

Otimização do protocolo de micropropagação por organogênese indireta de *Eucalyptus grandis*

Optimization of micro propagation protocol by indirect organogenesis of Eucalyptus grandis

Rafael Augusto Arenhart¹, Gilmar Roberto Zaffari²

Recebido em 08/03/2007; aprovado em 11/07/2008.

RESUMO

O presente trabalho objetivou aprimorar o protocolo de micropropagação por organogênese indireta de *Eucalyptus grandis*. Esta espécie é de grande interesse agrônomo e biotecnológico, onde se estuda a inserção de genes exógenos para obtenção de plantas com maior qualidade. A inserção de genes pode ser realizada em tecidos desdiferenciados que devem ser regenerados para a obtenção das plantas modificadas. Explantes foliares e segmentos nodais, obtidos a partir de plântulas de *E. grandis* germinadas *in vitro*, foram inoculados em meios de cultura com diferentes níveis de fitoreguladores na fase de indução de calo e regeneração de brotos. A indução e formação de calo a partir de folhas ocorreram em 100% dos explantes quando cultivados em meio com 2,4-D e meio com TDZ e ANA combinados. A ausência de Fe-EDTA ao meio não influenciou a intensidade de formação de calo nos explantes. A indução e formação de calo a partir de segmento nodal ocorreram em 100% dos explantes quando cultivados em meio com TDZ isolado e combinado com AIA. A regeneração de brotos de *E. grandis* a partir de calo foi induzida quando da presença de BAP isolado e ou combinado com ANA e GA₃ no meio de cultura.

PALAVRAS-CHAVE: propagação *in vitro*, eucalipto, calo.

SUMMARY

The present work had the objective of improving the micro propagation protocol by indirect organogenesis

of *Eucalyptus grandis*. This species has high agronomic and biotechnological interest, triggering gene insertion studies to obtain better quality plants. Exogenous genes can be inserted in callus tissues that must be regenerated to obtain modified plants. Leaf explants and micro cuttings obtained from germinated seedling of *E. grandis* were inoculated in culture medium with different levels of growth regulators in the callus induction and bud regeneration stages. Callus induction and formation in leaf explants occurred in 100 % of samples when cultured in medium with 2,4-D and in medium with combined TDZ and ANA. The absence of Fe-EDTA did not influence the intensity of callus formation in the explants. Induction and callus formation from micro cuttings occurred in 100 % of explants when cultured in medium with TDZ alone and combined with AIA. Bud regeneration of *E. grandis* has been induced in the presence of BAP alone and or combined with ANA and GA₃ in culture medium.

KEY WORDS: *in vitro* propagation, eucalypt, callus.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o sexto maior país em área reflorestada do mundo e, no entanto, o estoque de área reflorestada vem diminuindo desde 1995 (COFO apud BACHA, 2004). Este fato preocupa os economistas, que prevêm para esta primeira década do século XXI uma escassez de madeira de reflorestamento.

Os *Eucalyptus* cobrem a maior área dos reflorestamentos no mundo devido ao grande número

¹UNIVALI/CTTMar, CP 360, CEP 88.302-202, Itajaí, SC, Brasil. E-mail: rafaarenhart@yahoo.com.br

²Epagri/ Estação Experimental de Itajaí, CP 277, CEP 88.301-970, Itajaí, SC, Brasil – UNIVALI/CTTMar, CP 360, CEP 88.302-202, Itajaí, SC, Brasil.

de espécies deste gênero, grande plasticidade ecológica e excelente produção, tornando-o matéria-prima de inúmeras indústrias florestais (FINGER et al. 1993).

Sistemas de cultura *in vitro* oferecem oportunidades de produzir novos genótipos de interesse para a indústria florestal através de processos como mutagênese, variação somaclonal e engenharia genética (CONFALONIERI et al. 2003)

A propagação vegetativa *in vitro* do eucalipto pode ser obtida através da organogênese ou da embriogênese somática. Na organogênese, órgãos como partes aéreas e raízes, podem ser induzidos a formarem tecidos vegetais em cultura por citodiferenciação. Na organogênese direta, ocorre o surgimento direto de gemas a partir de tecidos que apresentam potencial morfogenético na planta *in vitro*, mas que, em geral, não se expressa. Já a organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo. A partir de células não-organizadas do calo, surgem gemas adventícias que crescem e se desenvolvem em novas partes aéreas (GRATAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Uma vez que cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos, as necessidades para seu cultivo *in vitro* tendem a ser únicas. A capacidade de regeneração e o crescimento *in vitro* estão associados não apenas ao genótipo, mas também na atividade fisiológica da planta-matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos, sendo este outro importante fator a se analisar para o sucesso da micropropagação (GRATAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A maior vantagem de se usar a organogênese indireta como ferramenta para a produção de massa clonal e regeneração de plantas, é o seu potencial de desenvolver enormes taxas de multiplicação, reproduzindo grandes quantidades de plantas uniformes (THORPE e BONDI, 1984).

