

ORGANOGENESE INDIRETA A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES E MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE BROTAÇÕES DE *Eucalyptus benthamii* X *Eucalyptus dunnii*¹

INDIRECT ORGANOGENESIS FROM LEAF EXPLANTS AND IN VITRO SHOOT MULTIPLICATION
OF *Eucalyptus benthamii* X *Eucalyptus dunnii*

Yohana de Oliveira-Cauduro² Laís Gomes Adamuchio³ Juliana Degenhardt-Goldbach⁴
João Carlos Bespalhok Filho⁵ Roberson Dibax⁶ Marguerite Quoirin⁷

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram avaliar diferentes meios de cultura na organogênese indireta e na multiplicação *in vitro* de brotos de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. Para organogênese, explantes foliares foram excisados no sentido transversal e cultivados *in vitro*, sendo os seguintes fatores testados: dois meios de cultura (MS N/2 e JADS) adicionados de 0,1 µM de ANA, duas concentrações de thidiazuron (0,1 e 0,5 µM) e presença ou não de PVP-40 (250 mg L⁻¹). Após 70 dias de cultivo foram avaliadas as porcentagens de explantes oxidados totalmente, formando calo, produzindo antocianina, formando gema, formando brotações e o número de brotações formadas por explante regenerando. No experimento de multiplicação, brotações isoladas foram cultivadas em meio MS, JADS e WPM, adicionados de 1,11 µM de BAP. Foram realizados quatro subcultivos a cada 28 dias e em cada subcultivo foram avaliados: a porcentagem de oxidação, de explantes apresentando clorose total ou parcial, massa fresca e número médio de brotos por explante. O meio de cultura MS N/2 suplementado com 0,1 µM de ANA, 0,5 µM de TDZ e PVP-40 promoveu a maior taxa de organogênese (8,3%). No meio de cultura MS com 1,11 µM de BAP, a taxa de multiplicação foi maior que nos outros meios, no primeiro e segundo subcultivos (9,28 e 9,24 por mês), não havendo diferença entre os três meios nos demais subcultivos.

Palavras-chave: regeneração; espécie lenhosa; regulador vegetal; meio de cultura.

ABSTRACT

The aims of this research were to evaluate different culture media for indirect organogenesis and shoot multiplication of *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. For organogenesis, leaf explants were used to test the following treatments: two culture media (MS N/2 and JADS) supplemented with 0.1 µM 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and thidiazuron (TDZ) (0.1 or 0.5 µM), with or without PVP-40 (250 mg L⁻¹). The percentage of oxidized explants, callus forming explants, explants with anthocyanin,

1 Trabalho desenvolvido com o apoio do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e da Embrapa Florestas.

2 Engenheira Agrônoma, Msc., Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Bairro Juvevê, CEP 80035-050, Curitiba (PR), Brasil. yohana.ufpr@hotmail.com

3 Acadêmica do Curso de Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Bairro Juvevê, CEP 80035-050, Curitiba (PR), Brasil. laisadamuchio@hotmail.com

4 Engenheira Agrônoma, Dr^a, Pesquisadora da Embrapa Florestas. Estrada da Ribeira, Km 111, Caixa Postal 319, CEP 83411-000, Colombo (PR), Brasil. juliana@cnpf.embrapa.br

5 Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, 1540, Bairro Juvevê, CEP 80035-050, Curitiba (PR), Brasil. bespa@ufpr.br

6 Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor da Universidade Federal da Fronteira Sul. Rua Oscar da Silva Guedes, 01, Vila Alberti, CEP 85301-170, Laranjeiras do Sul (PR), Brasil. roberson.dibax@uffs.edu.br

7 Engenheira Agrônoma, Dr^a, Professora do Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Caixa Postal 19031, CEP 81531-990, Curitiba (PR), Brasil. mquoirin@ufpr.br

buds, shoots and the shoot number per explant were evaluated. In the multiplication experiment, isolated shoots were cultivated in MS, JADS and WPM media, all supplemented with 1.11 μM BAP. Four subcultures were carried out every 28 days. In every subculture the explant oxidation, partial or total leaf chlorosis, fresh mass and mean number of shoot per explant were evaluated. The MS N/2 medium supplemented with 0.1 μM NAA and 0.5 μM TDZ promoted the highest rate of organogenesis (8.3%) and the culture media MS supplemented with 1.11 μM BAP the multiplication rate was higher than in the other media, in the first and the second subcultures (9.28 and 9.24, respectively), without differences between the three media in the following subcultures.

