

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
KAROLINE GÜNTHER

**ORGANOGENESE DIRETA *IN VITRO* EM *EUCALYPTUS DUNNII*
MAIDEN: MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO**

CURITIBANOS

2017

KAROLINE GÜNTHER

**ORGANOGENESE DIRETA *IN VITRO* EM *EUCALYPTUS DUNNII*
MAIDEN: MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação
em Agronomia do Centro de Ciências Rurais
da Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito para a obtenção do Título de
Bacharel em Agronomia.
Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta
Fermino Júnior.

CURITIBANOS

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Günther, Karoline
Organogênese direta in vitro em *Eucalyptus dunnii*
Maiden: Multiplicação e enraizamento / Karoline Günther ;
orientador, Paulo Cesar Poeta Fermino Júnior., 2017.
33 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos, 2017.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Eucalipto. 3. Micropropagação. 4.
Segmentos nodais. 5. reguladores de crescimento. I. Cesar
Poeta Fermino Júnior., Paulo. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Agronomia. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Gaboardi km3
CP: 101 CEP: 89520-000 - Curitibanos - SC
TELEFONE (048) 3721-2178 E-mail: agronomia.cbs@contato.ufsc.br.

KAROLINE GUNTHER

Organogênese direta *in vitro* em *Eucalyptus dunnii* Maiden: multiplicação e enraizamento

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Colegiado do Curso de Agronomia, do Campus Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador(a): Prof. Paulo Cesar Poeta Fermino Jr.

Data da defesa:

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

Presidente e Orientador: Paulo Cesar Poeta Fermino Junior
Titulação: Doutorado
Área de concentração em BIOTECNOLOGIA
Universidade Federal do Amazonas

Membro Titular: Lírio Luiz Dal Vesco
Titulação: Doutorado
Área de concentração em RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Titular: Leocir José Welter
Titulação: Doutorado
Área de concentração em GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS
University of Karlsruhe (Alemanha)

Local: Universidade Federal de Santa Catarina
Campus de Curitibanos

AGRADECIMENTOS

A Deus pela confiança depositada e por todas as graças alcançadas.

A minha família, que durante todo o tempo esteve presente, desde os momentos de alegria até os momentos de dificuldade, que nunca mediram esforços para estarem ao meu lado, me incentivando, me dando forças para continuar, meu agradecimento ao meu pai Hermes Günther, a minha mãe Leonilda T. N. Günther e a minha irmã Luciane Günther, sem o apoio e suporte de vocês nada disso seria possível.

Ao meu namorado, Mateus H. B. Morata, que permaneceu comigo em todos os momentos, obrigada pela paciência nos momentos difíceis e pela força e incentivo diário para eu continuar.

Ao meu orientador, Paulo Cesar Poeta Fermino Junior por todo o ensinamento durante os trabalhos realizados, pela dedicação e pela ajuda e suporte durante todo o tempo.

A universidade Federal de Santa Catarina, campus Curitibanos pelo suporte e ensino, e a todos os mestres que de alguma forma contribuíram para meu conhecimento e sabedoria.

Ao coordenador do Laboratório de Genética e Biotecnologia pelo espaço cedido e aos técnicos do mesmo que sempre estiveram dispostos a ajudar.

E a todos os colegas e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação.

Muito Obrigada!

RESUMO

Despertando grande interesse econômico por ser matéria-prima para a produção de papel e com importante potencial madeireiro o eucalipto vem sendo disseminado pelo mundo todo. No Brasil, devido as condições de clima e solo ideais para uma maior produtividade, seu cultivo está em constante crescimento. Com mais de 600 espécies, o gênero *Eucalyptus* se adapta muito bem em diferentes regiões brasileiras. Uma espécie que está se destacando principalmente pela capacidade de adaptação a baixas temperaturas, o que torna possível ser cultivada na região sul do país, é a *Eucalyptus dunnii* Maiden. No entanto, uma característica relevante desta espécie é o baixo potencial de bioinvasão, como produz poucas sementes, há dificuldade em sua propagação. Desta forma, a produção de mudas clonais através da propagação *in vitro* tornou-se um método valoroso. O objetivo do trabalho foi estabelecer a multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* Maiden, utilizando da técnica de micropropagação via organogênese direta, avaliando diferentes concentrações da citocinina 6- benzilaminopurina (BAP) na multiplicação dos segmentos nodais caulinares e cotiledonares, além do efeito das diferentes concentrações da auxina ácido indolbutírico (AIB) no enraizamento. Os experimentos do presente trabalho foram conduzidos no Laboratório de Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, no Campus de Curitibanos. Para a multiplicação *in vitro* de segmentos nodais cotiledonares e caulinares, testaram-se concentrações de BAP, sendo estas, 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹, utilizando o meio de cultura MS. Enquanto que para o enraizamento, testaram-se concentrações de AIB 0,0; 1,0; 2,0; 4,0 mg L⁻¹, sendo estes utilizando-se o meio de cultivo WPM. Para ambos os experimentos o período de cultivo *in vitro* foi de 30 dias para cada etapa. Nas avaliações para a multiplicação *in vitro*, os segmentos nodais caulinares obtiveram aumento no percentual de brotos quando submetidos a baixas concentrações de BAP, enquanto que, para os segmentos nodais cotiledonares a ausência de regulador de crescimento e o uso da concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP apresentaram maior percentual de formação de brotos. Para as avaliações de percentual de enraizamento não houve diferenças estatísticas entre as diferentes concentrações de AIB. Porém, notou-se o aumento das raízes adventícias com o aumento das concentrações de AIB. A propagação *in vitro* de *E. dunnii* com o uso de BAP na multiplicação, e de AIB no enraizamento são biotecnologias viáveis.

Palavras-chave: eucalipto; micropropagação; segmentos nodais cotiledonares; reguladores de crescimento.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Multiplicação *in vitro* de *E. dunnii* a partir de segmentos nodais cotiledonares e segmentos nodais não cotiledonares após 30 dias de multiplicação *in vitro* em meio de cultura MS, suplementados com diferentes concentrações de BAP. A-D) Segmentos nodais cotiledonares. A) Tratamento 1, com concentração de 0,0 mg L⁻¹ de BAP. B) Tratamentos 2, concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP. C) Tratamento 3, com concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP. D) Tratamento 4, com concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP. E-H) Segmentos nodais não cotiledonares. E) Tratamento 1, concentração de 0,0 mg L⁻¹ de BAP. F) Tratamento 2, concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP. G) Tratamento 3, com concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP. H) Tratamento 4, com concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP. 23
- Figura 2** - Porcentagem de formação de calos em segmentos nodais caulinares de *E. dunnii* submetidos a diferentes concentrações de BAP, após 30 dias de multiplicação *in vitro*. 23
- Figura 3** - Porcentagem de oxidação na base de segmentos nodais cotiledonares de *E. dunnii* em diferentes concentrações de BAP, após 30 dias de multiplicação *in vitro*. ... 24
- Figura 4** – Enraizamento *in vitro* de microbrotos de *E. dunnii* em diferentes concentrações de AIB no processo de enraizamento, após 30 dias de enraizamento *in vitro*. A-B) Tratamento 1, concentração de 0,0 mg L⁻¹ de AIB. C-D) Tratamento 2, concentração de 1,0 mg L⁻¹ de AIB. E-F) Tratamento 3, concentração de 2,0 mg L⁻¹ de AIB. G-H) Tratamento 4, concentração de 4,0 mg L⁻¹ de AIB. 26
- Figura 5** - Número de raízes formadas de *E. dunnii* em diferentes concentrações de AIB. 27

