

# Alongamento *in vitro* de rebentos de *Eucalyptus dunnii* em função de diferentes genótipos e concentrações de ácido 1-naftil-acético (ANA)

## *In vitro* elongation of *Eucalyptus dunnii* shoots for different genotypes and concentrations of naphthalene acetic acid (NAA)

Marcio C. Navroski<sup>1</sup>, Lia R. S. Reiniger<sup>2</sup> e Mariane O. Pereira<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Departamento de Engenharia Florestal. Lages, SC, Brasil. CEP: 88520-000. E-mail: marcio.navroski@udesc.br

<sup>2</sup> Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Fitotecnia. Santa Maria, RS, Brasil. CEP: 97105-900. E-mail: liarejanesilveirareiniger@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Universidade Federal do Paraná, Departamento de Engenharia Florestal. Curitiba, PR, Brasil. CEP: 80210-170. E-mail: maripereira.florestal@gmail.com

Recebido/Received: 2014.08.16

Aceite/Accepted: 2015.02.12

### RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido 1-naftilacético (ou ácido alfa-naftaleno acético, ANA) associado à concentração fixa de 6-benzilaminopurina (BAP) no alongamento *in vitro* de rebentos previamente multiplicados de genótipos de *Eucalyptus dunnii*. Os rebentos foram preparados e inoculados, sob condições assépticas, em meio nutritivo 1/2MS. O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 6 x 5, em que os níveis do fator "A" referiram-se aos diferentes genótipos (identificados como 2, 3, 4, 6, 7 e 10) e os níveis do fator "B", às concentrações de ANA (0; 0,25; 0,5; 0,75; e 1 mg L<sup>-1</sup>). O ensaio foi realizado com cinco repetições, de um frasco contendo três explantes. Trinta dias após a inoculação dos explantes foi avaliado o número de rebentos alongados, comprimento médio (mm) dos rebentos e formação de hiperhidricidade (%). Os genótipos apresentaram comportamento diferenciado na etapa de alongamento, demonstrando a possibilidade de seleção no cultivo *in vitro*. A adição de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA aumentou o número de rebentos alongados e e elevou levou o comprimento dos rebentos. . Concentrações superiores a 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA induziram um aumento na formação de estruturas hiperhídricas, prejudicando o alongamento dos rebentos. O balanço apropriado de auxina/citocinina e a seleção de genótipos adequados são fundamentais para o sucesso do alongamento *in vitro* de rebentos de *E. dunnii*.

**Keywords:** silvicultura clonal, micropropagação, reguladores de crescimento.

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of different concentrations of naphthalene acetic acid (NAA) associated with the fixed concentration of 6-benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* elongation of shoots derived from previously multiplied genotypes of *Eucalyptus dunnii*. Shoots were prepared and inoculated under aseptic conditions in nutrient broth 1/2MS. The experiment was conducted in a completely randomized design in a factorial scheme 5 x 6, in which the levels of the factor "A" referred to the different genotypes (labeled 2, 3, 4, 6, 7 and 10) and levels of factor "B", the NAA concentrations (0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg L<sup>-1</sup>). The experiment was performed with five repetitions of a bottle containing three explants. Thirty days after inoculation of the explants was rated the number of elongated shoots, average length (mm) of shoots and formation of hyperhydricity (%). The genotypes showed different behavior in elongation phase, demonstrating the possibility of selection *in vitro*. The addition of 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA increased the number of elongated shoots and increased the length of the shoots. Concentrations higher than 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA exhibit increased formation of hyperhydric structures, damaging the shoots elongation. The proper balance of auxin/cytokinin and the selection of suitable genotypes is critical to the success of shoots *in vitro* elongation of *E. dunnii*.

**Palavras-chave:** clonal forestry, micropropagation, growth regulators.

## Introdução

As características florestais apresentadas por *Eucalyptus dunnii* Maiden oferecem perspectivas promissoras para o cultivo de eucaliptos no Rio Grande do Sul, Brasil. Entre essas características, merecem destaque a tolerância a geadas intensas e severas, além do baixo potencial invasivo de *E. dunnii*, que produz poucas sementes, dificultando sua propagação aleatória (Billard e Lallana, 2005). Por outro lado, a reduzida produção de sementes dificulta, em muito, a produção de mudas via seminal. Alternativamente, devem ser pesquisados métodos de propagação assexuada. A fixação de genótipos superiores aumentaria os ganhos genéticos obtidos com a espécie, colocando no mercado mudas de melhor qualidade e homogeneidade, características obtidas com a propagação vegetativa.

Atualmente, a clonagem do gênero *Eucalyptus* é realizada, principalmente, por miniestaquia, porém muitas empresas florestais utilizam a micropropagação para produção massal de genótipos selecionados através de sucessivas gerações (Brondani *et al.*, 2009).