Keywords: regeneration; woody species; plant growth regulators; culture medium.

INTRODUÇÃO

A geada é um dos motivos que impedem a expansão da eucaliptocultura na Região Sul do Brasil, sobretudo na fase inicial do desenvolvimento, pois limita o cultivo de espécies economicamente interessantes. O melhoramento via transformação genética pode ser uma alternativa para minimizar os possíveis impactos negativos causados pelo meio ambiente, contrários à expansão da cultura, sendo a técnica dependente de metodologias eficientes para organogênese e micropropagação.

O híbrido *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* pode ser um material promissor para plantios em regiões frias e sujeitas à geada. Materiais oriundos da hibridação espontânea entre *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii* estão sendo estudados pela Embrapa Florestas (Colombo-PR) e vêm apresentando superioridade em relação aos progenitores quanto ao crescimento e tolerância à geada (PALUDZYSZYN FILHO et al., 2006). Até o presente momento existem poucos estudos relacionados à micropropagação desse híbrido (BRONDANI et al., 2009; BRONDANI et al., 2011); já estudos sobre a organogênese são inexistentes. Entretanto, há relatos sobre a micropropagação de outros híbridos, como *Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus camaldulensis* (BISHT et al., 1999), *Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus grandis* (JOSHI et al., 2003), *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* (GLOCKE et al., 2006) e *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (NETTO et al., 2006; ALCANTARA et al., 2011). Nos trabalhos encontrados (BRONDANI et al., 2009; BRONDANI et al., 2011) foram estudados o estabelecimento *in vitro*, a multiplicação e o alongamento de três clones de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, não sendo contemplada a organogênese. Com isso nota-se a carência de informações fundamentais para o melhoramento via transformação genética.

Com a aplicação dessa tecnologia, a inserção de diversos genes relacionados com a resistência do material a outras condições adversas poderiam ser explorados.

Na organogênese, a influência exercida pela composição dos meios de cultura tem sido estudada em várias espécies do gênero *Eucalyptus* (QUISEN et al., 2009). Esta influência pode variar em função da composição de macro e micronutrientes do meio de cultura, do uso de agentes antioxidantes, do balanço entre os reguladores de crescimento utilizados, dentre outros. Dibax et al. (2010a) estudaram a influência dos meios de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980) e JADS (CORREIA et al., 1995), adicionados de 2,7 μM de ANA e 4,44 μM de BAP, na organogênese em explantes cotiledonares de *Eucalyptus saligna*. Estes autores obtiveram maiores resultados na formação de brotações com a utilização dos meios MS e WPM, 57,5 e 55% respectivamente, demonstrando que o meio de cultura tem grande influência nessa fase. De maneira geral, grande parte dos trabalhos relata o uso de thidiazuron (TDZ) para a indução de calos a partir de diferentes tecidos vegetais, como, por exemplo, folhas (DIBAX et al., 2010b) e folhas cotiledonares (AZMI et al., 1997; NUGENT et al., 2001). Segundo Del Ponte et al. (2001), para a estimulação e proliferação de gemas axilares, o BAP tem sido o regulador de crescimento mais utilizado em meio de cultura, para espécies de *Eucalyptus* (SANKARA-RAO, 1998; TRINDADE et al., 1990; NICCOL et al., 1994). Diante disto, este trabalho objetivou identificar um meio de cultura favorável à organogênese indireta a partir de folhas de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* e verificar a influência de diferentes composições salinas do meio durante a fase de multiplicação dos brotos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Nos experimentos realizados no presente trabalho, o genótipo utilizado foi o clone 8 do híbrido *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, que foi selecionado pelo Programa de Melhoramento da Embrapa Florestas (Colombo-PR), introduzido *in vitro* e mantido em meio de cultura de multiplicação composto pelo meio MS adicionado de 1,11 µM de BAP.