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Valores médios para os parâmetros de porcentagem de formação de brotação, calos, oxidação, morte e contaminação, dos segmentos nodais cotiledonares e segmentos nodais caulinares de *E. dunnii* em diferentes concentrações de BAP. 22
- Tabela 2** - Valores médios para a porcentagem de raízes, número de raízes e comprimento, em microbrotos de *E. dunnii* obtidos através de diferentes concentrações de AIB, cultivados *in vitro*. 25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIB – Ácido indol-butírico

BAP – 6-benzilaminopurina

HCl – Ácido clorídrico

IPEF – Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais

MS – Formulação salina (Murashige & Skoog, 1962)

NaOH – Hidróxido de sódio

pH – Potencial hidrogeniônico

PIB – Produto Interno Bruto

WPM – Wood Plant Medium (Lloyd & McCown, 1980)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVOS.....	12
1.1.1	Objetivo Geral	12
1.1.2	Objetivos Específicos.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Cultivo de eucalipto.....	13
2.2	<i>Eucalyptus dunnii</i> Maiden.....	14
2.3	Propagação de <i>Eucalyptus dunnii</i>	15
2.4	Micropropagação.....	15
2.5	Enraizamento.....	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Material vegetal.....	19
3.2	Germinação <i>in vitro</i>	19
3.3	Multiplicação <i>in vitro</i>	19
3.4	Enraizamento <i>in vitro</i>	20
3.5	Delineamento experimental e análises estatísticas	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1	Multiplicação <i>in vitro</i>	21
4.2	Enraizamento <i>in vitro</i>	25
5	CONCLUSÃO	28
	ABSTRACT.....	29
	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

Pertencente ao gênero *Eucalyptus*, da família das Myrtaceae, originário da Austrália e da Indonésia e com mais de 600 espécies, o eucalipto é considerado uma das principais matérias primas para a produção de papel. No Brasil, devido ao clima e solo, o eucalipto encontrou boas condições para o seu crescimento e produtividade. Por este motivo o país possui 4,8 milhões de hectares de florestas de eucalipto plantadas, dos quais 1,8 milhão é utilizado na indústria de celulose e de papel (IMA FLORESTAL, 2015).

Dentre tantas, a espécie *Eucalyptus dunnii* Maiden vem se destacando na indústria florestal. Um dos motivos é a sua adaptabilidade as baixas temperaturas, com isso vem sendo muito cultivado na região sul do país, que apesar de já possuir um plantio bem intensificado, possuía dificuldades com espécies que não eram adaptadas ao frio. Além de ser resistente as geadas severas, o *E. dunnii* possui outra característica relevante, o baixo potencial de bioinvasão, com isso, há dificuldade na sua propagação aleatória, uma vez que a mesma produz poucas sementes (ALMEIDA; MARTINS; DUTRA, 2008).

A propagação do eucalipto pode ser sexuada ou através da propagação vegetativa (assexuada), dependendo do seu destino final. No Brasil, para a produção de madeira para compensados, estruturas e serrados para fins energéticos são utilizadas mudas que foram formadas a partir de sementes. Enquanto que, para a produção de pastas de celulose e de indivíduos elite são utilizadas mudas clonais (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006; GOLLE et al., 2009).

A principal diferença entre obtenção de mudas por sementes ou clonais está na homogeneidade dos cultivos. Mudanças obtidas a partir de sementes geram cultivos heterogêneos, as quais podem possuir diferentes genótipos. Enquanto mudas clonais geram cultivos homogêneos, sem diferença entre os genótipos, pois estas mudas são obtidas de árvores pré-definidas, utilizando de alta tecnologia e intenso manejo (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Devido ao fato de que muitas espécies florestais, como a *E. dunnii*, possuem como característica a baixa produção de sementes, sendo que alguns métodos alternativos são utilizados para sua propagação, podendo ser utilizado o método de miniestaquias e a produção de mudas clonais através do cultivo *in vitro*, sendo este um método bastante viável para a sua propagação, uma vez que a pouca produtividade de sementes gera um custo relevante para a obtenção das mesmas (ALMEIDA; MARTINS; DUTRA, 2008).

A produção clonal das mudas pode ser obtida através do método de miniestaqui ou da micropropagação. Sendo que a miniestaquia é um método oriundo da macroestaquia, sendo que na miniestaquia utiliza-se as brotações de plantas que foram propagadas através de sementes ou pelo processo de macroestaquia (WENDLING; FERRARI; GROSSI, 2002; ALFENAS et al., 2004). Neste método, primeiramente é necessário realizar a quebra da dominância apical da macroestaca enraizada, esta quebra é realizada através da poda e posteriormente a planta emitirá novas brotações, sendo que estas serão utilizadas como miniestacas (ALFENAS et al., 2004). Geralmente, estas possuem cerca de 4 a 8cm, contendo um par de folhas quando utilizadas miniestacas de base e dois pares quando utilizados miniestacas de ápice ou ponta. As empresas florestais, quando trabalham com clones de *Eucalyptus* vem utilizando bastante este método (ALMEIDA *et al.*, 2007)

Enquanto que o método de micropropagação, utiliza a totipotência para gerar uma nova planta. Cada célula, quando submetida as condições ideais, possui a capacidade para produzir uma nova planta. Através deste método é obtido um clone de alta qualidade da planta-mãe, de modo rápido, uniforme e em grande escala (ALMEIDA; MARTINS; DUTRA, 2008).

A micropropagação possui várias etapas, desde a escolha da planta-mãe até a formação do clone. Primeiramente é necessário escolher uma planta que possua características desejáveis para serem clonadas, sendo que duas das principais delas são a adaptabilidade a climas frios e boa produtividade. Em seguida se faz necessário a desinfestação do material escolhido e do meio nutritivo que virá a ser utilizado. Posteriormente a multiplicação dos propágulos, enraizamento e aclimatização em ambiente *ex vitro* (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Para que todas essas etapas sejam realizadas, são utilizados protocolos. Sendo que estes são procedimentos padrões para propagar uma espécie *in vitro*. Para algumas espécies florestais ainda há necessidade de maiores informações para compor os protocolos, por este motivo a importância de novos estudos para a espécie de eucalipto *E. dunnii*, uma vez que esta é adaptada para a região Sul do país (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial morfogênico na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* Maiden.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Comparar o efeito de diferentes concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais cotiledonares (epicótilo e hipocótilo) e caulinares.
- Avaliar o efeito das concentrações de AIB no enraizamento *in vitro* de microbrotos regenerados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CULTIVO DE EUCALIPTO

O eucalipto é mundialmente conhecido, possui grande diversidade de espécies de fácil adaptação e pode ser encontrado em diversos países. Um dos motivos da sua expansão é por possuir múltiplos usos, como por exemplo, produção de celulose, madeira sólida, revestimentos, fonte de carvão vegetal para a geração de energia, entre outros (IMA FLORESTAL, 2015).

O Brasil está entre os principais produtores de eucalipto, pois possui extensas áreas que possibilitam a expansão das florestas plantadas. Minas Gerais é o estado que mais possui área plantada no país, com aproximadamente 1,6 milhões de hectares, Mato Grosso do Sul aparece na segunda posição com cerca de 886,3 mil hectares plantados, seguindo do estado de São Paulo, com 870 mil hectares (FLORIANI, 2009; VIEGAS, 2015).