A micropropagação tem sido utilizada na área florestal para preservação de germoplasma, produção de indivíduos livres de patógenos, rápida multiplicação em espaço reduzido, rejuvenescimento e produção de mudas selecionadas (Erig e Schuch, 2005). Uma série de fatores influencia o sucesso da micropropagação, como o genótipo, o estado fisiológico da planta-matriz, a colheita e o tipo de explante, a assepsia utilizada, o meio de cultura (nutrientes, vitaminas, açúcares, dentre outros), as concentrações e tipos de reguladores de crescimento, as condições de incubação (fotoperíodo, irradiância e temperatura) e a habilidade do operador (George e Debergh, 2008).

Os resultados obtidos durante todo o processo de micropropagação são diretamente influenciados pelo genótipo, sendo este um dos fatores limitantes no sucesso da propagação *in vitro*. Isto se deve a especificidade das espécies e clones, quanto ao meio de cultura, reguladores de crescimento e condições ambientais, controlados por fatores genéticos (Gahan e George, 2008). Desta forma, ao se trabalhar com novos genótipos é necessário avaliar a resposta desses materiais ao cultivo *in vitro* e posteriormente fazer ajustes necessários para otimizar o processo de micropropagação (Borges *et al.*, 2012).

Normalmente, na propagação *in vitro* os reguladores de crescimento constituem-se numa primeira etapa a ser abordada, em que o modo de interação entre auxinas e citocininas é frequentemente depen-

dente da espécie, da planta e do tipo de tecido utilizado na cultura (Perez e Kerbaudy, 2005). A maneira complexa com que os reguladores de crescimento e as células interagem indica que, se o tecido não está em um estágio responsivo, não irá responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações estes reguladores são utilizados.

Os rebentos multiplicados que apresentam pequeno comprimento poderão apresentar baixo percentual de enraizamento se forem diretamente cultivados em meios de enraizamento, ou dar origem a mudas de baixa qualidade para a fase de aclimatização (Silva *et al.*, 2003). Desta forma a etapa de alongamento tem sido considerada necessária para o sucesso do cultivo *in vitro* na maioria das espécies de *Eucalyptus* (Joshi *et al.*, 2003).

Um dos fatores que afetam o alongamento de rebentos está relacionado ao efeito residual do BAP utilizado durante a fase de multiplicação de gomos em subculturas sucessivas (Silva *et al.*, 2003). Uma das formas de estimular o crescimento dos rebentos é por meio da adição do ácido giberélico (Diniz *et al.*, 2003), induzir um balanço favorável de reguladores de crescimento (Grattapaglia e Machado, 1990) e manter os rebentos no escuro (Ramos e Carneiro, 2007).

*E. dunnii* apresenta limitações na micropropagação, assim como outras espécies de mesmo gênero. Isso está de acordo com o registro de que a maioria das espécies resistentes ao frio apresentam recalcitrância ao processo de clonagem (Brondani *et al.*, 2009). Alguns trabalhos recentes com a espécie mostram a potencialidade do uso da micropropagação em *Eucalyptus dunnii* ou híbridos utilizando a espécie, destacando-se os estudos de Brondani *et al.* (2010), Brondani *et al.* (2011), Navroski *et al.* (2013) e Navroski *et al.* (2014) desenvolvidos no Brasil e outros estudos a nível mundial: Yang (2006), Lin e Xie (2007) e Xiuhong *et al.* (2011).

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar o alongamento *in vitro* de rebentos de diferentes genótipos de *E. dunnii* provenientes da fase de multiplicação sob diferentes concentrações de Ácido Alfa-Naftaleno Acético (ANA) associado à concentração fixa de 6-Benzilaminopurina (BAP).

## Material e Métodos

### Colheita e preparação do material genético

O material genético utilizado no presente estudo foi colhido em povoamento comercial de *E. dunnii* com cerca de três anos de idade, localizado no município

de Alegrete - RS. O povoamento era originário do plantio de mudas produzidas via seminal.

Foram escolhidas 10 árvores, cada uma correspondendo a um genótipo, com características morfológicas (diâmetro e altura) acima da média da população, bom desenvolvimento de copas, desprovidas de sintomas de deficiência nutricional ou hídrica e de ataques de pragas e doenças. As árvores selecionadas foram abatidas deixando-se a cepa com cerca de 45 cm de altura. Na sequência, após o início dos abrolhamentos, foram realizados tratamentos sanitários preventivos com a aplicação intercalada, semanalmente, dos fungicidas Dicarboximida, a 2,4 g.L<sup>-1</sup>, e Benzimidazol, a 1,0 g.L<sup>-1</sup>.

Decorridos 60 dias após o início do tratamento com fungicidas, foram colhidos os rebentos das árvores selecionadas, no qual foram obtidas do 3º e o 4º segmento nodal com o par de folhas, do ápice do abrolhamento em direção à base, posição geralmente utilizada para formar microestacas de *Eucalyptus sp.* (Alfenas *et al.*, 2009). Os rebentos foram colhidos nas primeiras horas da manhã sendo cortados em aproximadamente 10 cm para facilitar o transporte. Após foram acondicionadas em frascos de vidro contendo água destilada e autoclavada acrescida de ácido ascórbico a 1% (p/v) para minimizar o efeito da oxidação fenólica. Os frascos contendo os rebentos foram colocados em caixa de isopor contendo gelo e transportados até o laboratório onde se desenvolveu a pesquisa. O tempo de transporte até o laboratório foi de aproximadamente 3 horas.

