

Estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais do híbrido *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden.

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

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

INTRODUÇÃO

A falta de opções de espécies do gênero *Eucalyptus* tolerantes a geadas é uma das limitações da expansão de seu cultivo na região sul do Brasil. Neste sentido, tanto o *E. dunnii* como o *E. benthamii* apresentam-se como alternativas para o empreendedor florestal. Adicionalmente, a produção do híbrido interespecífico entre os materiais citados poderá proporcionar benefícios extras, ao associar as vantagens adaptativas e silviculturais das espécies parentais.

As práticas e as técnicas silviculturais convencionais contribuíram significativamente para melhoria da produtividade das espécies florestais, e continuarão a ter um impacto substancial nas plantações comerciais (NEHRA et al., 2005). Nesse sentido, o uso da clonagem está sendo reconhecido pelo mundo inteiro como fator contributivo para o aumento da produtividade (JOSHI et al., 2003).

A propagação vegetativa de *Eucalyptus* já é realidade em várias empresas florestais (XAVIER e COMÉRIO, 1996) e atualmente está ganhando destaque no setor de produção de mudas. Dentre as técnicas de cultura de tecidos de plantas, a micropropagação tem sido a mais difundida e com aplicações práticas comprovadas. Esta já se encontra embutida nos programas de melhoramento, que na maioria das vezes objetivam a maximização ou manutenção do valor genético do clone a ser propagado, permitindo assim, acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa (XAVIER e COMÉRIO, 1997).

Um dos fatores mais críticos na micropropagação de espécies lenhosas refere-se ao sucesso na fase de desinfestação dos explantes. GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) destacam que a dificuldade maior nessa etapa reside em se obter tecido descontaminado, sem conduzi-lo à morte quando isolado, em que os pré-tratamentos aplicados à planta matriz são determinantes para o sucesso dessa etapa. Segundo os mesmos autores, várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes, destacando-se o etanol e os compostos a base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio (NaOCl) e de cálcio.

Quando se utiliza material vegetativo diretamente do campo, os tratamentos desinfestantes são mais criteriosos, em virtude de apresentarem maiores níveis de contaminação (ALFENAS et al., 2004) e as concentrações e tempos de exposições aos agentes desinfetantes devem ser maiores (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), em comparação aos explantes provenientes de ambientes protegidos.

O presente trabalho teve como objetivo testar diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) no estabelecimento de segmentos nodais de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii* oriundos de sistema semi-hidropônico.

MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado para a obtenção dos explantes foi proveniente de minicepas de híbridos de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii* dos clones H12, H19 e H20 propagadas pelo processo de estaquia convencional. As minicepas foram conduzidas em jardim miniclinal em sistema semi-hidropônico de canaletão com areia média em ambiente protegido, recebendo diariamente nutrientes por gotejamento a uma vazão de 5 L m⁻².

Brotações foram coletadas em intervalos de 15 dias e transportadas em ácido ascórbico a 1%. Posteriormente foram lavadas superficialmente com água deionizada, e destas retiraram-se as folhas.

Como explantes, utilizaram-se segmentos nodais contendo um par de gemas axilares sem as folhas e com tamanho de 1,5 cm, os quais foram imersos em solução 70% de álcool (v/v) por 15 segundos, enxagüados com água deionizada e submetidos às concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0% de cloro ativo (NaOCl) acrescidas de Tween 20 (0,01% v/v) durante 10 minutos. Finalmente, foram enxagüados com água deionizada e autoclavada, por três vezes e inoculados em tubos de ensaio (10 cm x 2 cm) contendo 10mL do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 250mg L⁻¹ de PVP-40, 30g L⁻¹ de sacarose, 6g L⁻¹ de ágar e pH 5,8. Após a inoculação, os explantes foram mantidos durante 7 dias no escuro. O ágar foi adicionado após a correção do pH do meio de cultura e então autoclavado à temperatura de 121 °C (1,0 kgf cm⁻²) durante 20 minutos. Os explantes foram cultivados em sala de incubação com temperatura mantida entre 26±2°C, fotoperíodo de 16 horas luz e luminosidade de 84µmol m⁻² s⁻¹.

Avaliou-se semanalmente a contaminação por fungos, bactérias, oxidação e, aos 21 dias, o número de folhas, número de brotações e o comprimento total das brotações dos explantes sadios.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições e 5 explantes por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para todas as variáveis analisadas somente houve efeito significativo do fator clone para a porcentagem de contaminação por bactéria, oxidação e explantes sadios aos 21 dias após a inoculação.

A contaminação por bactéria e oxidação resultaram em pouca influência na fase de estabelecimento, entretanto, a contaminação por fungo requer maior atenção. Nesse caso, tratamento com fungicida previamente à coleta das brotações pode resultar em maior estabelecimento de segmentos nodais (ALFENAS et al., 2004), visto que, independentemente da concentração de cloro ativo utilizada, a média de contaminação com fungo ficou em 41,3%.

Quanto à contaminação por bactéria, o clone H19 apresentou o maior valor médio, com 9% de contaminação, diferindo significativamente dos clones H12 e H20, os quais apresentaram 1 e 0% para essa variável (Figura 1A). Já a porcentagem de oxidação do clone H19 (6%) diferiu significativamente do H20 (0%) (Figura 1B).

Geralmente as concentrações de cloro ativo variam de 0,5 a 2,0% em imersão de até 40 minutos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). ALFENAS et al. (2004) recomendam a concentração de 0,3% de cloro ativo para tecidos mais tenros durante 2 minutos, o que pode apresentar resultados satisfatórios quanto à assepsia para explantes provenientes de ambientes protegidos.

Aos 21 dias após a inoculação o clone H20 foi o que apresentou maior porcentagem de explantes sadios (66%), diferindo dos clones H12 (45%) e H19 (46%) (Figura 1C).