O Brasil possui condições climáticas que são ótimas para o crescimento e desenvolvimento do mesmo. O setor florestal contribui significativamente na economia do país, uma vez que representa 4,5% do PIB e 6,3% das exportações nacionais, com apenas 0,67% de área ocupada para o cultivo. Outro fator relevante está na geração de empregos através dos cultivos, com cerca de 4,1 milhões de empregos diretos e indiretos gerados no país (VIEGAS, 2015; IBA, 2016)

Santa Catarina vem ganhando destaque no setor florestal, uma vez que algumas regiões possuem sua economia voltada para o setor. O estado possui grande potencial para o seu

desenvolvimento, porém, a região do Planalto enfrenta dificuldades em relação a espécie a ser cultivada, uma vez que a região necessita de espécies que possuem genótipos resistentes ou adaptados ao frio. Com isso, o grande desafio da região é a busca constante por material genético tolerante (FLORIANI, 2009). Uma das espécies que vem sendo estudada no Planalto é a *Eucalyptus dunnii*, pois a mesma apresenta bons resultados em relação a tolerância ao frio, além de uma boa aptidão na produção de madeira e fins energéticos (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006).

2.2 *Eucalyptus dunnii* Maiden

A espécie é originária da Austrália, em duas áreas distintas: Sudeste de Queensland (QLD) e no Noroeste de New South Wales (NSW). Pertence ao gênero *Eucalyptus* e a família das Myrtaceae (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006). Dentre a diversidade de espécies de eucalipto, *E. dunnii*, se destaca pela tolerância ao frio, pelo seu potencial econômico e de exploração, devido a este motivo vem sendo muito estudada pela região sul do país, a qual sofre grandes perdas nos cultivos devido as geadas (SOUZA, 2006; ALMEIDA; MARTINS; DUTRA, 2008).

Eucalyptus dunnii é indicado para regiões que possuem temperatura mínima absoluta de até -5°C, podendo suportar até 22 geadas anuais, desde que a redução de temperatura seja gradual na estação fria (FLORIANI, 2009). A precipitação anual necessita ser em torno de 845mm e 1.950mm, com chuvas regulares no verão. Em relação a temperatura, a máxima no mês mais quente é em torno de 24°C a 31°C, a temperatura mínima no mês mais frio -1°C e a temperatura média anual variando entre 12°C e 22°C (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006; SOUZA, 2006; BRONDANI, 2008).

Em regiões nas quais o clima tende ao tropical, o *E. dunnii* apresenta crescimento semelhante ao do *E. grandis*, isso nos três primeiros anos, pois após esse período observa-se um declínio de crescimento, caso não ocorra a umidade necessária disponível no solo (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006; OBERSCHELP, 2014).

O solo mais indicado para o cultivo do *E. dunnii*, precisa ser úmido e de boa fertilidade natural, principalmente basáltica, mas a espécie se desenvolve bem em solos originários de argilito, derivados de rochas sedimentares, os quais possuem boa drenagem (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006; OBERSCHELP, 2014).

Anualmente a espécie cresce aproximadamente três centímetros em diâmetro e três metros em altura. A madeira é resistente com uma densidade básica de 500kg/m³, a qual pode ser utilizada para produção de celulose e estruturas leves, possui bom potencial para confecção de painéis compensados e de chapas de madeira-cimento, a espécie ainda é considerada uma fonte alternativa para fins energéticos na região Sul do Brasil. A sua casca pode variar de cor com o passar do tempo e sua madeira é de coloração clara (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006; BRONDANI, 2008; OBERSCHELP, 2014).

2.3 PROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus dunnii*

Sementes de eucalipto possuem dimensões muito pequenas e com baixo peso. Dependendo da espécie, com um grama é possível formar mudas para plantar um hectare, pois o número de sementes viáveis por grama varia de 150 a 1.000. A espécie *E. dunnii*, não faz parte desta estimativa, devido ao fato da sua baixa produtividade de sementes (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006; ALMEIDA; MARTINS; DUTRA, 2008).

A baixa produção de sementes da *E. dunnii*, faz com que a mesma tenha baixo potencial de bio-invasão, dificultando assim sua propagação, com isso torna a semente de alto custo e de difícil acesso. Por este motivo uma das alternativas para a produção de mudas é através da micropropagação, pois além de gerar um clone da planta-mãe, a propagação *in vitro* garante um plantio homogêneo, em larga escala e em um pequeno período de tempo (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006; ALMEIDA; MARTINS; DUTRA, 2008).

2.4 MICROPROPAGAÇÃO

Micropropagação é uma técnica utilizada para a propagação de plantas *in vitro*, a qual inclui cultura de ápices caulinares e segmentos nodais, organogênese e formação de gemas adventícias em explantes. A mesma viabiliza a clonagem de diversas espécies, resultando na formação de clones a partir de pequenos fragmentos de uma planta matriz (TORRES et al., 2000).

Entre os gêneros florestais, o eucalipto é um dos que mais possui estudos sobre a micropropagação. Sendo que um dos primeiros trabalhos relatados da utilização no eucalipto no cultivo *in vitro* foi na década de 60. Um dos objetivos da propagação *in vitro* está na necessi-

dade de clonar híbridos que possuem altas taxas de crescimento e que sejam tolerantes a baixas temperaturas. Tornando este um dos motivos do estudo da micropropagação da espécie *E. dunnii* (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Um dos fatores que determinam o êxito da cultura de tecidos vegetais é a origem do explante e o meio nutritivo onde são cultivados. Existem vários meios de cultura que estão sendo utilizados. Em geral, são compostos de macro e micronutrientes, sais minerais, reguladores de crescimento, vitaminas e outros suplementos orgânicos (VENTURA et al., 2002). Dentre os mais variados meios utilizados, o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e o WPM (Lloyd & McCown, 1981) são os mais utilizados.

A micropropagação é composta por diversas etapas, sendo que para um bom resultado final, todas as etapas devem ser realizadas com muito cuidado e atenção. Primeiramente é necessário realizar a seleção dos explantes, para espécies lenhosas recomenda-se a utilização de brotações em estágio primário de crescimento ou utilizar propágulos oriundos da germinação através de sementes *in vitro*, pois as mesmas devem estar viáveis e livres de patógenos (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Após a escolha dos explantes, é necessário a etapa de desinfestação. Neste processo são utilizados princípios ativos e desinfetantes, para que através da imersão do material nos mesmos ocorra a eliminação dos microrganismos que causam contaminação. Entre os desinfetantes mais utilizados estão: álcool 70%, hipoclorito de sódio e detergentes e para cada espécie é recomendado um determinado tempo de imersão em cada desinfetante até a tríplice lavagem, quando então o explante estará desinfetado (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

Em seguida, o explante estará em condições ideais para a fase de multiplicação e alongamento, sendo que nestas fases o objetivo é obter um elevado número de brotos ou gemas, com a mínima variação genética possível, no menor intervalo de tempo e livre de contaminante. O meio de cultura utilizado nesta fase também irá variar de acordo com a necessidade da espécie, além disso, muitas vezes são utilizados os reguladores de crescimento, para que ocorra uma indução nos explantes, sendo o 6-benzilaminopurinas (BAP) o mais utilizado em espécies lenhosas (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

Por último, o enraizamento e aclimatização. Estas são as etapas cruciais para a sobrevivência do material vegetal. Basicamente o enraizamento pode ocorrer *in vitro* ou *ex vitro*, estudos relatam que a escolha de um ou outro irá depender da espécie utilizada, além dis-

so, no *in vitro* se utiliza os meios de culturas com auxinas, que são indutores de enraizamento enquanto no *ex vitro* se utiliza apenas o substrato. Posteriormente, após a formação e crescimento das raízes, tem o processo de aclimatização que é indispensável para o sucesso da microplanta. A umidade do ambiente e o substrato são os principais fatores da climatização, sendo que nesta etapa a planta sairá das condições ideais e será exposta gradativamente as condições adversas, até que esteja apta as condições naturais do ambiente. Todas estas etapas compõem a micropropagação, processo que possui diversas vantagens. Porém, muitas vezes o processo é lento e bastante trabalhoso, além de demandar tempo e técnicas, por estes motivos apresentando também alguns pontos negativos (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; BATISTA, 2012; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

As técnicas de cultura de tecidos auxiliam na preservação das espécies, tendo como principais vantagens o manuseio de grande número de indivíduos em espaço reduzido e sob condições assépticas. O cultivo *in vitro* é uma ferramenta importante para a obtenção de plantas livres de pragas e doenças, proporcionando a produção de um número significativo de novas mudas uniformes e com características idênticas a da planta mãe (FIGUEIREDO et al., 2007; BATISTA, 2012). Um dos problemas na micropropagação é o alto risco de contaminação nas suas diferentes fases, uma vez que na propagação *in vitro* as mesmas se dividem em seleção de explante, obtenção de culturas livres de contaminantes, multiplicação dos propágulos vegetativos, enraizamento e aclimatização na condição *ex vitro*. Dentre um dos processos conhecidos para obtenção destas plantas em larga escala, está a organogênese (BATISTA, 2012).