Condições gerais de cultura

A cultura inicial foi mantida em frascos de vidro com 9 cm de altura e 6 cm de diâmetro, vedados com tampa de polipropileno, contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura. Esses mesmos frascos foram utilizados no experimento de multiplicação. As condições da sala de crescimento foram: luz fluorescente branca fria com irradiância de 20 µmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 2 °C. Após a instalação dos experimentos, as culturas permaneceram nas mesmas condições, exceto quando indicado.

Efeito de diferentes meios de cultura, do PVP e do TDZ na organogênese indireta

Folhas, com aproximadamente 0,5 cm de comprimento, de tufos mantidos em meio de multiplicação, na oitava subcultura, foram cortadas pela metade no sentido transversal e colocadas em placas de petri de forma aleatória quanto à face em contato com o meio de cultura. Foram utilizadas placas de 2 cm de altura e 10 cm de diâmetro, contendo aproximadamente 25 mL de meio de cultura e vedadas com filme PVC.

Os meios de cultura testados foram: MS N/2 (MURASHIGE e SKOOG, 1962) modificado, com redução de NH₄NO₃ e KNO₃ pela metade, e JADS (CORREIA et al., 1995) com vitaminas do mesmo meio, ambos contendo 0,1 µM de ácido naftaleno acético (ANA).

Além do fator meio de cultura, foi estudado o efeito da presença do antioxidante PVP-40 (250 mg L⁻¹) e de duas concentrações (0,1 e 0,5 µM) de thidiazuron (TDZ) no meio de cultura. O experimento foi delineado em esquema trifatorial (2 x 2 x 2) e os fatores analisados foram: dois meios de cultura (MS N/2 e JADS), presença ou não de

PVP-40 (250 mg L⁻¹) e duas concentrações de TDZ (0,1 e 0,5 µM). Cada tratamento apresentou seis repetições, sendo cada repetição composta por uma placa de petri contendo 10 explantes.

As culturas foram mantidas no escuro por 45 dias e transferidas para luz até os 70 dias, sendo que a cada 15 dias foram transferidas para placas com os mesmos meios de cultura dos tratamentos, porém, novos. Após 70 dias de cultivo, as variáveis analisadas foram: porcentagem de explantes oxidados, formando calo, produzindo antocianina, formando gema, formando brotações e o número de brotações formadas por explante regenerando.

O experimento foi repetido e os dados apresentados consistem na média dos dois ensaios.

Efeito de diferentes meios de cultura na multiplicação de brotações

Brotações, com aproximadamente 0,8 cm de altura contendo de uma a duas gemas cada, isoladas de tufos subcultivados 5 vezes no meio MS com 1,11 µM de BAP, foram cultivadas em três meios de cultura, MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), JADS (CORREIA et al., 1995) ou WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980), acrescidos de 1,11 µM de BAP, substâncias orgânicas específicas de cada meio e 30 mg L⁻¹ de sacarose. A cada 28 dias, as brotações foram subcultivadas para os mesmos meios de cultura, totalizando quatro subcultivos e as seguintes variáveis foram avaliadas: porcentagem de oxidação, de explantes apresentando clorose total ou parcial, massa fresca e número médio de brotos por explante.

Neste experimento, cada tratamento teve cinco repetições, sendo cada repetição composta por um frasco de cultivo contendo cinco brotações.

Delineamento experimental e análise estatística

Nos dois experimentos, o delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado. Primeiramente, foi aplicado um teste de análise de variância e, em seguida, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada utilizando o programa computacional ASSISTAT (SILVA e AZEVEDO, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito de diferentes meios de cultura, do PVP e do TDZ na organogênese indireta

A calogênese foi observada nos meios de cultura testados somente quando adicionados de 0,5 μM de TDZ (Figura 1), sendo a maior porcentagem de formação de calos (83,3%) encontrada no meio JADS com 0,5 μM de TDZ e sem PVP-40 (Tabela 1), embora diferente estatisticamente apenas do meio MS N/2 sem a presença do PVP-40 (53,3%). Percebe-se que a adição de 0,5 μM de TDZ nos dois meios de cultura foi importante para formação de calos na espécie estudada (Tabela 1). Houve diferenças significativas entre as duas concentrações de TDZ no meio MS N/2 para a porcentagem de oxidação, formação de gemas, formação de calos e brotos e para o número de brotos por explante (Tabela 1).