Em virtude da grande dificuldade de micropropagar plantas lenhosas e a diversidade de respostas obtidas conforme cada genótipo, e pelo fato de que a obtenção de plantas geneticamente modificadas necessitam de um sistema de regeneração, objetivou-se neste trabalho estudar a

organogênese indireta de *Eucalyptus grandis*, visando aprimorar o protocolo de micropropagação desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Para os ensaios de micropropagação de *Eucalyptus grandis* foram utilizados explantes do tipo folha e segmento nodal, provenientes de plântulas germinadas *in vitro* com 60 dias, a partir de sementes do viveiro da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri) - Estação Experimental de Itajaí.

Para a indução de calo em folhas, discos foliares (1 cm²) foram inoculados em meio de cultura Murashigue e Skoog (1962) (MS), modificado segundo Cheng (1977), (MSM), sólido na presença e ausência da feniluréia Tidiazuron (TDZ), e as auxinas 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D), Ácido naftalenoacético (ANA) e Ácido 3-indolacético (AIA), isoladas ou combinadas em oito tratamentos, sendo quatro deles sem Fe-EDTA descritos a seguir: C1= MSM; C2= MSM sem Fe-EDTA; C3= MSM + 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4D; C4= MSM sem Fe-EDTA + 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4D; C5= MSM + 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ e 1,0 mg.L⁻¹ de ANA; C6= MSM sem Fe-EDTA + 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ e 1,0 mg.L⁻¹ de ANA; C7= MSM + 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4D e + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA; C8= MSM sem Fe-EDTA + 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4D e + 0,5 mg.L⁻¹ de ANA.

Os testes de indução de calo em segmentos nodais foram realizados a partir de explantes com ± 2 cm de altura e 0,3 cm de diâmetro, os quais foram inoculados em meio MSM na presença de TDZ isolado ou combinado com AIA, em seis tratamentos descritos a seguir: C9= MSM + 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ; C10= MSM + 1,0 mg.L⁻¹ de TDZ; C11= MSM + 2,0 mg.L⁻¹ de TDZ; C12= MSM + 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ e + 0,25 mg.L⁻¹ de AIA; C13= MSM + 1,0 mg.L⁻¹ de TDZ e 0,5 mg.L⁻¹ de AIA; C14= MSM + 2,0 mg.L⁻¹ de TDZ e 1,0 mg.L⁻¹ de AIA.

Para a fase de regeneração de plântulas, os calos obtidos a partir de folha e segmento nodal, foram inoculados em onze tratamentos com meio de cultura MSM, adicionado ou não dos reguladores de crescimento 6-Benzilaminopurina (BAP), ANA, TDZ

e Giberilina (GA_3) isolados e/ou combinados: R01= MSM; R02= MSM + 0,5 mg.L⁻¹ de BAP; R03= MSM + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP; R04= MSM + 0,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,25 mg.L⁻¹ de ANA; R05= MSM + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,5 mg.L⁻¹ de ANA; R06= MSM + 0,5 mg.L⁻¹ de BAP e 0,5 mg.L⁻¹ de GA_3 ; R07= MSM + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,5 mg.L⁻¹ de GA_3 ; R08= MSM + 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ; R09= MSM + 1,0 mg.L⁻¹ de TDZ; R10= MSM + 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ e 0,5 mg.L⁻¹ de GA_3 ; R11= MSM + 1,0 mg.L⁻¹ de TDZ e 0,5 mg.L⁻¹ de GA_3 .

Além dos sais minerais, vitaminas MS e dos reguladores de crescimento, os meios de cultura foram suplementados com sacarose como fonte de carbono, em concentração de 30 g.L⁻¹, o pH foi ajustado para 5,7 e solidificados com Agar-Agar (7 g.L⁻¹). As culturas foram mantidas em câmara de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas com intensidade de luz de 40 a 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 28 \pm 2°C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em 8 tratamentos para a fase de indução de calo em discos foliares, 6 tratamentos para a fase de indução de calo em segmentos nodais, e 11 tratamentos para a fase de regeneração de plântulas, totalizando 25 tratamentos com 5 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de 1 frasco de cultura contendo um disco foliar e/ou segmento nodal na fase de indução de calo e um frasco contendo um calo (1 cm²), obtido do disco foliar e/ou segmento nodal na fase de regeneração de plântula.