A organogênese no processo de micropropagação *in vitro* é bastante complexa, pois envolve fatores internos e externos, os quais interagem com a fonte do explante e com o meio de cultura utilizado. Basicamente a organogênese acontece através da otimização entre a citocinina/auxina presente no meio de cultura, e pode responder de forma direta, quando a diferenciação ocorre diretamente do explante, ou indireta, quando a resposta se manifesta primeiramente em forma de calos (BATISTA, 2012).

A técnica de micropropagação permite a clonagem de híbridos de *Eucalyptus* de alto valor e de difícil acesso, em um curto período de tempo e em larga escala. Porém para o êxito desta técnica para a espécie *E. dunnii*, há a necessidade de protocolos estabelecidos. Devido a este motivo, inúmeros estudos vêm sendo realizados para que se torne possível estabelecer os mesmos e com isso garantir a expansão dos cultivos de eucalipto na região Sul do Brasil (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; BATISTA, 2012).

2.5 ENRAIZAMENTO

Após todos os procedimentos de desinfecção e multiplicação é realizado a etapa de enraizamento. Esta etapa tem como objetivo a obtenção de plantas completas, uma vez que as mesmas já estarão com brotações alongadas, estas serão induzidas para a formação das raízes adventícias. Existem duas formas de enraizamento, o induzido *in vitro* e o *ex vitro*. Neste caso a diferença é que *in vitro* a indução das raízes ocorre em meio de cultura em laboratórios com ambiente controlado, enquanto na *ex vitro* a indução do enraizamento das brotações ocorre diretamente em substrato (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

O enraizamento *in vitro* pode ser realizado em diversos meios de cultura que são definidos através da espécie que será utilizada. Além disso, são utilizadas também as auxinas, pois elas induzem o enraizamento. Dentre as variadas auxinas existentes, o ácido indolbutírico (AIB) é o mais utilizado, uma vez que apresenta baixa fitotoxicidade aos explantes, possibilitando que o enraizamento *in vitro* apresente resultados positivos (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

São considerados resultados positivos no processo de enraizamento quando o mesmo apresenta uma elevada porcentagem de raízes, além do sistema radicular apresentar boa qualidade, sendo que esta qualidade é determinada através da quantidade de raízes, comprimento das mesmas e a ausência de calos na base. As raízes *in vitro* visualmente são grossas, sem pelos radiculares e não são ramificadas (OBERSCHELP, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal utilizado para a realização deste trabalho, foi oriundo de sementes de *Eucalyptus dunnii* Maiden doadas pelo IPEF (Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais). As sementes foram armazenadas em refrigerador (9 °C) no Laboratório de Biotecnologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos, onde também foram realizadas todas as etapas do presente trabalho.

3.2 GERMINAÇÃO *IN VITRO*

As sementes foram limpas com detergente e água corrente para retirada de resíduos superficiais. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, foram desinfestadas em solução comercial de hipoclorito de sódio 2,5% por 30 minutos, e na sequência lavadas três vezes em água destilada e esterilizada. Posteriormente, dez sementes foram inoculadas em cada frasco de vidro contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar-ágar (Vetec®), e vedados com filme PVC para a germinação *in vitro*. As sementes germinadas foram utilizadas como fonte de explante para a etapa de multiplicação *in vitro*.

3.3 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

Plântulas germinadas *in vitro* foram excisadas na porção dos segmentos nodais cotiledonares (epicótilo e hipocótilo) e plantas jovens após 90 dias, com aproximadamente 7,0 cm de comprimento, foram excisadas nas porções dos e segmentos nodais caulinares (1,0 cm) contendo duas gemas. Os segmentos nodais foram transferidos para frascos de vidro contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹), 6 g L⁻¹ de ágar-ágar.

O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com NaOH e HCl a 0,5N antes da esterilização por 15 min a 1,3 kgf cm⁻². Os frascos foram selados com parafilme e as culturas foram mantidas em sala de crescimento com 25 ± 2 °C, intensidade luminosa de 60 μmol m⁻² s⁻¹ obtidas com lâmpadas fluorescentes Sylvania® branca fria, com 16 h de luz de fotoperíodo,

com uma distância de 10-12 cm de altura das culturas. Após trinta dias os explantes foram avaliados nos seguintes parâmetros: porcentagem de formação de brotação, de calos, oxidação na base, contaminação e morte dos explantes.

3.4 ENRAIZAMENTO *IN VITRO*

Microbrotos regenerados nos diferentes tratamentos de multiplicação, com aproximadamente 5,0 cm de comprimento foram transferidos para frascos de vidro contendo meio de enraizamento com 30 mL de meio de cultura WPM (Lloyd, McCown, 1980), suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose, diferentes concentrações de AIB (0; 1,0; 2,0; 4,0 mg.L⁻¹), 6 g L⁻¹ de ágar-ágar. Após 30 dias de cultivo, os microbrotos foram avaliados quanto ao percentual de enraizamento, número de raízes regeneradas e comprimento médio das mesmas.

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os tratamentos para a multiplicação *in vitro* foram organizados em delineamento fatorial 2x4, sendo utilizados dois tipos de explante com 4 concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹), contendo seis repetições, sendo cada repetição composta por 5 segmentos nodais em dois frascos referentes aos nós caulinares, e dois segmentos nodais em cada repetição dos nós cotiledonares.

No experimento de enraizamento foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, contendo cinco repetições cada, sendo que cada repetição era composta de 10 microplantas em dois frascos. Os dados foram submetidos a análise da variância (ANOVA), e análise de regressão linear quando detectadas diferenças significativas, seguido do teste de separação de médias Tukey (P <0,05), utilizando-se o programa computacional R.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

A formação de brotações adventícias a partir de diferentes tipos de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* ocorreu em todos os tratamentos avaliados (Figura 1), inclusive na ausência de regulador de crescimento (Tabela 1). A comparação estatística do percentual de formação de brotos entre as diferentes concentrações de BAP a partir de segmentos nodais cotiledonares revelou a inexistência de diferenças significativas ($p < 0,05$). Com o uso de segmentos nodais caulinares como fonte de explante para a multiplicação, os maiores percentuais de brotação ocorreram na ausência de regulador de crescimento e no uso de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.

Nas concentrações de 0 e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP o percentual de formação de brotos foi maior nos segmentos nodais cotiledonares em relação aos segmentos nodais caulinares.

