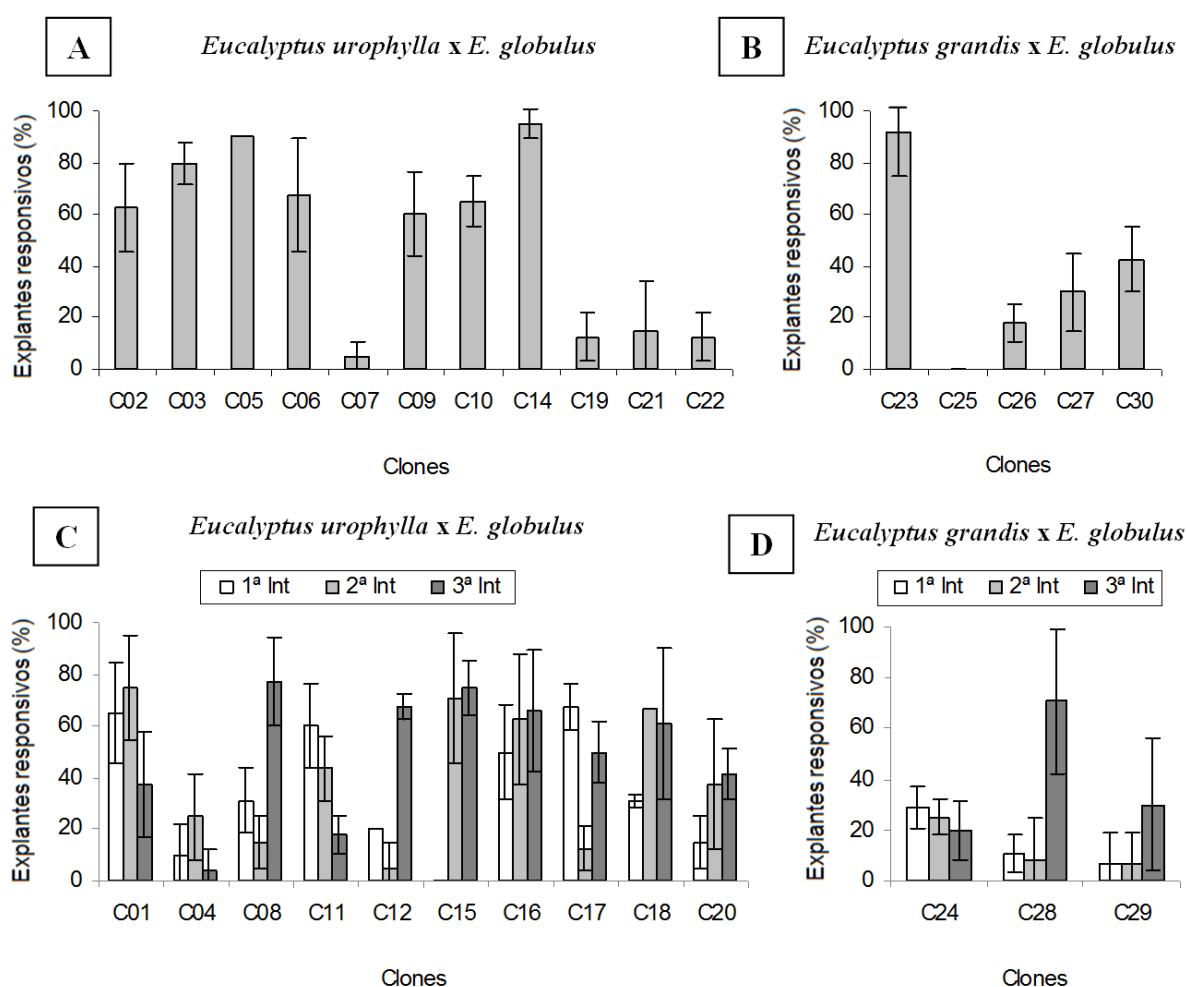


FIGURA 5: Média de explantes responsivos em clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* com uma (A e B) e três (C e D) introduções *in vitro* (Int – 30, 90 e 120 dias após a primeira poda das minicepas), aos 30 dias após a inoculação. Barras verticais indicam o desvio padrão das médias (n = 20).

FIGURE 5: Mean values of responsive explants of *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* clones with one (A and B) and three (C and D) *in vitro* introductions (Int – 30, 90 and 120 days after the first cut of the mini-stumps), 30 days after inoculation of the plant material. Vertical bars indicate the standard deviation of the means (n= 20).