Em explantes foliares de *Eucalyptus saligna*, Dibax et al. (2010b) compararam três combinações de ANA e TDZ (0,1 μM ANA e 1,0 μM TDZ; 0,1 μM ANA e 1,5 μM TDZ; 0,1 μM ANA e 2,0 μM TDZ) no meio de cultura MS N/2 e encontraram maior porcentagem de formação de calos (73%) utilizando 0,1 μM de ANA e 1,0 μM de TDZ. No presente experimento, o tratamento com este meio e a metade desta concentração de TDZ (0,5 μM) permitiu a formação de calos em

55% dos explantes. Somente nesse meio de cultura observou-se a formação de gemas e brotações (Figuras 1C e 1D), sendo que a suplementação deste com PVP-40 permitiu a formação de gemas em 6,6% dos explantes, a formação de brotos em 8,3% dos explantes e o maior número médio de brotos por explante (0,83). Já na ausência do PVP-40, a formação de gemas e brotos foi de 5% e notou-se a produção de antocianina, porém, sem diferença significativa entre os demais tratamentos.

O TDZ é um regulador de crescimento bastante utilizado na indução da organogênese em explantes de várias espécies de *Eucalyptus* (MACHADO et al., 1997; BARRUETO CID et al., 1999; CHANG et al., 2000; TOURNIER et al., 2003; ALVES et al., 2004a). Em *Eucalyptus saligna*, a maior porcentagem de explantes foliares formando gemas (30%) foi encontrada no meio MS N/2 com 0,1 μM de ANA e 1,0 μM de TDZ (DIBAX et al., 2010b). No presente trabalho, a interação entre o tipo de meio de cultura e a concentração de TDZ foi significativa para a porcentagem de oxidação, formação de gemas e brotos, e número de brotos. Entretanto, há relatos do efeito positivo do BAP na indução da calogênese, como no caso de *Eucalyptus camaldulensis* (QUISEN et al., 2009).

A presença de 250 mgL^{-1} de PVP-40 nos meios de cultura não reduziu a oxidação dos tecidos. Todos os explantes sofreram oxidação e a menor taxa

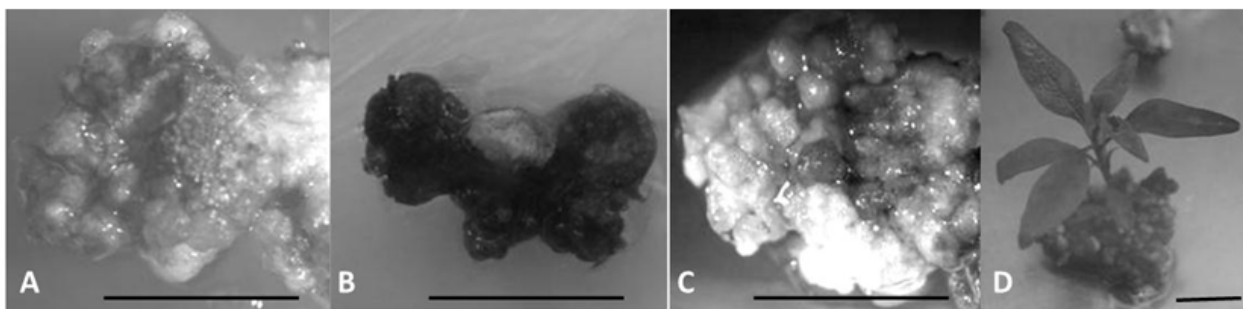


FIGURA 1: Aspecto dos explantes foliares de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* cultivados *in vitro*. A - Meio JADS + 0,1 μM ANA + 0,5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (após 60 dias), B - Meio JADS + 0,1 μM ANA + 0,5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (após 90 dias); C- Meio MS N/2 + 0,1 μM ANA + 0,5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (após 60 dias); D - Regeneração de broto em meio MS N/2 + 0,1 μM ANA + 0,5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (após 90 dias). Barra: 0,5 cm.