De maneira geral, quando se trabalha com a multiplicação de *Eucalyptus*, as concentrações de citocinina podem variar de $0,1$ a $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, sendo que estes valores variam de acordo com a espécie e com a citocinina utilizada. Além disso, é importante ressaltar que os resultados da multiplicação *in vitro* são diretamente influenciados pelo estado fisiológico da planta e da parte vegetal utilizada como explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O segmento nodal a ser utilizado pode influenciar na organogênese pela idade ou pelo tipo utilizado, sendo que o mesmo pode ser cotiledonar ou caulinar. Fermino-Junior; Nagao e Pereira (2009) em estudos realizados com *Tectona grandis* L.f, mostraram que quando utiliza-se explantes mais jovens se tem uma indução mais eficiente de organogênese de brotos, sendo assim, a necessidade de adição exógena de BAP menor comparada com explantes adultos. Enquanto que em estudos realizados com *Citrus* sp, foi possível observar que quando foram utilizados segmentos nodais caulinares houve uma diminuição da organogênese. Este fato é explicado pela distância do mesmo em comparação ao segmento nodal cotiledonar, conseqüentemente, quanto mais distante do segmento nodal cotiledonar menor será a formação de gemas (MOREIRA DIAS et al. 2001). Para a espécie *Parapiptadenia*, também foram observados que os melhores resultados para a regeneração *in vitro*, ocorreram em segmentos nodais cotiledonares (NASCIMENTO, 2008).

Quando se trata do fitorregulador BAP, para a porcentagem de brotos, estudos realizados por Bennett et al. (1994) e Obershelp (2014), mostraram que quando se utiliza doses maiores de 0,5 mg L⁻¹ de BAP, é notável o decréscimo na porcentagem de gemas por explantes multiplicadas. Enquanto que para a uvaieira (*Eugenia pyriformis* Cambess), a concentração de BAP que proporciona melhor desenvolvimento das brotações e gemas por explante foi de 1,0 mg L⁻¹(NASCIMENTO et al. 2008). Diferentemente destes estudos, para a espécie arbórea *Hancornia speciosa*, não a necessidade de uso de reguladores de crescimento para a sua multiplicação *in vitro*, visto que, nos experimentos realizados, a ausência de BAP apresentou os melhores resultados (OLIVEIRA; FREIRE; ALOUFA; 2016).

Tabela 1 - Valores médios para os parâmetros de porcentagem de formação brotação, calos, oxidação, morte e contaminação, dos segmentos nodais cotiledonares e segmentos nodais caulinares de *E. dunnii* em diferentes concentrações de BAP.

mg. L	% Brotação		% Calos		% Oxidação		% Morte		%Contaminação	
	NCO	NCA	NCO	NCA	NCO	NCA	NCO	NCA	NCO	NCA
0	83,3Aa	60Ab	0Aa	90Ab	33,3Bb	100Aa	16,7Aa	23,3Aa	16,7Aa	16,7Aa
0,5	91,7Aa	83,8Aa	33,3Aa	83,3Ab	75Aa	100Aa	8,3Aa	16,7Aa	0Aa	0Aa
1,0	58,3Aa	43,3Aa	8,3Aa	33,3Cb	16,7Cb	100Aa	16,7Aa	16,7Aa	16,7Aa	16,7Aa
2,0	100Aa	53,3Ab	16,7Aa	46,7Bb	33,3Bb	100Aa	0Aa	33,3Aa	0Aa	33,3Aa
Méd.	83,32	57,6	14,57	63,32	39,57	100	10,42	22,5	8,35	16,67
CV%	35,5	57,25	179,8	49,43	87,06	0	293,94	175,35	346,41	232,38

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). **NCO:** Nó Cotiledonar; **NCA:** Nó Caulinar; **Méd.:** Médias. **CV:** Coeficiente de variação.

O segundo parâmetro avaliado foi o percentual de formação de calos nos diferentes tipos de segmentos nodais (Tabela 1). Em segmentos nodais cotiledonares cultivados em meio de cultura isento de regulador de crescimento não formou massa calogênica (Figura 1.A). A adição de BAP em diferentes concentrações no meio de cultura promoveu a formação de calo em segmentos nodais cotiledonares em todas as concentrações, não exibindo diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) no percentual de calogênese.

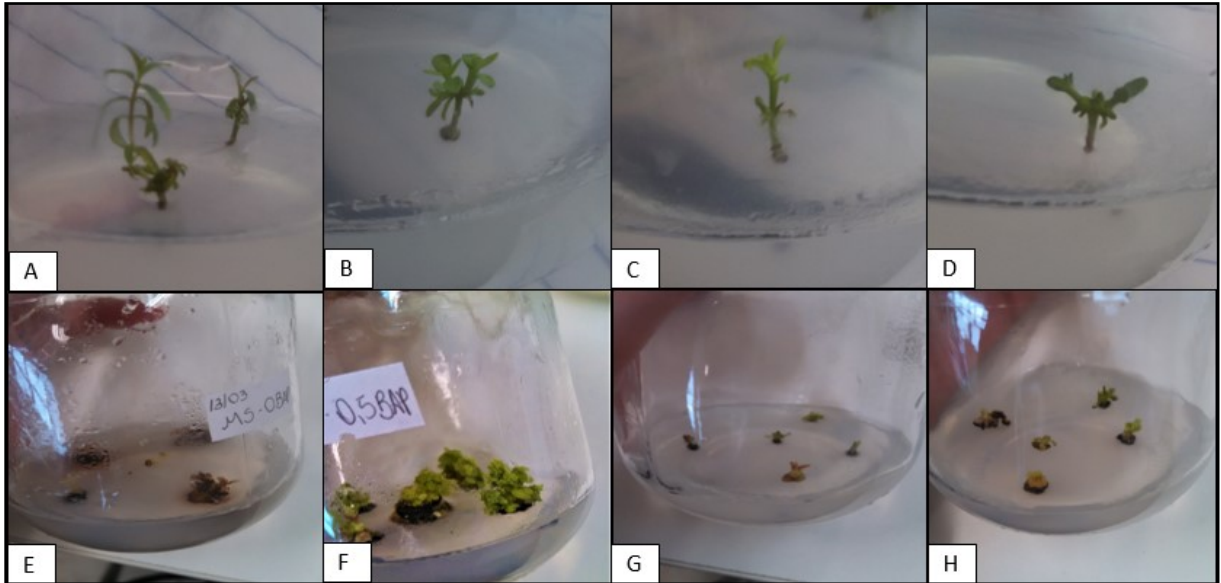


Figura 1 – Multiplicação *in vitro* de *E. dunnii* a partir de segmentos nodais cotiledonares e segmentos nodais não cotiledonares após 30 dias de multiplicação *in vitro* em meio de cultura MS, suplementados com diferentes concentrações de BAP. **A-D)** Segmentos nodais cotiledonares. **A)** Tratamento 1, com concentração de 0,0 mg L⁻¹ de BAP. **B)** Tratamentos 2, concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP. **C)** Tratamento 3, com concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP. **D)** Tratamento 4, com concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP. **E-H)** Segmentos nodais não cotiledonares. **E)** Tratamento 1, concentração de 0,0 mg L⁻¹ de BAP. **F)** Tratamento 2, concentração de 0,5 mg L⁻¹ de BAP. **G)** Tratamento 3, com concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP. **H)** Tratamento 4, com concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP.

O percentual de formação de calos em segmentos nodais caulinares foi maior na ausência de reguladores de crescimento (Figura 1.E) e no uso de 0,5 mg L⁻¹ de BAP (Tabela 1). O uso de maiores concentrações de BAP no meio de cultura em segmentos nodais caulinares promoveu a diminuição da calogênese até a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de BAP, expressos por equação quadrática na análise de regressão (Figura 2) com coeficiente de determinação (r^2) de 0,76.