GRATTAPAGLIA e MACHADO (1998) ressaltam que o estado fisiológico da planta de onde são retirados os explantes tem grande influência no posterior comportamento das culturas. Esse fator pode ter influenciado na resposta dos clones quanto aos tratamentos testados, pois os explantes foram provenientes de minicepas cultivadas em jardim miniclinal manejadas em sistema semi-hidropônico. Segundo CAMPINHOS et al. (1999), as vantagens

mais relevantes nesse sistema estão ligadas ao controle mais efetivo de todo o processo, como maior controle da irrigação, nutrição, tratos culturais e pragas e doenças.

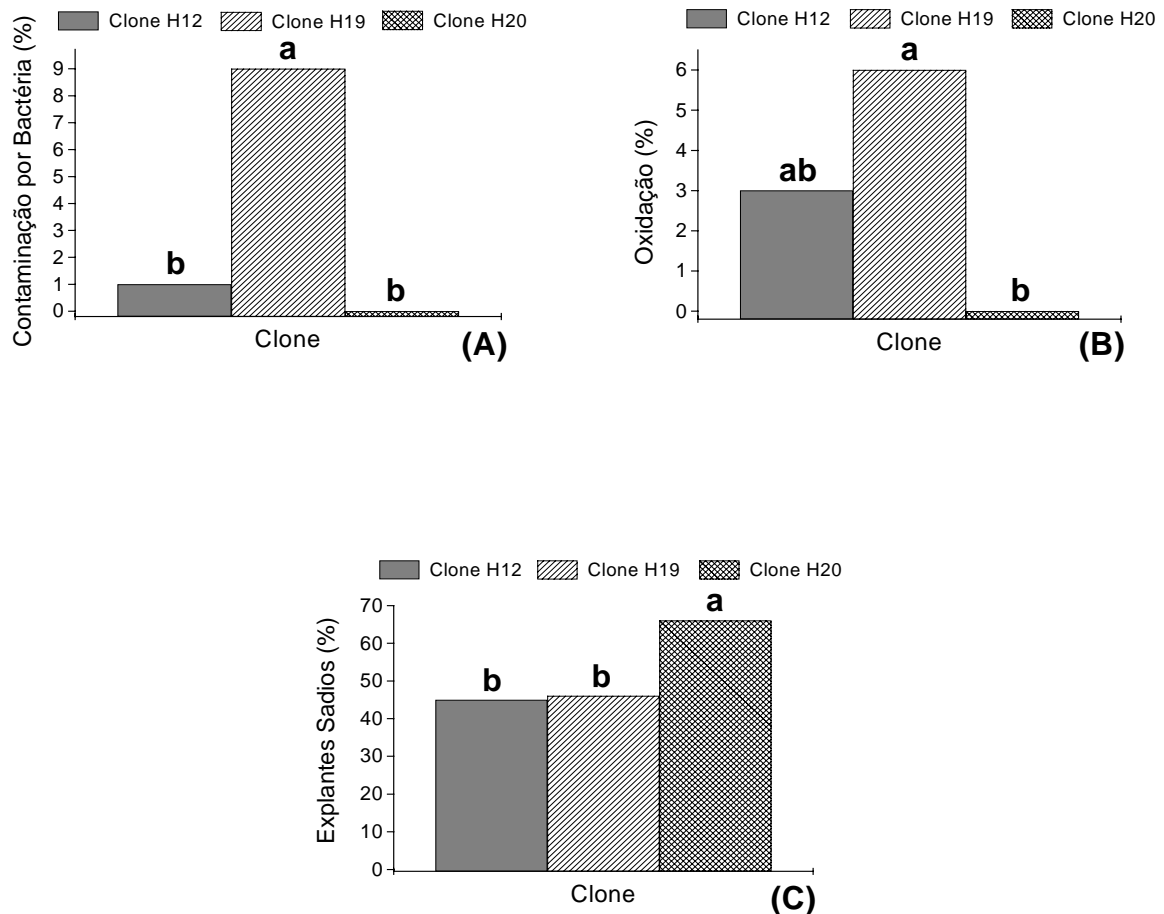


Figura 1. Valores médios da contaminação por bactéria dos explantes (A), porcentagem de oxidação (B) e explantes sadios (C) de híbridos de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii* aos 21 dias após a inoculação. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

CONCLUSÃO

Houve diferença entre os clones com relação à contaminação por bactéria, oxidação e explantes sadios, obtendo-se até 66% de estabelecimento do clone H20 aos 21 dias após a inoculação. A contaminação fúngica é um fator limitante, existindo necessidade de maior controle para essa variável. Não houve diferença significativa entre as concentrações de cloro ativo testadas em relação ao estabelecimento dos clones.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

CAMPINHOS, E. N.; SERVIN, C. M. L.; CARDOSO, N. Z.; ALMEIDA, M. A.; ROSA, A. C. Hidrojardim clonal Champion: uma otimização na produção de mudas de eucalipto. **Silvicultura**, São Paulo, v. 19, n. 80, p. 42-46. 1999.

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

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

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

NEHRA, N. S.; BECWAR, M. R.; ROTTMANN, W. H.; PEARSON, L.; CHOWDHURY, K.; CHANG, S.; WILDE, H. D.; KODRZYCKI, R. J.; ZHANG, C.; GAUSE, K. C.; PARKS, D. W.; HINCHEE, M. A. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 6, p. 701-717, 2005.

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

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Enraizamento “ex vitro” de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e alongadas “in vitro”. **Scientia Forestalis**. n. 51, p. 29-36. 1997.

PALAVRAS-CHAVE

Eucalipto; Cultivo *in vitro*; assepsia; hipoclorito de sódio; segmentos nodais.