As avaliações foram realizadas aos 60 dias quanto à percentagem de explantes que formaram calo, a percentagem de calos que formaram brotos e o número de brotos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de significância de 5% no sistema de análise estatística VARPC®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Indução de calo

Os tratamentos com o meio MSM e MSM sem Fe-EDTA adicionados de 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4D (C3 e C4) não apresentaram diferenças na percentagem de formação de calo, ambos induzindo 100% (Tabela 1). Este resultado difere dos relatos de Ameen et al. (1985), onde afirmam que BAP ou

2,4-D sozinhos no meio, não promovem efeitos na indução de calos em espécies de *Eucalyptus*. Esta é a auxina mais usada na indução de calo em estudos de organogênese indireta segundo George (1993). Apesar disso, o 2,4D é pouco usado na cultura de *Eucalyptus*, e trabalhos como o de Alves et al. (2004) e Gonzalez (2002) mostram o uso apenas de ANA combinado ao TDZ para formação de calo em folhas e segmentos do híbrido de *E. grandis* e *E. grandis* X *E. urophylla*.

A substituição de 2,4D pelos reguladores TDZ e ANA nos tratamentos com o meio MSM e MSM sem Fe-EDTA adicionados de 0,5 mg.L⁻¹ TDZ + 1,0 mg.L⁻¹ de ANA (C5 e C6) respectivamente, resultaram na indução de 100 % de formação de calo. As vantagens da utilização conjunta dos reguladores de crescimento TDZ e ANA são citadas por Lu (1993) e Hosokawa et al. (1996).

Para os testes com segmento nodal (C9 a C14), a presença de TDZ isolado e/ou combinado com AIA ao meio de cultura MSM, promoveu a formação de calo em 100 % dos explantes, independentemente da concentração. A forte indução de calo nos tratamentos adicionados de TDZ pode estar relacionada ao fato do TDZ apresentar uma forma de ação diferente de outras citocininas durante os processos de desdiferenciação e rediferenciação celular como citam Kaneda et al. (1997). A elevada taxa de formação de calo pelo TDZ, também é mostrada em Alves et al. (2004), com segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

Regeneração de plântulas

Os resultados da fase de regeneração de plântulas são mostradas na Tabela 2. Os tratamentos com o meio MSM adicionado de BAP somente ou combinado com ANA (R02, R03, R04 e R05), induziram a regeneração de parte aérea dos calos obtidos a partir de folhas de *E. grandis* variando de 0,80 a 10,80 quanto ao número de brotos formados (Figura 1). A percentagem de calos com regeneração de brotos foi baixa nestes tratamentos, variando de 20 a 40 %.

As folhas de *E. grandis* inoculadas em meio MSM sem reguladores de crescimento, MSM adicionado de BAP combinado com GA_3 , MSM adicionado de TDZ somente e, combinado com GA_3 ,

Tabela 1 - Porcentagem de formação de calo em explantes do tipo folha e segmento nodal de *E. grandis* em meio de cultura Murashigue & Skoog (1962) (MS), modificado segundo Cheng (1977) (MSM), com e sem Fe-EDTA, adicionado ou não de reguladores de crescimento na fase de indução de calo após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamento	Reguladores de Crescimento				Formação de Calo (%)
Meio de Cultura MSM	2,4 D	TDZ	ANA	AIA	
	(mg.L ⁻¹)				
C1	-	-	-	-	0
C2 sem Fe-EDTA	-	-	-	-	0
C3	1,0	-	-	-	100
C4 sem Fe-EDTA	1,0	-	-	-	100
C5	-	0,5	1,0	-	100
C6 sem Fe-EDTA	-	0,5	1,0	-	100
C7	1,0	0,5	-	-	60
C8 sem Fe-EDTA	1,0	0,5	-	-	0
C9	-	0,5	-	-	100
C10	-	1	-	-	100
C11	-	2	-	-	100
C12	-	0,5	-	0,25	100
C13	-	1	-	0,5	100
C14	-	2	-	1	100

não resultaram em regeneração de brotos (R01, R06, R07, R08, R09, R10 e R11).

Os calos obtidos a partir de segmentos nodais inoculados nos tratamentos com o meio MSM adicionado de 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (R02), 1,0 mg.L⁻¹ de BAP (R03), 0,5 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃ (R06), 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃ (R07), e 0,5 mg.L⁻¹ de TDZ + 0,5 mg.L⁻¹ de GA₃ (R10) apresentaram baixo número de brotos regenerados, variando de 0,20 a 3,00.