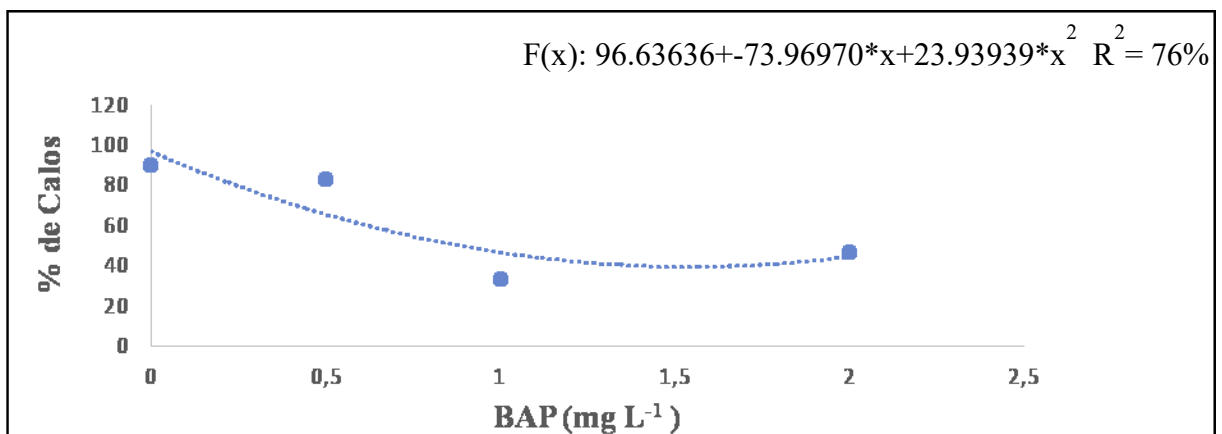


Figura 2 - Porcentagem de formação de calos em segmentos nodais caulinares de *Eucalyptus dunnii* submetidos a diferentes concentrações de BAP, após 30 dias de multiplicação *in vitro*.

Segundo estudos, em espécies lenhosas é bastante comum a formação de calos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), sendo que estes são formados quando ocorre o equilíbrio entre as auxinas e citocininas (GUERRA; NODARI, 2006). Para a *Schizolobium amazonicum*, estudos mostraram que maiores concentrações de citocinina provocaram o aumento na porcentagem de calos (BOTIN; CARVALHO, 2015). Em segmentos nodais cotiledonares de *Parapiptadenia rigida*, quando submetidos as concentrações de BAP também foram observados a formação de calos, neste caso, a ocorrência dos mesmos pode ser explicada pelo fato de que a espécie já possui níveis endógenos de auxinas, sendo que estes são suficientes para a sua multiplicação, sem a necessidade de maiores concentrações de auxinas (NASCIMENTO, 2008). Por mais comum que a calogênese seja, é válido ressaltar que na micropropagação a mesma é indesejável, uma vez que pode afetar o crescimento e desenvolvimento dos explantes.

A oxidação na base dos segmentos nodais cotiledonares e caulinares ocorreu em todos os tratamentos utilizados. Os maiores percentuais de oxidação foram observados em segmentos nodais caulinares (Tabela 1). Em segmentos nodais cotiledonares, o maior percentual de oxidação ocorreu com o uso de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. O aumento da concentração de BAP no meio de cultura com segmentos nodais cotiledonares promoveu diminuição no percentual de oxidação, expressos por equação quadrática de análise de regressão (Figura 3) com coeficiente de determinação (r^2) de 0,81. Em segmentos nodais caulinares o percentual de oxidação foi máximo (100%) em todos os tratamentos.

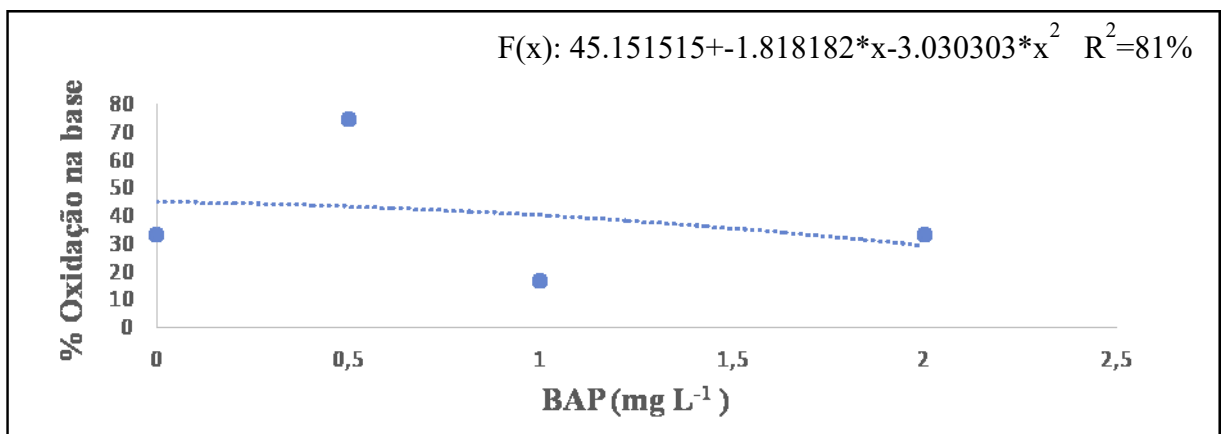


Figura 3 - Porcentagem de oxidação na base de segmentos nodais cotiledonares de *Eucalyptus dunnii* em diferentes concentrações de BAP, após 30 dias de multiplicação *in vitro*.

Segundo Silva et al. (2007) quando se trabalha com o estabelecimento *in vitro* de lenhosas, um dos obstáculos é a oxidação dos explantes. Diversos fatores podem influenciar na

oxidação, como por exemplo a fase de desenvolvimento da planta, porém o que tem maior influência é o genótipo da planta (WERNER et al. 2009). Além disso, as angiospermas quando excisadas tendem a secretar substâncias fenólicas que podem modificar o meio de cultura, afetar a absorção de metabólitos e conseqüentemente causar oxidação (ANDRADE et al. 2000).

O percentual de morte (necrose) e o percentual de contaminação dos segmentos nodais cotiledonares e caulinares não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos com o uso de BAP (Tabela 1).

4.2 ENRAIZAMENTO *IN VITRO*

A formação de raízes adventícias nos microbrotos regenerados ocorreu em todos os tratamentos, inclusive na ausência de reguladores de crescimento (Tabela 2). O uso de diferentes concentrações de AIB não promoveu diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) no percentual de enraizamento de microbrotos.

Tabela 2 - Valores médios para a porcentagem de raízes, número de raízes e comprimento de microbrotos de *Eucalyptus dunnii*, obtidos através de diferentes concentrações de AIB, cultivados *in vitro*.

AIB (mg.L ⁻¹)	Enraizamento (%)	Nº de raízes	Comprimento (cm)
0	43,20A	1,10D	2,24A
1,0	63,20A	3,70C	2,36A
2,0	100A	6,04A	0,94A
4,0	50A	4,94B	1,46A
Médias	64,10	3,94	1,75
CV%	60,93	41,74	57,55

Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na vertical diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV: Coeficiente de variação.

O número de raízes adventícias regeneradas (Figura 4.A-H) em *Eucalyptus dunnii* apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes concentra-

ções de AIB. O maior número de raízes foi observado com o uso de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, o menor número de raízes na ausência de AIB. O aumento da concentração de AIB promoveu o aumento do número de raízes adventícias, expresso por equação quadrática de análise de regressão

(Figura 5), com coeficiente de determinação (r^2) de 0,98. O comprimento médio das raízes adventícias não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos com o uso de AIB.



Figura 4 – Enraizamento *in vitro* de microbrotos de *Eucalyptus dunnii* em diferentes concentrações de AIB no processo de enraizamento, após 30 dias de enraizamento *in vitro*. **A-B)** Tratamento 1, concentração de $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB. **C-D)** Tratamento 2, concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB. **E-F)** Tratamento 3, concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB. **G-H)** Tratamento 4, concentração de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB.