O uso de explantes apicais pode ser necessário quando a contaminação endógena dos tecidos é muito alta, pois esses explantes apresentam menores taxas de contaminação, conforme observado por Gomes e Canhoto (2003). No entanto, esses explantes requerem cuidados adicionais no controle da oxidação fenólica.

No presente estudo, observou-se que há variação entre as introduções *in vitro* para a maioria dos clones nas características estudadas. Essas diferenças para um mesmo clone podem ser causadas por uma série de fatores relacionados às condições fisiológicas e fitossanitárias das minicepas

no momento da coleta dos explantes (HARTMANN et al., 2002; GEORGE e DEBERGH, 2008). Foi observado um aumento do vigor e número de brotações produzidas pelas minicepas na segunda e terceira coleta em relação à primeira. Isso pode ter sido promovido por alguns fatores como o revigoramento nutricional das plantas no canaletão sob fertirrigação diária e condições climáticas relativas à época do ano, dentre outros. Esse aumento no vigor poderia explicar, em parte, a tendência de aumento de explantes responsivos e número de brotações por explante na segunda e terceira introdução, pois, plantas em pleno crescimento

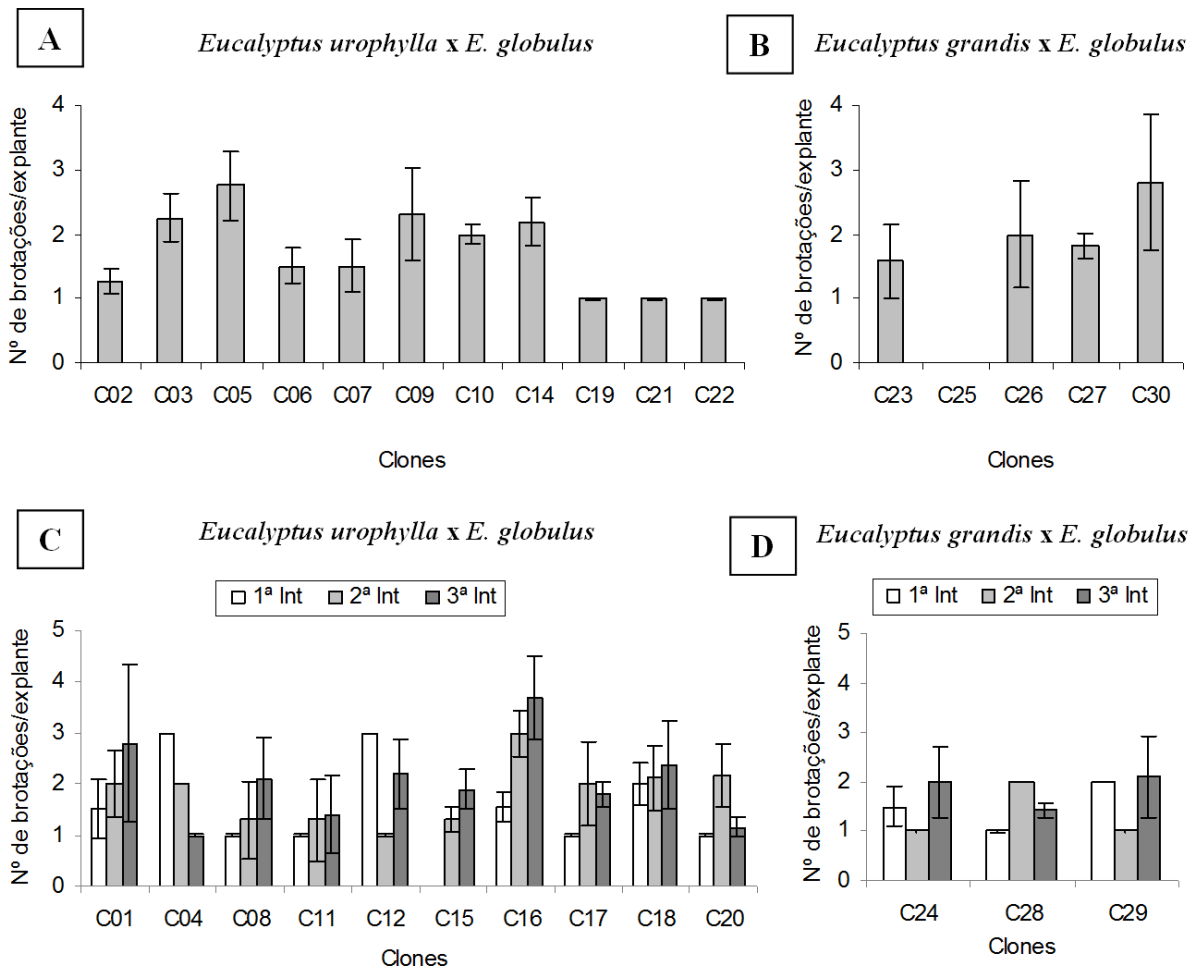


FIGURA 6: Número médio de brotações por explante responsivo em clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* com uma (A e B) e três (C e D) introduções *in vitro* (Int – 30, 90 e 120 dias após a primeira poda das minicepas), aos 30 dias após a inoculação. Barras verticais indicam o desvio padrão das médias (n = 20).