As estacas foram lavadas em água corrente, por cerca de 30 minutos, para promover-se a lixiviação de substâncias fenólicas e a redução de contaminantes superficiais. Após essa limpeza inicial, os ramos foram submersos em detergente neutro comercial (1 mL L<sup>-1</sup>), por 1-2 min, e, a seguir, enxaguados três vezes com água esterilizada. Após esta etapa, segmentos nodais com 1,0-1,5 cm de comprimento e que continham um par de gomos axilares foram excisados e cuidadosamente lavados com água esterilizada.

A desinfestação foi efetuada em câmara de fluxo laminar, sendo os segmentos nodais imersos em solução de etanol a 70% (v/v), por 30 seg, enxaguados com água esterilizada e, em seguida, imersos em solução de hipoclorito de sódio - NaOCl (1,5% v/v), durante 10 min. Após, os segmentos nodais foram lavados três vezes com água esterilizada e, imediatamente inoculados, na posição vertical, em frascos com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL do meio nutritivo MS (Murashige e Skoog, 1962).

Ao meio nutritivo MS foram adicionados 6 g L<sup>-1</sup> de

ágar (Sigma®), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e o pH foi ajustado para 5,8. Na sequência, os frascos contendo os meios nutritivos foram autoclavados à temperatura de 121°C (1,5 kgf cm<sup>-2</sup>) durante 20 minutos. O meio nutritivo foi suplementado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de Ácido alfa-Naftaleno Acético (ANA), conforme recomendado por Alfenas *et al.* (2009). Adicionaram-se, ainda, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 250 mg L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP), com a finalidade de controlar a oxidação fenólica.

Após 30 dias de estabelecimento dos explantes, os rebentos dos segmentos nodais contendo 2 gomos axilares dos seis genótipos que obtiveram estabelecimento satisfatório (>30%) foram transferidos para a fase de multiplicação. Os explantes foram excisados e inoculados, sob condições assépticas, em frascos com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL do meio nutritivo MS reduzido à metade da concentração de sais (1/2 MS), suplementado com 0,50 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA conforme estudo de Navroski *et al.* (2014). Os explantes permaneceram na sala de cultivo por mais 30 dias.

#### *Alongamento dos rebentos in vitro*

Para a iniciação da fase de alongamento, os rebentos multiplicados in vitro foram preparados e inoculados, sob condições assépticas, em frascos com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL do meio MS reduzido à metade da concentração de sais (1/2 MS). Ao meio nutritivo MS foram adicionados 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 50 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e concentrações crescentes de ANA (0; 0,25; 0,5; 0,75; e 1 mg L<sup>-1</sup>). O meio de cultura foi preparado utilizando-se água desionizada e o pH foi ajustado para 5,8 com NaOH 0,1 M ou HCl 0,1 M, antes da autoclavagem e da adição do ágar. Na sequência, os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados a 121°C (1,5 kgf cm<sup>-2</sup>) por 20 minutos.

Os frascos contendo os explantes inoculados foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25°C ±2 °C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 20 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia durante todo o ensaio.

O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 6 x 5, em que os níveis do fator "A" referiram-se aos diferentes genótipos (identificados como 2, 3, 4, 6, 7 e 10) e os níveis do fator "B", às concentrações crescentes de ANA (0; 0,25; 0,5; 0,75; e 1 mg L<sup>-1</sup>). O ensaio foi realizado com cinco repetições, cada uma composta por um frasco contendo três explantes, totalizando 150

unidades experimentais e 450 rebentos submetidos aos tratamentos.

Trinta dias após a inoculação dos explantes, foram avaliadas as seguintes variáveis: número de rebentos alongados – NB (rebentos que apresentaram alongamento superior a 10% do tamanho inicial), comprimento dos lançamentos – CMB, em mm (comprimento em relação ao tamanho inicial dos rebentos) e a percentagem de explantes apresentando hiperhidricidade. A hiperhidricidade foi determinada mediante avaliação visual, sendo considerados hiperhídricos aqueles explantes que apresentaram aspecto vítreo.

### Análise de dados

Após avaliar a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias por meio do teste de Bartlett, os dados foram transformados pela função  $\sqrt{x+0,5}$  e submetidos à análise de variância. Quando o valor de “F” foi significativo, as médias de tratamentos qualitativos foram submetidos à comparação de médias por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Médias de tratamentos quantitativos foram submetidas à análise de regressão polinomial. Os resultados apresentados são as médias originais obtidas. O programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011) foi utilizado para a análise estatística dos dados. A precisão dos ensaios foi medida através da acurácia seletiva (AS%) calculada por  $\sqrt{1-1/Fcal}$ .