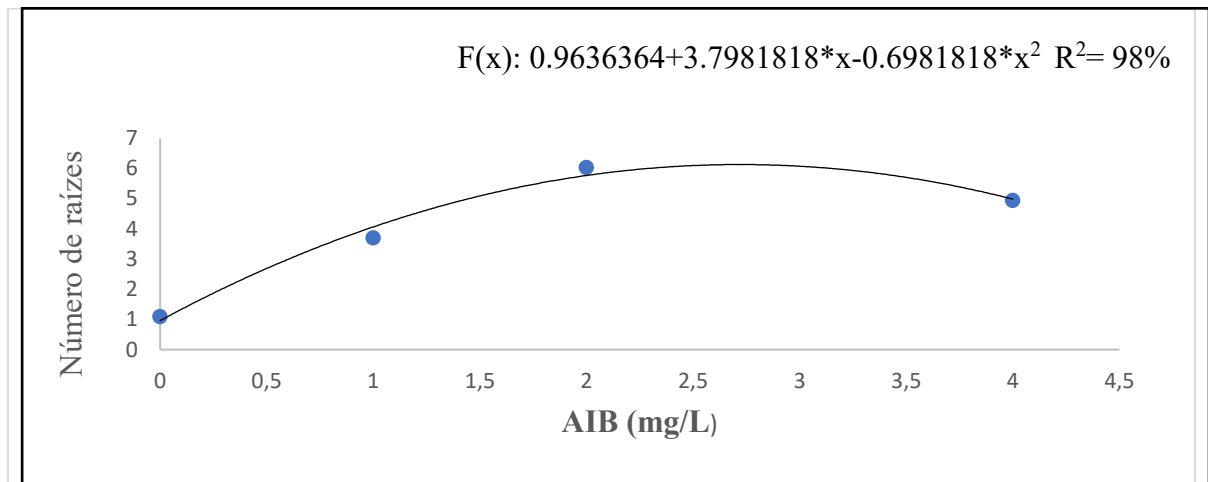


Figura 5 - Número de raízes formadas de *Eucalyptus dunnii* em diferentes concentrações de AIB.

As concentrações de AIB tem resultados variados de acordo com os parâmetros avaliados, visto que, cada espécie necessita de uma quantidade específica de auxina, como mostra os estudos realizados por Mercier (2004), que durante o processo de enraizamento a necessidade de concentração de auxina varia de acordo com a fase organogenética que a mesma se encontra, como uma maior concentração é mais utilizada na fase de indução, consequentemente pode ocorrer a redução ou até mesmo a inibição do crescimento destas raízes em concentração elevadas.

Porém, segundo Souza *et al.* (2011) estes dados podem variar de acordo com a concentração interna de auxina da espécie em estudo e com o genótipo das mesmas, além disso, o período em que a mesma fica exposta a estas auxinas pode influenciar o resultado final.

Para a formação de raízes, Radmann *et al.* (2014) avaliou que concentrações de AIB foram essenciais para a formação de raízes em arbóreas, visto que, não houve formação de raízes, ou houve um pequeno número de raízes sem a adição de AIB. Outro estudo realizado por Soares e Miranda (2016) confirma que a melhor dose de AIB em citros foi de 2,0 e 1,0 mg L⁻¹ de AIB. Pode-se citar também os estudos de Silva *et al.* (2013) que realizou estudos com *Psychotria ipecacuanha* – poaia, e mostrou que a melhor concentração de AIB para a formação de raízes foi de 1,5 mg L⁻¹ de AIB.

Além disso, segundo estudos de Pedrotti (2001) quando se utiliza auxinas no meio de cultura, doses elevadas podem influenciar a formação de calos. Neste experimento, só não

houve a formação de calos na concentração de 0,0 mg L⁻¹ de AIB, nas demais concentrações (1,0; 2,0; 4,0 mg L⁻¹ de AIB) houve a formação de calos.

5 CONCLUSÃO

A adição de diferentes concentrações de BAP no meio de cultura não promoveu aumento no percentual de brotação em segmentos nodais cotiledonares e caulinares. Entretanto, em segmentos nodais caulinares, baixas concentrações de BAP promoveram aumento no percentual de brotação de *Eucalyptus dunnii*.

Os segmentos nodais cotiledonares apresentaram maior percentual de brotação na ausência de regulador de crescimento e no uso de 2,0 mg L⁻¹ de BAP.

O uso de menores concentrações de BAP em segmentos nodais caulinares promoveu melhores resultados na porcentagem de brotação, sendo 0,5 mg L⁻¹ a melhor concentração.

O uso de maiores concentrações de BAP no meio de cultura em segmentos nodais caulinares promoveu a diminuição da calogênese.

Os maiores percentuais de oxidação foram observados em segmentos nodais caulinares em todas as concentrações utilizadas.

O uso de diferentes concentrações de AIB não promoveu diferenças estatisticamente significativas no percentual de enraizamento de microbrotos. No entanto, o aumento da concentração de AIB promoveu o aumento do número de raízes adventícias.

O uso da concentração de 2,0 mg L⁻¹ de AIB apresentou melhor resultado no número de raízes.

ABSTRACT

Awakening great economic interest as a raw-material for the production of paper and with important wood potential, eucalyptus has been disseminated all over the world. In Brazil, due to ideal climate and soil conditions for higher productivity, the cultivation is constantly growing. With more than 600 species, the genus *Eucalyptus* adapts very well in different Brazilian regions. A species that is mainly characterized by the ability to adapt to low temperatures, which makes it possible to be cultivated in the southern region of the country, is *Eucalyptus dunnii* Maiden. However, a relevant feature of this species is the low bio-invasion potential, as it produces few seeds, there is difficulty in its propagation. In this way, the production of clonal seedlings through in vitro propagation has become a valuable method. The objective of this work was to establish the in vitro multiplication of *Eucalyptus dunnii* Maiden using micropropagation technique via direct organogenesis, evaluating different concentrations of the cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) in the multiplication of the cauline and cotyledon nodal segments, as well as the effect of the different concentrations of auxin indolebutyric acid (IBA) in rooting. The experiments of the present work were conducted at the Laboratory of Genetics and Biotechnology, Federal University of Santa Catarina, at the Curitibanos Campus. For in vitro multiplication of cotyledonary and cauline nodal segments, BAP concentrations were tested, being these 0,0; 0.5; 1.0 and 2.0 mg L⁻¹, using the MS culture medium. While for rooting, concentrations of AIB 0.01 were tested; 1.0; 2.0; 4.0 mg L⁻¹, these being the WPM culture medium. For both experiments the in vitro culture period was 30 days for each step. In the evaluations for in vitro multiplication, the nodal segments obtained an increase in the percentage of shoots when submitted to low concentrations of BAP, whereas for the cotyledon nodal segments the absence of growth regulator and the use of the concentration of 2.0 mg L⁻¹ of BAP showed a higher percentage of shoot formation. For the rooting percentage evaluations there were no statistical differences between the different concentrations of IBA. However, the increase of the adventitious roots was noted with increasing concentrations of IBA. The in vitro propagation of *E. dunnii* with the use of BAP in multiplication, and IBA's in rooting are viable biotechnologies.