FIGURE 1: Aspect of leaf explants of *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* cultured *in vitro*. A- JADS + 0.1 μM NAA + 0.5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (60 days), B - JADS + 0.1 μM NAA + 0.5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (90 days); C- MS N/2 + 0.1 μM NAA + 0.5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (60 days); D- MS N/2 + 0.1 μM NAA + 0.5 μM TDZ + 250 mg L^{-1} PVP-40 (90 days).

TABELA 1: Calogênese e organogênese em explantes foliares de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* cultivados *in vitro* em meios MS N/2 e JADS, contendo 0,1 µM de ANA, após 70 dias. Média de 2 experimentos.TABLE 1: Callus formation and organogenesis of *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* leaf explants cultured *in vitro* in MS N/2 and JADS media, containing 0.1 µM NAA after 70 days. Mean of 2 experiments.

Porcentagem de explantes oxidados						
TDZ		MS N/2			JADS	
(µM)	PVP-40 0 mg L ⁻¹	PVP-40 250 mg L ⁻¹	Média ¹	PVP-40 0 mg L ⁻¹	PVP-40 250 mg L ⁻¹	Média
0,1	100,0	100,0	100 aA	100,0	100,0	100,0 aA
0,5	63,3	68,3	65,8 bB	100,0	100,0	100,0 aA
Porcentagem de explantes formando calos						
TDZ		MS N/2			JADS	
(µM)	PVP-40 0 mg L ⁻¹	PVP-40 250 mg L ⁻¹		PVP-40 0 mg L ⁻¹	PVP-40 250 mg L ⁻¹	
0,1	0,0 bB	0,0 bB		0,0 bB	0,0 bB	
0,5	53,3 aB	55,0 aAB		83,3 aA	78,3 aAB	
Porcentagem de explantes formando gemas						
TDZ		MS N/2			JADS	
(µM)	PVP-40 0 mg L ⁻¹	PVP-40 250 mg L ⁻¹	Média ¹	PVP-40 0 mg L ⁻¹	PVP-40 250 mg L ⁻¹	Média
0,1	0,0	0,0	0,0 bA	0,0	0,0	0,0 aA
0,5	5,0	6,6	5,8 aA	0,0	0,0	0,0 aB
Porcentagem de explantes formando brotos						
TDZ		MS N/2			JADS	
(µM)	PVP-40 0 mg L ⁻¹	PVP-40 250 mg L ⁻¹	Média ¹	PVP-40 0 mg L ⁻¹	PVP-40 250 mg L ⁻¹	Média
0,1	0,0	0,0	0,0 bA	0,0	0,0	0,0 aA
0,5	5,0	8,3	6,6 aA	0,0	0,0	0,0 aB
Número médio de brotos por explante regenerando						
TDZ		MS N/2			JADS	
(µM)	PVP-40 0 mg L ⁻¹	PVP-40 250 mg L ⁻¹	Média ¹	PVP-40 0 mg L ⁻¹	PVP-40 250 mg L ⁻¹	Média
0,1	0,0	0,0	0,0 bA	0,0	0,0	0,0 aA
0,5	0,5	0,83	0,67 aA	0,0	0,0	0,0 aB
Porcentagem de explantes com antocianina						
TDZ		MS N/2			JADS	
(µM)	PVP-40 0 mg L ⁻¹	PVP-40 250 mg L ⁻¹		PVP-40 0 mg L ⁻¹	PVP-40 250 mg L ⁻¹	
0,1	0,0aA	0,0aA		0,0aA	0,0aA	
0,5	5,0aA	0,0aA		0,0aA	0,0aA	

Em que: ¹ = Tratamentos seguidos de letras minúsculas idênticas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

(63,3%) foi encontrada no meio MSN/2 sem PVP-40, suplementado com 0,5 μM de TDZ e 0,1 μM de ANA (Tabela 1). Todos os explantes cultivados no meio de cultura JADS oxidaram parcialmente até a formação dos calos, e totalmente até o final do experimento (Figura 1B).