FIGURE 6: Mean values of number of shoots per responsive explant of *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* clones with one (A and B) and three (C and D) *in vitro* introductions (Int – 30, 90 and 120 days after the first cut of the mini-stumps), 30 days after inoculation of the plant material. Vertical bars indicate the standard deviation of the means (n= 20).

vegetativo, bem nutridas, sem deficiência nutricional ou hídrica são reconhecidamente as que fornecem os melhores explantes para iniciação da micropropagação.

## CONCLUSÕES

Os clones apresentam resposta genótipo específico para as variáveis estudadas, com a indução de brotações axilares variando de 0 a 95 %.

Na segunda e terceira introdução, há uma tendência de melhores resultados para explantes responsivos e número de brotações emitidas.

A contaminação dos explantes por bactérias e fungos e a oxidação, apesar de presente, não compromete o estabelecimento *in vitro*.

Em termos gerais, o protocolo utilizado de estabelecimento *in vitro* dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* foi satisfatório, com produção de brotações livres de contaminação por fungos e bactérias e aptas para as próximas fases da micropropagação.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsas de estudo e à empresa CENIBRA (Celulose Nipo-Brasileira S.A.) pelo apoio financeiro e disponibilização do material genético (clones).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.  
 ALMEIDA, J. R.; MARTINS, C. R.; DUTRA, L. F. Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* visando estabelecimento *in vitro*. **Revista da FZVA**, Uruguaina, v. 15, n. 1, p. 54-60, jan./jun. 2008.  
 ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Alli.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, jan./mar. 2000.  
 ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A. G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: WALTER, C.; CARSON, M. (Eds.). **Plantation forest biotechnology for the 21<sup>st</sup> century**. Kerala: Research Signpost, 2004. p.

303-333.

BRONDANI, G. E. et al. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 11-19, jan./fev. 2009.

CARDOSO, G. V. **Otimização do cozimento kraft para produção de celulose a partir de madeiras de *Eucalyptus globulus* com diferentes teores de lignina**. 2002. 147 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)–Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

CYSNE, J. R. B. **Propagação *in vitro* de *Moringa oleifera* L.** 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)–Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de Mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 6, n. 1-2, p. 91-96, 2005.

GAHAN, P. B.; GEORGE, E. F. Adventitious regeneration. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G.-J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 355-402.

GEORGE, E. F. Plant Tissue Culture Procedure - Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G.-J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 1-28.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G.-J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 29-64.

GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining gum). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, New York, v. 39, n. 3, p. 316-321, May/June. 2003.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.

KAPOOR, M. L.; CHAUHAN, M. S. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*E. Eucalyptus torelliana* F. V. Muell x *Eucalyptus*

- citriodora* Hook). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 41, n. 6, p. 305-307, Nov./Dec. 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, Mar. 1962.
- PINTO, G. et al. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, n. 1, p. 79-88, Oct. 2008.
- ROCHA, S. C. **Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de canjarana (*Cabralea canjerana*)**. 2005. 80 f. Dissertação (Mestrado em Botânica)—Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2005.
- ROSA, C. A. B. **Influência do teor de lignina da madeira de *Eucalyptus globulus* na produção e na qualidade da celulose Kraft**. 2003. 140 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)—Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.
- SHARMA, S. K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 5, p. 511-518, Apr. 2000.
- SILVA, L. C. et al. Efeito da iluminação e pré-lavagem das brotações de mirtilo cv. Florida no estabelecimento *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 1, p. 127-129, jan./mar. 2007. (Nota Técnica).
- TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia**. 2001. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal)—Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.
- XAVIER, A. A. et al. Resistência de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens* à ferrugem (*Puccinia psidii*). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 731-735, jul./ago. 2007.
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: UFV, 2009. 272 p.
- YANG, J.-C.; CHUNG, J.-D.; CHEN, Z.-Z. Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* and comparison of growth between micropropagated plantlets and rooted cuttings. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, n. 3-4, p. 170-173, Dec. 1995.