A adição do regulador de crescimento BAP combinado com ANA nos tratamentos MSM (R04 e R05) resultaram em aumento significativo na quantidade de parte aérea regenerada variando de 26,00 e 19,60, respectivamente e alta porcentagem de calos regenerados (80 e 100%, respectivamente). Usando BAP e ANA (0,2 mg.L⁻¹ cada) e BAP (1,0 mg.L⁻¹), Alves et al., (2004) regeneraram 1 a 5% respectivamente, dos calos dos obtidos a partir de segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Os resultados obtidos apresentaram

valores elevados em comparação a Hérve et al. (2001) que obtiveram 9,9% de calos regenerando gemas utilizando segmentos internodais de clones de *Eucalyptus gunnii*, em meio adicionado de BAP (1,0 mg.L⁻¹).

Ambos os calos (obtidos a partir de folhas e segmentos nodais), submetidos ao tratamento MSM sem adição de reguladores de crescimento (R01), e com os reguladores de crescimento TDZ isolado e combinado com GA₃ (R08 a R11), não apresentaram a regeneração de parte aérea. Em experimentos com *E. grandis* x *E. urophylla*, porém, Gonzalez (2002), mostrou alta frequência na indução de gemas a partir de explantes foliares do híbrido com a aplicação de TDZ. O TDZ demonstra efeito indutor mais pronunciado na formação de brotos do que o BAP, principalmente em espécies arbóreas segundo Lu (1993), não ocorrendo, porém este efeito em nossos tratamentos.

A diferença de repostas na regeneração de brotos entre os calos obtidos de folhas e segmentos

nodais pode estar relacionada as diferentes condições de meio que os dois tipos de explantes foram cultivados anteriormente na fase de indução de calo. Segundo Linsmaier e Skoog (1965), calos de *Medicago sativa* que estavam submetidos a meios com elevada concentração de 2,4D e baixa de KIN, induziram a formação de parte aérea, porém, sem a formação de raízes quando os mesmos foram transferidos para um meio sem a adição de

reguladores. Por outro lado, os calos provenientes de meios contendo baixa concentração de 2,4D e alta de KIN, regeneraram raízes e parte aérea em meio sem reguladores. Outros fatores podem ter contribuído com as diferentes respostas dos tecidos como a expressão genética, a determinação celular, o grau de especialização do explante, e a capacidade de regeneração do tecido que pode variar muito na mesma planta (GEORGE, 1993).

Tabela 2 - Número de brotos formados e porcentagem de calos com regeneração de brotos obtidos a partir de calos de folha e de segmento nodal de *E. grandis* em meio de cultura Murashigue & Skoog (1962), modificado segundo Cheng (1977) (MSM), adicionado ou não de reguladores de crescimento na fase de regeneração de plântulas, após 60 dias de cultivo *in vitro*. (N= 5).

Tratamento	Reguladores de Crescimento				Porcentagem de Regeneração de Broto (%)		Número de Brotos Formados		
	Meio de Cultura MSM	TDZ	BAP	ANA	GA ₃	Calo de Folha	Calo de Segmento Nodal	Folha	Segmento Nodal
		TDZ BAP ANA GA ₃ (mg.L ⁻¹)							
R01		-	-	-	-	0	0	0,00	0,00
R02		-	0,5	-	-	20	20	0,80	1,20
R03		-	1,0	-	-	40	20	10,80	0,20
R04		-	0,5	0,25	-	20	100	0,80	26,00
R05		-	1	0,5	-	40	80	1,80	19,60
R06		-	0,5	-	0,5	0	20	0,00	1,00
R07		-	1,0	-	0,5	0	80	0,00	3,00
R08		0,5	-	-	-	0	0	0,00	0,00
R09		1,0	-	-	-	0	0	0,00	0,00
R10		0,5	-	-	0,5	0	0	0,00	0,00
R11		1,0	-	-	0,5	0	0	0,00	0,00