**Quadro 1** – Número de rebentos alongados por explante, comprimento de lançamentos (mm) e aparecimento de hiperhidricidade (%) em genótipos de *Eucalyptus dunnii* cultivados em meio nutritivo ½ MS, aos 30 dias de avaliação, em diferentes concentrações de ANA.

Genótipo	Número de rebentos alongados	Comprimento de lançamentos (mm)	Formação de calos (%)
6	3,17±1,07 a*	15,68±2,69 a	6,67±19,24 a
3	3,09±1,27 a	11,78±1,99 b	2,67±13,33 a
7	2,97±0,94 a	11,20±2,29 b	6,67±19,24 a
2	2,48±1,02 b	10,30±2,31 b	0,0±0,0 a
4	2,09±1,02 c	7,00±1,48 c	9,33±20,45 a
10	1,80±1,00 c	6,70±1,57 c	21,33±23,33 b

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. A letra “a” refere-se à melhor resposta *in vitro*.

foi obtido pelos genótipos 10 e 4. O genótipo 6 apresentou rebentos de praticamente 9,0 mm superiores ao pior genótipo (10). Esses resultados mostraram variações genéticas entre os clones em relação à capacidade de alongamento de rebentos, destacando diferenças no potencial genético do material em relação à característica. Reforça-se a importância da escolha de genótipos produtivos a campo, mas que apresentem também capacidade

## Resultados e discussão

Conforme a análise de variância não ocorreu interação ( $p>0,05$ ) entre os genótipos e as concentrações de ANA para nenhuma das variáveis avaliadas. Contudo, verificou-se efeito significativo ( $p<0,05$ ) para os fatores principais para todas as variáveis estudadas. A acurácia seletiva (AS) foi alta ( $>0,90$ ) para todas as variáveis, conforme classificação de Resende e Duarte (2007). Com isso é alta a confiança que se pode ter na avaliação e nos valores genotípicos preditos para fins de seleção.

Os genótipos 6, 3 e 7 apresentaram o maior número de rebentos alongados por explante (Figura 1A), diferenciando-se dos demais genótipos (Quadro 1). A diferença entre o genótipo que apresentou maior alongamento de rebentos (genótipo 6) foi praticamente o dobro que o genótipo que exibiu a menor média (genótipo 10). Essas diferenças genotípicas no desenvolvimento *in vitro* são relatadas em diferentes espécies do gênero *Eucalyptus*: *E. grandis* (Sobrosa e Corder, 2003; Santos *et al.*, 2005), *E. globulus* (Borges *et al.*, 2011), *E. dunnii* (Navroski *et al.*, 2013) e também em diversos híbridos: *E. benthamii* x *E. dunnii* (Bron-dani *et al.* (2009), *E. grandis* x *E. nitens* e *E. grandis* x *urophylla* (Watt, 2014; Nakhouda *et al.*, 2012).

Resultado semelhante foi alcançado em relação ao comprimento médio dos rebentos (Quadro 1), no qual, o genótipo 6 apresentou a maior média, diferindo dos demais, e o menor comprimento

de propagação vegetativa, neste caso, em relação ao alongamento de rebentos *in vitro*.

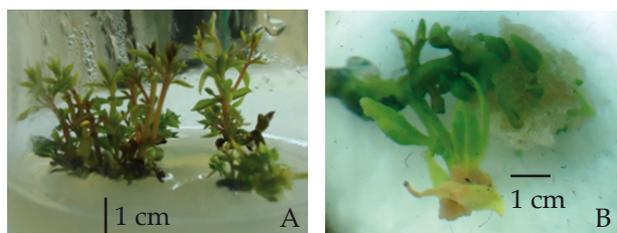
Considerando-se que os seis genótipos estão sob condições edafoclimáticas e experimentais semelhantes (mesmo sítio), pode-se supor que as variações no alongamento dos rebentos advêm de diferenças genéticas entre as matrizes ou balanço hormonal específico de cada indivíduo (Sobrosa e Corder, 2003). Assim, as diferenças observadas

podem advir do controle genético ou, mesmo, das diferenças entre ritmos endógenos da planta relacionados a fatores fisiológicos e morfológicos, pois flutuações são capazes de ocorrer mesmo entre genótipos estreitamente aparentados, de acordo com o determinismo endógeno (Mankessi *et al.*, 2009).

O genótipo 10 além de exibir o menor número e tamanho dos rebentos, apresentou à maior frequência de hiperhidricidade, superior a 20% dos explantes (Figura 1B). Já os demais genótipos formaram um reduzido percentual, ou não formaram, e, em geral, apresentaram um maior crescimento da parte aérea.

Pode-se verificar recalcitrância do genótipo 4 e, principalmente, do genótipo 10 quanto ao alongamento *in vitro*. Ambos os genótipos apresentaram reduzido número de rebentos alongados e, também, médias de comprimento inferiores aos demais genótipos. A permanência desses genótipos no cultivo *in vitro*, especialmente do genótipo 10, foi, além disso, afetada pelo elevado número de rebentos com hiperhidricidade. Observou-se uma relação inversa com o alongamento; os genótipos que mais alongaram foram aqueles com menor aparecimento de hiperhidricidade (Quadro 1).