A maior oxidação e, conseqüentemente, maior escurecimento do meio observados no meio JADS em relação ao MS N/2, pode ter ocorrido devido aos elevados teores de cobre e ferro contidos naquele meio, os quais estão em concentrações superiores às do meio MS. A enzima polifenoloxidase, catalisadora da oxidação de compostos fenólicos a quinonas, contém cobre (KIM et al., 2001). Com isso, infere-se que a maior disponibilidade de cobre no meio de cultura JADS pode ter favorecido a atividade dessa enzima, ocasionando a oxidação.

As diferenças relacionadas à composição dos meios de cultura estudados foram evidenciadas pela análise estatística, que revelou efeito significativo do fator meio de cultura em todas as variáveis avaliadas, exceto para porcentagem de explantes contendo antocianina. O meio de cultura JADS apresenta menores concentrações de cloro, zinco e molibdênio em relação aos outros dois, entretanto, possui o dobro da concentração de fósforo, 4 vezes mais a concentração de cálcio, 50 vezes mais a concentração de cobre e 200 vezes mais a concentração de ferro.

A utilização de carvão ativado durante a formação de calos de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* pode ser uma alternativa para minimizar a oxidação elevada encontrada. Werner et al. (2009) testaram algumas substâncias antioxidantes como ácido ascórbico, ácido cítrico e o carvão ativado na calogênese de *Caesalpinia echinata*. O carvão ativado foi o melhor tratamento no controle de oxidação, em que 40% dos explantes apresentaram oxidação baixa a moderada, porém, sem formação de calos. Essa observação sugere que o carvão ativado exerce influência sobre a calogênese dos tecidos, uma vez que adsorve vários compostos do meio, entre eles os fitorreguladores.

Os resultados obtidos nesse experimento mostram que o híbrido *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* apresenta baixa resposta ao TDZ nas concentrações testadas, bem como alta tendência à oxidação, mesmo em presença de um antioxidante no meio de cultura. Entretanto, a concentração utilizada de PVP-40 pode ter sido baixa, considerando que para a organogênese

de explantes caulinares de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* foi usado 800 mg L⁻¹ (ALVES et al., 2004b) assim como durante a multiplicação de clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* (BORGES et al., 2011). Tendo em vista os resultados encontrados com o PVP-40 nesse experimento, outros antioxidantes podem ser uma alternativa para conter a oxidação e não interferir na organogênese.

Efeito de diferentes meios de cultura na multiplicação de brotações

No primeiro e segundo subcultivo, o maior número médio de brotos por explante (9,28 e 9,24 respectivamente) foi obtido no meio MS, sendo superior aos demais meios testados. Já nos demais subcultivos não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 2). O número de brotos por explante encontrado ao final deste experimento em todos os meios de cultura estudados foi satisfatório se comparado ao de outros trabalhos, como o de Gomes e Canhoto (2003) que utilizaram 0,9 μM de BAP combinado com 0,05 μM de ANA em ½MS para proliferação de gemas de *Eucalyptus nitens* Maiden. Após três subcultivos, obtiveram apenas 2,25 brotos por explante e consideraram os resultados como promissores. No mesmo sentido, Gomes et al. (2011), ao testarem o meio de cultura MS e JADS durante a multiplicação de híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus*, encontraram maiores médias em meio MS do que em meio JADS.

Entretanto, no caso de *Eucalyptus grandis*, Andrade et al. (2006) utilizaram o meio de cultura JADS e tratamentos pulsos de BAP para indução da multiplicação a partir de segmentos nodais, e obtiveram, ao final de 21 dias e após uma ou duas horas de exposição ao regulador vegetal, 35,17 brotos por explante, sugerindo que tratamentos pulsos podem ser uma alternativa para induzir a proliferação de brotos.

Brondani et al. (2009) multiplicaram o clone H12 de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, em meio ½MS adicionado de 1,33 μM de BAP, e obtiveram, após 30 dias de cultivo, uma produção de 6,9 gemas/explante e, após 60 dias, 20,2 gemas/explante. No presente experimento, na presença de 1,11 μM de BAP em meio MS, ao final de 28 dias obteve-se 9,28 brotações por explante. O

TABELA 2: Efeito de três meios de cultura adicionados de 1,11 µM de BAP na multiplicação de brotações de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*.TABLE 2: Effect of three culture media supplemented with 1.1 µM BAP on the multiplication of *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* shoots. Mean of 2 experiments.