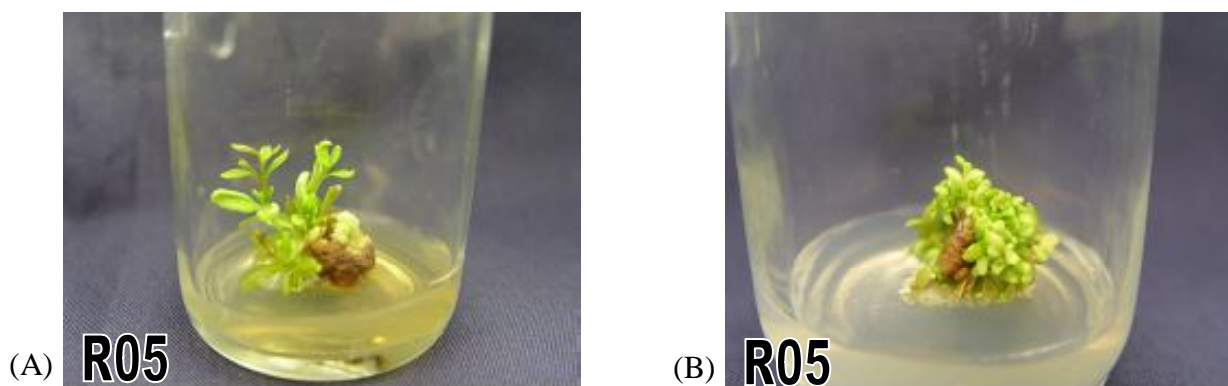


Figura 1 - Regeneração de brotos por organogênese indireta em calos de explantes foliares e segmentos nodais de *E. grandis* em meio de cultura Murashigue & Skoog (1962) (MS), modificado segundo Cheng (1977) (MSM), adicionado ou não de reguladores de crescimento após 60 dias de cultivo *in vitro*. (A) Brotos regenerados de calos obtidos de explantes foliares de *E. grandis*. (B) Brotos regenerados de calos obtidos de segmentos nodais de *E. grandis*. R05 = MSM + 1,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,5 mg.L⁻¹ ANA.

CONCLUSÕES

A aplicação de 2,4D e de TDZ combinado com ANA em explantes foliares e TDZ isolado ou combinado com AIA em segmentos nodais induz elevada formação de calo em *E. grandis*, capacitando os tecidos em responder a aplicação exógena de fitoreguladores.

A ausência de Fe-EDTA no meio da cultura, não influenciou a intensidade de formação de calo nos explantes.

A regeneração de brotos em calos provenientes de folhas ocorre somente com a aplicação exógena de BAP isolado e combinado com ANA.

A obtenção de plântulas de *E. grandis* a partir de segmentos nodais pode ser feita em meio com BAP isolado e combinado com ANA ou GA₃, de forma regular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E.C.S.de; 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 *E.urophylla* s. t. blake. **Árvore**, Viçosa, v.28, n.5, p.643-653, 2004.
- AMEEN, S; *et al.* **In vitro studies on *Eucalyptus camaldulensis*** Dehn. In: PLANT tissue culture (Ed. Ilahi). [S.l.] : Univ. Peshawar Press, p.86-90, 1985.
- CONFALONIERI, M. *et al.* In vitro culture and genetic engineering of *Populus* spp.: synergy for forestry tree improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 72, 109-138, 2003.
- CHENG, T.Y. Factors affecting adventitious bud formation on cotyledon culture of Douglas Fir, **Plant Science Letters**, Amsterdam, v.9, p.179-187, 1977.
- COFO – COMMITTEE ON FORESTRY, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. The global forest resources assesment 2000: summary report. Roma: FAO, 2001, 38p. In: BACHA, C.J.C.; BARROS, A.L.M.de. Reflorestamento no Brasil: evolução crescente e perspectivas para o futuro. **Scientia Forestalis**, São Paulo, n.66, p.191-203, 2004.
- FINGER, C.A.G. *et al.* Produção de florestas de *Eucalyptus grandis* hill ex maiden em segunda rotação, conduzidas com um broto por touça e submetidas a interplântio. **Ciência Florestal**, v.3, n.1, p. 185-201, 1993.
- GEORGE, E.F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Part 1, 2ª Ed., Edington: Exegetics, 1993. p.121-345.
- GONZALEZ, E. R. **Sistema de regeneração de plantas a partir de tecidos de plântulas e clones comerciais de *Eucalyptus grandis* e de *E. grandis* x *E. Urophylla***. 2002. 107 p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Ensino “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2002.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. C.; BUSO, J. A. (eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília : EMBRAPA-CBAB, 1998. v.1. p.183-260.
- HERVÉ, P. *et al.* A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, v.161, p.645-653, 2001.
- HOSOKAWA, K. *et al.* Adventitious shoot regeneration from leaf, stem and root explants of commercial cultivars of *Gentiana*. **Plant Cell Reports**, New York, v.15, p.578-581, 1996.
- KANEDA, Y. *et al.* Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Plant Cell Reports**, New York, v.17, p.8-12, 1997.
- LINSMAIER E.M., SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures, 1965. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. C.; BUSO, J. A. (eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília : EMBRAPA-CBAB, 1998. v.1. p.196.
- LU, C. Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, New York, v.29, p.92-96, 1993.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology of Plants**, 15(3): 473-497, 1962.
- THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry, 1984. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H.

Micropropagation-Technology and Application.
Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991.
p.310-312.