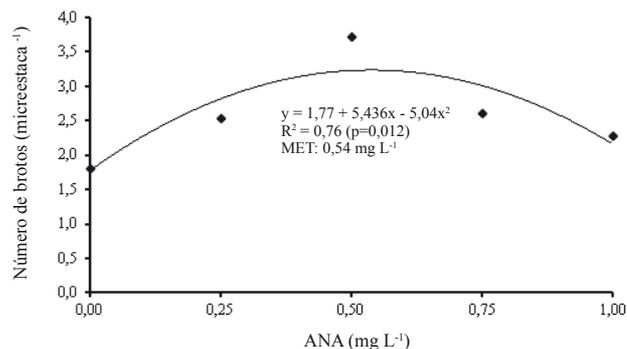
A hiperhidricidade é frequentemente relatada na micropropagação de espécies lenhosas, podendo reduzir o crescimento dos rebentos, e consequentemente afetar a qualidade, pode também, se muito intensa, levar a necrose dos tecidos (Whitehouse *et al.*, 2002).



**Figura 1** – A- Brotações alongadas, e; B - aspecto de brotações com hiperhidricidade (indicações nas setas) (B) em *E. dunnii* no estágio de alongamento *in vitro*.

Em relação ao número de lançamentos por explante, em função de concentrações crescentes de ANA, a curva obtida ajustou-se a uma função quadrática (Figura 2), constatando-se uma elevação na formação de lançamentos à medida que aumentou a concentração de ANA até 0,54 mg L<sup>-1</sup> (MET). A partir desse ponto, houve uma diminuição no número de lançamentos com o aumento na concentração da auxina.

Resposta semelhante foi encontrada em estudo com *E. benthamii* x *E. dunnii*, no qual o maior número de



**Figura 2** – Número de brotações emitidas por microestaca em *Eucalyptus dunnii* após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ½ MS acrescido de concentrações crescentes de ANA e fixa de BAP (0,1 mg L<sup>-1</sup>).

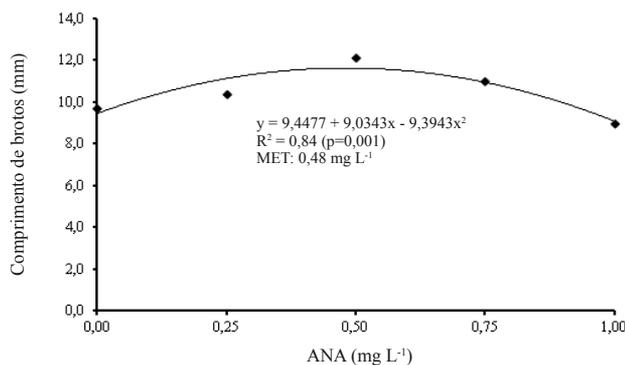
rebentos alongadas (3,8) foi obtido com concentrações entre 0,25 e 0,75 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Brondani *et al.*, 2009). O balanço entre auxinas e citocininas foi recomendado em estudos recentes com *Eucalyptus*: Watt (2014) em *E. grandis* x *nitens* e *E. grandis* x *urophylla*; Nakhoda *et al.* (2012) em *E. grandis* x *nitens* e *E. grandis* e Nakhoda *et al.* (2011) em *E. grandis*.

O ajuste correto na concentração entre auxina e citocinina é extremamente importante na fase de alongamento de materiais recalcitrantes *in vitro*, como é o caso do *E. dunnii*. Tomando-se como base o ponto de MET, uma variação de ±0,25 mg L<sup>-1</sup> de ANA foi responsável por uma diferença de 1,10 lançamentos alongados. Esse resultado, extrapolado para grande escala, representa uma grande quantidade de material apto ao enraizamento.

Além de auxiliar no alongamento, a adição de auxina e citocinina é importante para a próxima fase, o enraizamento. Segundo Nakhoda *et al.* (2011) a retirada da auxina no alongamento reduziu de 68% para 31% o enraizamento de miniestacas de *E. grandis*. Negishi *et al.* (2014) indicam que a adição exógena de citocinina, durante o desenvolvimento de lançamentos (multiplicação e alongamento) é eficaz na formação de raízes adventícias de *E. globulus*.

O comprimento dos lançamentos por microestaca teve resposta semelhante ao número de rebentos alongados (Figura 3). Em geral, quanto maior o número de abrolhamentos, maior também foi o seu comprimento. A concentração 0,48 mg L<sup>-1</sup> de ANA (estimada pela equação) apresentou o maior comprimento médio por rebento (11,6 mm), diminuindo conforme o aumento da concentração de ANA no meio nutritivo.