Keywords: eucalyptus; micropropagation; cotyledon nodal segments; growth regulators.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442p.
- ALMEIDA, J. R.; MARTINS, C. R.; DUTRA, L. F. Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* visando estabelecimento *in vitro*. **Revista da Fzva**, Uruguaiana, v. 15, n. 1, p.54-60, 2008..
- ALMEIDA, F. D. et al. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 455-463, 2007.
- ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-MG, v. 24, n. 1, p.174-180, 2000.
- BATISTA, T. R. **ORGANOGENESE E EMBRIOGENESE SOMÁTICA DE HÍBRIDO DE *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla***. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012. Disponível em: <[http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/327/1/DISSERTAÇÃO Organogênese e embriogênese somática de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.pdf](http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/327/1/DISSERTAÇÃO%20Organogênese%20e%20embriogênese%20sômática%20de%20híbrido%20de%20Eucalyptus%20grandis%20x%20Eucalyptus%20urophylla.pdf)>. Acesso em: 22 mar. 2017.
- BENNETT, I. J. *et al.* Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. **Annals of Botany**, v. 74, p.53-58, 1994.
- BOTIN, A. A.; CARVALHO, A. Reguladores de crescimento na produção de mudas florestais. **Revista de Ciências Agroambientais**, Alta Floresta, v. 13, n. 1, p.1-14, jan. 2015. Disponível em: <http://www.unemat.br/revistas/rcaa/docs/vol13-1/10_artigo_rcaa_v13n1a2015.pdf> . Acesso em: 20 ago. 2017.
- BRONDANI, G. E. **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus Bentharii* Maiden e *Cambage* X *eucalyptus dunnii* Maiden**. 2008. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A propagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 1, n. 58, p.49-59, jun. 2009. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/17093/1/Ar5.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2017.
- FERMINO JUNIOR, P. C. P.; NAGAO, E. O.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestales**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p.4 27-435, 2009.
- FIGUEIREDO, M. A.; SANTOS, F.M.; COSTA E SILVA, J.O.; COSTA, F.H.S.; PASQUAL, M. Variações no Meio de Cultura sobre o Crescimento *in vitro* em Híbridos de Orquídea. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, p.294-296, 2007.

FLORIANI, M. M. P. **RELAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO FRIO DE *Eucalyptus* spp. COM A CONCENTRAÇÃO FOLIAR DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS TOTAIS E PROLINA**. 2009. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2009. Disponível em:

<<http://www.tede.udesc.br/bitstream/handle/1089/1/PGPV09MA042.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2017.

GOLLE, D. P. et al. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 39, n. 5, p.1607-1614, ago. 2009. FapUNIFESP (SciELO).

<http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782009000500050>. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000500050>. Acesso em: 21 mar. 2017.

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

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Material didático de apoio à disciplina de biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina**. 2006. Disponível em:

www.cca.ufsc.br/ldgv/Apostila.htm. Acesso em: 14 mai. 2011.

IBA - INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **O Setor brasileiro de árvores plantadas**. Brasil: Iba, 2016. 100 p. Disponível em:

<http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2016_.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2017.

IMA FLORESTAL (Minas Gerais). **Eucalipto no Brasil**. 2015. Disponível em:

<<http://www.imaflorestal.com/noticias/eucalipto-no-brasil-02-03-2015>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

IPEF (Piracicaba). ***Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2017. Disponível em:

<<http://www.ipef.br/identificacao/cief/especies/dunnii.asp>>. Acesso em: 14 abr. 2017.

LLOYD G., MCCOWN B. 1980. **Micropropagation of mountain laurel, *Kalsmia latifolia*, by use of shoot tip culture**. of International Plant Propagators's Society 30:421-427.

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G.B. (ed.). **Fisiologia vegetal**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 217-249, 2004.

MOREIRA-DIAS, J. M. et al. Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. **Scientia Horticulturae**, v. 87, p. 275-290, 2001.

MURASHIGE T, SKOOG FA 1962. **A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures**. Plant Physiol, 473-479.

NASCIMENTO, A. C. et al. MICROPROPAGAÇÃO DE UVAIEIRA (*Eugenia pyriformis* Cambess): EFEITOS DO BAP E AIB. **Revista Verde**, Mossoró, v. 3, n. 2, p.1-7, jun. 2008.

NASCIMENTO, P. K. V. **Regeneração in vitro de Parapiptadenia rigida (Bentham) Brennan**. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

OBERSCHELP, G. P. J. **Propagação in vitro de Eucalyptus dunnii Maiden: desenvolvimento de um novo meio basal e estimação de parâmetros genéticos para características morfofisiológicas**. 2014. 161 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Florestal, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. **Micropropagação de espécies florestais brasileiras**. 76. ed. Colombo: Pesquisa Florestal Brasileira, 2013. 17 p.

OLIVEIRA, K. S.; FREIRE, F. A. M.; ALOUFA, M. A. I. **Efeito de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético sobre a propagação in vitro de hancornia speciosa**. Curitiba, v. 46, n. 3, p.1-8, 5 out. 2016. Universidade Federal do Paraná.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T.; FERREIRA, C. A. **Eucaliptos Indicados para Plantio no Estado do Paraná**. Colombo: Embrapa, 2006. 45 p. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Doc129_CD_000fjvbecby02wyiv80sq98yqioستqmo.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2017.

PEDROTTI, E.L., VOLTOLINI, J.A. Enraizamento *ex vitro* e aclimação do porta-enxerto de macieira M.9. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2,p 234-239, 2001.

RADMANN, E. B. et al. Enraizamento in vitro e aclimatização do porta-enxerto de ameixeira 'MR. S. 2/5'. **Plant Cell Cult. Micropropag**, Lavras, v. 10, n. 2, p.1-11, nov. 2014.

SILVA, M. L. et al. Germinação in vitro e organogênese direta em explantes hipocotiledonares com polaridade invertida de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p.1-8, mar. 2013.

SILVA, L. C.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A.; ERIG, A. C.; ANTUNES, L. E. C. Efeito da iluminação e pré-lavagem das brotações de mirtilo cv. Florida no estabelecimento in vitro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 1, p. 127-129, 2007

SOARES, B. O. MIRANDA, V. S. Enraizamento in vitro e aclimatização ex vitro de cultivares de citros. **Revista de Ciências Agrárias - Amazon Journal Of Agricultural And Environmental Sciences**, v. 59, n. 2, p.144-151, set. 2016. Editora Cubo Multimedia. <http://dx.doi.org/10.4322/rca.2119>.

SOUZA, A. V. *et al.* Conservação e enraizamento *in vitro* de infalível (*Mandevilla veluntina* K. Schum), uma planta medicinal do Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, p.319-327, 2011.

SOUZA, M. A. M. **Metodologias não destrutivas para avaliação das tensões de crescimento em Eucalyptus dunnii Maiden**. 2006. 90 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006. Disponível em: <[http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/13676/tese formatada corrigida cu-ba.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/13676/tese%20formatada%20corrigida%20cu-ba.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 21 mar. 2017.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A.T.; DE SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. D. M.; ROMANO, E. **Glossário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128p

VENTURA, G. M.; DIAS, J. M. M.; TEIXEIRA, L. S.; CARVALHO, S. V.; MOTOIKE, Y. S.; NOVAIS, F. R.; CECON, R. P. Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e auxiliares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 47, n. 286, p. 613-628, 2002.

VIEGAS, A. **MS tem a segunda maior área com eucalipto no país, diz IBGE**: Estado tem 886,3 mil hectares cultivados com a espécie. Árvore ocupa 99,36% da área de florestas plantadas em MS. 2015. Disponível em: <<http://g1.globo.com/mato-grosso-do-sul/noticia/2015/11/ms-tem-segunda-maior-area-com-eucalipto-no-pais-diz-ibge.html>>. Acesso em: 21 mar. 2017.

WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; GROSSI, F. **Curso intensivo de viveiros e produção de mudas**. Colombo: Embrapa Florestas, 2002. 48 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 79).

WERNER, E. T.; CUZZUOL, G. R. F.; PESSOTTI, KAMILA, V.; LOPES, F. P.; ROGER, J. A. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.