1º subcultivo					
Tratamento	Nº médio de brotos/ explante	Massa fresca (g)	Oxidação ¹ (%)	Clorose parcial (%)	Massa seca (g)
JADS	4,88 b	0,063 b	38,48 a	12,0 b	0,010 b
WPM	5,20 b	0,107 b	6,20 b	8,0 b	0,010 b
MS	9,28 a	0,384 a	12,40 b	88,0 a	0,020 a
2º subcultivo					
JADS	4,78 b	0,053 b	41,53 a	14,0 b	-
WPM	5,64 b	0,114 b	10,62 b	10,0 b	-
MS	9,24 a	0,379 a	7,84 b	90,0 a	-
3º subcultivo					
JADS	6,88 a	0,067 b	36,39 a	16,0 b	-
WPM	9,08 a	0,087 ab	6,76 b	0,0 b	-
MS	8,04 a	0,160 a	6,76 b	76,0 a	-
4º subcultivo					
JADS	7,00 a	0,060 b	28,0 a	12,0 b	-
WPM	8,92 a	0,087ab	4,0 b	8,0 b	-
MS	8,40 a	0,153 a	8,0 b	72,0 a	-

Em que: Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. ¹ = dados transformados para arcsen .

explante inicial naquele e no presente experimento consistiu de brotações contendo de uma a duas gemas axilares.

No meio MS, uma alta percentagem de gemas apresentou clorose foliar parcial, sendo maior que nos meios WPM e JADS em todos os subcultivos (Tabela 2). Entretanto, a clorose observada em todos os tratamentos não se mostrou limitante ao desenvolvimento das brotações.

A massa fresca dos brotos cultivados no meio de cultura MS foi significativamente superior à dos demais meios de cultura no primeiro e segundo subcultivos e somente ao meio JADS no terceiro e quarto subcultivos. Semelhantemente, a massa seca dos brotos cultivados em meio MS foi superior à dos outros meios no primeiro subcultivo, que foi o único a ser avaliado.

No presente estudo, as brotações mantidas em meio de cultura MS tinham folhas maiores e mais alongadas em relação às brotações dos outros tratamentos (Figura 2), observação também feita por Borges et al. (2011) no caso de *Eucalyptus globulus* cultivado em meio MS e JADS. Esse fato

certamente se refletiu nos valores de massa fresca e seca (0,384g e 0,0209g) encontrados no primeiro subcultivo.

A oxidação foi superior no meio JADS em relação aos outros meios em todos os subcultivos, assim como observado no experimento de



FIGURA 2: Aspecto das brotações de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* aos 28 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura JADS (A), MS (B) e WPM (C) adicionado de 1,11 µM de BAP. Barra: 1cm.

FIGURE 2: Aspect of *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* shoots with 28 days in culture media JADS (A), MS (B) and WPM (C), with 1.11µM BA.

organogênese. A oxidação encontrada nesta fase também foi observada por Brondani et al. (2009). Os clones H19 e H20 de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* cultivados em meio ½MS com diferentes concentrações de BAP tiveram um comportamento recalcitrante na fase de multiplicação, com elevada taxa de oxidação, fator que impediu os cultivos subsequentes. Da mesma forma, Borges et al. (2011) observaram maior escurecimento do meio de cultura JADS em relação ao MS durante a multiplicação de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus*. Os autores atribuíram esse escurecimento à oxidação de compostos fenólicos liberados pelo explante.