Efeitos semelhantes foram constatados por Brondani *et al.* (2009), que obtiveram a melhor resposta



**Figura 3** – Comprimento de brotos em *Eucalyptus dunnii* após 30 dias de cultivo in vitro em meio de cultura ½ MS acrescido de concentrações crescentes de ANA e fixa de BAP (0,1 mg L<sup>-1</sup>).

quanto ao número de rebentos alongados de *E. benthamii* x *E. dunnii* em meio de cultura suplementado com concentrações entre 0,25 e 0,75 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP, sendo estimada a concentração de 0,49 mg L<sup>-1</sup> de ANA para obtenção do maior número de rebentos alongados com comprimento médio de 2,4 cm, aos 60 dias após a inoculação.

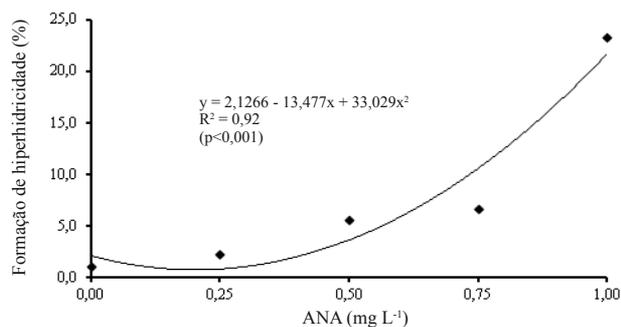
Trabalhando com *E. tereticornis* x *E. calmadulensis*, Bisht *et al.* (1999) observaram multiplicação seguida de alongamento após um período de 120 dias de cultivo em meio MS suplementado com BAP e ANA. No geral, os lançamentos atingiram, em média, 20 a 35 mm de comprimento, resultado superior ao encontrado no presente estudo. Para os autores, a multiplicação e o alongamento ocorreram sem a necessidade de uma fase específica de alongamento dos rebentos multiplicados.

Joshi *et al.* (2003) obtiveram rebentos de *E. tereticornis* x *E. grandis* alongadas quando cultivadas em meio de cultura sem adição de reguladores de crescimento. Segundo os autores esse resultado representa economia no processo de produção in vitro do híbrido. Entretanto, deve-se considerar a especificidade de cada espécie/clon de eucalipto, sendo que algumas espécies necessitam de diferentes condições em cada fase específica do cultivo in vitro (Borges *et al.*, 2012).

Em estudos com *E. urophylla*, Santos *et al.* (2004) observaram que a combinação de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP resultou nos melhores efeitos para o alongamento dos rebentos. De maneira semelhante, Oliveira (2011) obteve os melhores resultados para o alongamento in vitro de híbridos de *E. globulus* utilizando 0,25 a 1,00 mg L<sup>-1</sup> de AIB e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Já, para Sotelo e Monza (2007), o *E. globulus* sub. *Maidenii*, em tratamento com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB foi o que melhor

promoveu o alongamento dos rebentos.

A formação de hiperhidricidade ajustou-se a uma função quadrática positiva com o aumento na concentração da auxina, alcançando quase 25% de explantes com estruturas calogênicas na presença de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA (Figura 4). Além da alta formação de estruturas hiperhídricas a utilização de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA também promoveu o aparecimento de estruturas calogênicas (dados não apresentados).



**Figura 4** – Brotos de *Eucalyptus dunnii* em fase de alongamento com hiperhidricidade (%) após 30 dias de cultivo in vitro em meio de cultura ½ MS acrescido de concentrações crescentes de ANA e fixa de BAP (0,1 mg L<sup>-1</sup>).

A hiperhidricidade, antigamente conhecida como vitrificação, ocasiona desordens morfológicas e fisiológicas na planta decorrentes do elevado teor de água no interior das células e tecidos (Ziv, 1991), podendo em alguns casos, atingir até 60% dos lançamentos micropropagados (Park *et al.*, 2004). Plantas hiperhídricas caracterizam-se morfológicamente por apresentarem aspecto translúcido, caules largos e engrossados em diâmetro e com entrenós mais curtos que os de plantas normais (Figura 1B), órgãos menos verdes e facilmente quebráveis, menor alongamento celular e também menor potencial de enraizamento das miniestacas (Kevers *et al.*, 2004; Bertoni *et al.*, 2006).

Entre os principais fatores que causam hiperhidricidade estão as condições de estresse (Ziv, 1991), devidas, por exemplo, aos estados físico e químico do meio de cultura e da atmosfera dos frascos. Além disso, outros fatores podem ocasionar a hiperhidricidade, destacando-se a presença de reguladores de crescimento, grandes quantidades de íons amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e cloreto (Cl<sup>-</sup>), tipo e concentração de agentes gelificantes e alta umidade relativa nos frascos de cultivo (Park *et al.*, 2004).

Em relação aos reguladores de crescimento, estudos mostram que em meio nutritivo contendo citocinina, a adição de auxinas frequentemente aumenta a

proporção de plantas hiperhídricas. Em experimento com *Cochlospermum regium*, ao aumentar a concentração do ácido indol butírico (AIB), aumenta-se a porcentagem de hiperhidricidade dos explantes (Inácio, 2010), corroborando os resultados encontrados no presente trabalho. Geralmente, existe uma relação negativa entre tamanho dos rebentos ou proliferação e hiperhidricidade (Picoli *et al.*, 2001), fato igualmente confirmado neste estudo.