CONCLUSÕES

Foram obtidos resultados preliminares de organogênese para o híbrido *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. Houve regeneração indireta de brotos em explantes foliares, entretanto, em taxas baixas. O meio de cultura mais indicado para formação de gemas é o meio MS N/2 suplementado com 0,1 µM de ANA e 0,5 µM de TDZ. A oxidação dos tecidos foi alta, mesmo na presença de 250 mg.L⁻¹ de PVP nos meios testados. Os meios de cultura MS e WPM adicionados de 1,11 µM de BAP são recomendados na multiplicação de brotações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelas bolsas de estudo concedidas e à Embrapa Floresta pela concessão do material vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARA, G. B.; BESPALHOK FILHO, J. C.; QUOIRIN, M. Organogenesis and transient genetic transformation of the hybrid *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 68, n. 2, p. 246-251, 2011.
- ALVES, E. C. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 421-430, 2004a.
- ALVES, E. C. S. C.; 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 *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, p. 643-653, 2004b.
- ANDRADE, W. F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.
- AZMI, A. et al. Bud regeneration from *Eucalyptus globulus* clones and seedlings through hormonal imbalances induced by *Agrobacterium tumefaciens* strain. **Plant Science**, v. 127, n. 1, p. 81-90, 1997.
- BARRUETO CID, L. P. et al. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 56, n. 1, p. 17-23, 1999.
- BISHT, P.; SHARMA V. K.; JOSHI I.; KAPOOR M. L. Micropropagation of newly produced F1 hybrid of *Eucalyptus* (*E. tereticornis* Sm. x *E. camaldulensis* Dehn. Southern Form). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 48, n. 2, p. 104-108, 1999.
- BORGES, S. R. et al. Multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 2, p. 173-182, 2011.
- 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, 2009.
- BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; HANSEL, F. A.; ARAUJO, M. A. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum**. Agronomy. Maringá, v. 33, n. 4, p. 655-663, 2011.
- CHANG, S. H. et al. Thidiazuron enhancement of plant regeneration from leaf calli of superior clones of *Eucalyptus camaldulensis*. **Journal Forestry Sciences**, v. 15, p. 81-90, 2000.
- CORREIA D. et al. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, Piracicaba, n. 48/49, p. 107-116, 1995.
- DEL PONTE, E. M. et al. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, p. 1-8, 2001.
- DIBAX, R. et al. Plant Regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and histological study of organogenesis

- in vitro*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 311-318, 2010a.
- DIBAX, R. et al. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with *P5CS* gene. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 1, p. 6-12, 2010b.
- GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining Gum). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 39, p. 316-321, 2003.
- GLOCKE, P. et al. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* cv. "Urrbrae Gem". **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 42, p. 139-143, 2006.
- KIM, J. Y. et al. Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. **Plant Science**, v. 161, n. 6, p. 1145-1152, 2001.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MACHADO, L. O. R. et al. Transformation and regeneration studies of elite eucalypt hybrids: optimisation of physical and biological parameters. **Proceedings of IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts**, v. 2, p. 192-199, 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NETTO, A. B. P. et al. Shooting control in *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* hybrid: comparative effects of 28-homocastasterone and a 5 α -monofluoro derivative. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 86, n. 3, p. 329-335, 2006.
- NICCOL, R. J. ; REGAN, P. A ; DE FILIPPIS, L. F. Simplified protocol for the micropropagation of selected *Eucalyptus* and *Banksia* species. **Australian Forestry**, v. 57, n. 4, p. 143-147, 1994.
- NUGENT, G. et al. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus* Labill. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 37, n. 3, p. 388-391, 2001.
- PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. dos; FERREIRA, C. A. Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná. Colombo: Embrapa Florestas – CNPF 2006. (Documentos; 129).
- QUISEN, R. C. et al. Selective agents and *A. tumefaciens* overgrowth-control antibiotics in *Eucalyptus camaldulensis* cotyledonary culture. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 6, p. 1485-1492, 2009.
- SANKARA-RAO, K. *In vitro* meristem cloning of *Eucalyptus tereticornis* Sm. **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 546-549, 1988.
- SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7., 2009, Reno-NV-**Proceedings...** American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.
- TOURNIER, V. et al. An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). **Transgenic Research**, v. 12, n. 4, p. 403-411, 2003.
- TRINDADE, H.; FERREIRA, J. G.; PAIS, M. S. ALONI, R. The role os cytokinin and auxin in rapid multiplication of shoots of *Eucalyptus globulus* grown *in vitro*. **Australian Forestry**, v. 53, n. 3, p. 221-223, 1990.
- WERNER, E. T. et al. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.