Apesar da formação de estruturas hiperhídricas ser prejudicial à micropropagação do *E. dunnii*, a utilização de ANA em concentrações inferiores a 0,75 mg L<sup>-1</sup> não afetou o alongamento das estacas. Somente 5% dos rebentos apresentaram a formação de hiperhidricidade quando da utilização de 0,50 e 0,75 mg L<sup>-1</sup> de ANA, e menos de 2% na presença de 0,25 mg L<sup>-1</sup> da auxina.

## Conclusões

Os genótipos testados são passíveis de seleção com base na resposta diferencial *in vitro*. A adição de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA aumenta o número de rebentos alongados e eleva o comprimento dos lançamentos. Concentrações superiores a 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA apresentam aumento na formação de estruturas hiperhídricas.

## Referências bibliográficas

- Alfenas, A.C.; Zauza, E.A.V.; Mafia, R.G. e Assis, T.F. (2009) - *Clonagem e doenças do eucalipto*. 2. ed. Viçosa, MG: UFV. 500 p.
- Bertoni, B.W.; Damião Filho, C.F. e Moro, J.R. (2006) - Micropropagação de *Calendula officinalis* L. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, vol. 8, n. 2, p. 48-54.
- Billard, C.E. e Lallana, V.H. (2005) - Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. *Ciencia, Docência y Tecnología*, vol. 16, n. 30, p.199-216.
- Bisht, P.; Sharma, V.K.; Joshi, I. e Kapoor, M.L. (1999) - Micropropagation of newly produced F1 hybrid of *Eucalyptus* (*E. tereticornis* Sm. x *E. camaldulensis* Dehn. Southern Form). *Silvae Genetica*, vol. 48, n.2, p.104-108.
- Borges, S.R.; Xavier, A.; Oliveira, L.S.; Lopes, A.P. e Otoni, W.C. (2011) Multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. *Revista Árvore*, vol. 35, n. 2, p. 173-182.
- Borges, S.R.; Xavier, A.; Oliveira, L.S.; Lopes, A.P. e Otoni, W.C. (2012) -Estabelecimento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. *Revista Ciência Florestal*, vol. 22, n. 3, p. 605-616.
- Brondani, G.E.; Dutra, L.F.; Grossi, F.; Wendling, I. e Hornig, J. (2009) - Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden e Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Revista Árvore*, vol.33, n.1, p. 11-19.
- Brondani, G.E.; Dutra, L.F.; Wendling, I.; Grossi, F.; Hansel, F.A. e Araujo, M.A. (2011) - Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). *Acta Scientiarum. Agronomy* vol. 33, n.4, p. 655-663.
- Brondani, G.E.; Grossi, F.; Wendling, I.; Dutra, L.F. e Araujo, M.A. (2010) - Aplicação de IBA para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Acta Scientiarum. Agronomy*, vol. 32, n. 4, p. 667-674.
- Diniz, J.D.N.; Almeida, J.L.; Teixeira, A.L.A.; Gomes, E.S. e Hernandez, F.F.F. (2003) - Ácido giberélico (GA3) e 6-benzilaminopurina (BAP) no crescimento *in vitro* de macela [*Egletes viscosa* (L.) Less.]. *Ciência e agrotecnologia*. vol. 27, n.4, pp. 934-938.
- Erige, A.C. e Schuch, M.W. (2005) - Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. *Revista Ciência Rural*, vol. 35, n. 4, p. 961-965.
- Ferreira, D.F. (2011) - Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 35, n.6, p. 1039-1042.
- Gahan, P.B. e George, E.F. Adventitious regeneration. In: George, E.F. Hall, A. M. e De Klerk, G.-J. (2008) - *Plant propagation by tissue culture: the background*. 3 ed. Dordrecht: Springer, 2008. vol. 1, p. 355-402.
- George, E.F. e Debergh, P.C. Micropropagation: uses and methods. In: George, E.F.; Hall, A.M.; De Klerk, G.-J. (2008) - *Plant propagation by tissue culture: the background*. 3. ed. Dordrecht: Springer, vol. 1, p. 29-64.
- Grattapaglia, D. e Machado, M.A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S. e Buso, J.A. (1998) - *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, p.183-260.
- Inácio, M.C. (2010) - *Estudo agrônomo, químico e biológico de Cochlospermum regium* (Mart. ex. Schrank): uma planta medicinal do cerrado. 132 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP – Câmpus de Botucatu, SP.
- Joshi, I.; Bisht, P.; Sharma, V.K. e Uniyal, D.P. (2003) - *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *E. grandis* Hill ex Maiden). *Silvae Genetica*, vol. 52, n. 3, p. 110-113.
- Kevers, C.; Franck, T.; Strasser, R. (2004) -

- Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cellular Tissue and Organ Culture*, vol. 77, p. 181-191.
- Lin Y. e Xie Y. (2007) - Study on Tissue Culture Technology of *Eucalyptus dunnii*. *Eucalypt Science & Technology*, vol. 4. n.1. p. 312-323.
- Mankessi, F.; Saya, A.; Baptiste, C.; Nourissier-Mountou, S.; Monteuis, O. (2009) - *In vitro* rooting of genetically related *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* clones in relation to the time spent in culture. *Trees*, vol. 23, n. 5, p. 931-940.
- Murashige, T. e Skoog, F. (1962) - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, vol. 15, p. 473-497.
- Nakhooda, M.; Watt, M.P. e Mycock, D. (2011) - Auxin stability and accumulation during *in vitro* shoot morphogenesis influences subsequent root induction and development in *Eucalyptus grandis*. *Plant Growth Regulation*, vol. 65, p. 263-271.
- Nakhooda, M.; Watt, M.P. e Mycock, D. (2012) - The properties and interaction of auxins and cytokinins influence rooting of shoot cultures of *Eucalyptus*. *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, p. 16568-16578.
- Navroski, M.C.; Reiniger, L.R.S.R.; Pereira, M.O.; Curti, A.R. e Paim, A.F. (2013) - Alongamento *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Cerne*, vol. 19, n. 4, p. 545-550.
- Navroski, M.C.; Reiniger, L.R.S.R.; Araujo, M.M.; Curti, A.R. e Pereira, M.O. (2014) - *In vitro* establishment and multiplication of genotypes of *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Cerne*, vol. 20, n. 1, p. 139-146.
- Negishi, N.; Nakahama, K.; Urata, N.; Kojima, M.; Sakakibara, H. e Kawaoka, A. (2014) - Hormone level analysis on adventitious root formation in *Eucalyptus globulus*. *New Forests*, n. 45, p. 577-587.
- Oliveira, L.S. (2011) - *Micropropagação, microestaquia e miniestaquia de clones híbridos de Eucalyptus globulus*. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 58 p.
- Park, S.W.; Jeon, H.H. e Kim, H.S. (2004) - Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 99, p. 199-205.
- Perez, L.E.P. e Kerbauy, G.B. (2005) - Citocininas. In: Kerbauy, G.B. (Ed.). *Fisiologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 250-278.
- Picoli, E.A.T.; Otoni, W. C.; Figueira, M. L.; Carolino, S. M.; Almeida, R. S.; Silva, E.A.; Carvalho, C.R. e Fontes, E.P. (2001) - Hyperhydricity *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). *Plant Science*, vol.160, p.857-868.
- Ramos, T.V. e Carneiro, I.F. (2007) - Multiplicação "*in vitro*" de *Cattleya mesquitae* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, vol. 37, n. 1, p. 10-15.
- Resende, M.D.V. e Duarte, J.B. (2007) - Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, vol. 37, n. 3, p.182-194.
- Santos, A.P. dos; Xavier, A.; Oliveira, M.L. e Reis, G.G. (2005) - Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones de *Eucalyptus grandis*. *Scientia Forestalis*, Piracicaba, n. 68, p. 29 - 38.
- Santos, D.C.; Wendling, I.; Dutra, L.F. e Fracaro, L.C. (2004) - Alongamento *in vitro* de *Eucalyptus urophylla*. Colombo: EMBRAPA Florestas, *Comunicado Técnico*, 120. 4p.
- Silva, A. B. da; Pasqual, M.; Maciel, A. L.R. e Dutra, L.F. (2003) - BAP e substratos na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos. *Ciência e agrotecnologia*, vol. 27, n.2, p. 255-260.
- Sobrosa, R.C. e Corder, M.P.M. (2003) - Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas e raízes adventícias em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden *in vitro*. *Floresta e Ambiente*, vol.10, n.1, p. 58-68.
- Sotelo, M. e Monza, J. (2007) - Micropropagation of *Eucalyptus maidenii* elite trees. *Agrociencia*, vol. 9, n. 6, p. 81-89.
- Watt, M.P. (2014) - Genotypic-unspecific protocols for the commercial micropropagation of *Eucalyptus grandis* x *nitens* and *E. grandis* x *urophylla*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, vol. 38, p. 125 - 133.
- Whitehouse, A. B.; Marks, T. R. e Edwards, G. A. (2002) - Control of hyperhydricity in *Eucalyptus* axillary shoot cultures grown in liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol.71, n.3, p.245-252.
- Xiuhong, Y.L.X.Y.; Li, M.L.C.W.T.L e Shuangyun, L. (2011) - Tissue Culture *Eucalyptus dunnii*. *Scientia Silvae Sinicae*, vol. 47, n.1, p. 157-161.
- Yang, L. (2006). Studies on effects of different factors on *Eucalyptus dunnii in vitro* culture. *Journal of Fujian College of Forestry*, n.1, p. 78-82.
- Ziv, M. e Ariel, T. (1991) - On the relation between vitrification in stomatal cell wall deformity in carnation leaves *in vitro*. *Acta Horticulturae*, v. 314, p. 121-129.