

MILA LIPARIZE DE OLIVEIRA

MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* EM  
BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência Florestal, para  
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

## RESUMO

OLIVEIRA, Mila Liparize de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2009. **Micropropagação de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreatores de imersão temporária.** Orientador: Aloisio Xavier. Coorientadores: Ricardo Miguel Penchel Filho, João Batista Teixeira e Wagner Campos Otoni.

O uso de biorreatores tem sido uma alternativa na micropropagação de algumas espécies, por contribuir para automação em determinadas fases do cultivo de plantas e possibilitar a produção em larga escala. Neste sentido, este estudo avaliou a micropropagação via proliferação de gemas axilares nas fases de multiplicação e alongamento *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* com o uso de biorreatores de imersão temporária. Na fase de multiplicação, foram realizados experimentos individuais com o objetivo de testar diferentes meios de cultura (MS, WPM, QL e JADS), combinações entre os fitorreguladores BAP e ANA, diferentes relações entre fontes de nitrogênio (nitrato e amônio), comparar o cultivo em ágar e em meio líquido, diferentes manejos de frequência de imersão (2, 4, 8 e 16 horas) e suportes de apoio dos explantes (papel filtro e espuma), assim como um sistema de ventilação com entrada de ar adicional acoplado ao recipiente dos biorreatores, quanto às características massa fresca, número de brotos e hiper-hidricidade dos explantes, cultivados em biorreatores RITA<sup>®</sup>. Na fase de alongamento, avaliou-se a influência de diferentes períodos de cultivo (14, 21, 28 e 35 dias) no alongamento *in vitro* de multibrotações cultivadas em biorreatores de imersão temporária RITA<sup>®</sup> e BIT<sup>®</sup> (meio líquido) e em potes plásticos (meio semissólido). Na etapa de multiplicação, o meio de cultura MS, a combinação 1,0 µM de BAP com 0,5 µM de ANA, a relação 3:1 de N(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>):N(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), os menores intervalos entre as imersões (2 e 4 horas) e o suporte papel filtro promoveram maior massa fresca e número de brotos por explante, sendo o cultivo em biorreator RITA<sup>®</sup> superior ao ágar para estas características. Houve diferença quanto ao desenvolvimento das culturas entre os dois clones avaliados. O aumento da concentração de amônio no meio (relações 1:1, 1:2 e 1:3

de  $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ ) levou ao menor vigor dos explantes, e a injeção adicional de ar ( $0,8 L min^{-1}$ ) ao recipiente do biorreator RITA<sup>®</sup> não influenciou o desenvolvimento das culturas. No geral, as culturas apresentaram alto percentual de hiper-hidricidade, sendo esta desordem um fator limitante nas condições deste estudo para o cultivo de *Eucalyptus* em biorreatores, não sendo percebida nas plantas cultivadas em meio semissólido. No alongamento, o biorreator BIT<sup>®</sup> e o cultivo em ágar nos potes plásticos promoveram maiores médias de ganho em massa fresca e número final de brotos em todas as idades de avaliação, porém o alongamento dos brotos não foi satisfatório, sendo a maior parte dos brotos (>60%) classificados na classe de tamanho de 0,0-2,0 cm. Há necessidade de ajuste do manejo da cultura nas fases de multiplicação e alongamento para a obtenção de brotos com maior vigor aptos a enraizar em condições *ex vitro*, a fim de que esta técnica possa se tornar viável em larga escala.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Mila Liparize de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2009. **Micropropagation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clones in temporary immersion bioreactors.** Advisor: Aloisio Xavier. Co-advisors: Ricardo Miguel Penchel Filho, João Batista Teixeira and Wagner Campos Otoni.

The use of bioreactors has been an alternative tool for the micropropagation of several species, contributing to the automation in certain phases of the *in vitro* cultivation, though enabling large-scale production. Accordingly, this study evaluated the micropropagation by means of axillary buds proliferation in the multiplication and elongation stages *in vitro* of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clones using temporary immersion bioreactors. During multiplication stage in RITA<sup>®</sup> bioreactors, experiments were performed with the aim of testing the influence of several factors on fresh weight, number of shoots per explant and hyperhydricity of the culture, among them: culture media (MS, WPM, QL and JADS); BAP and NAA combinations; ratios between nitrogen sources (nitrate and ammonium); cultivation in agar solidified and liquid media; different managements of immersion frequencies (2, 4, 8 and 16 h) and type of support of the explants (filter paper and foam); and a ventilation system with additional air input coupled to the bioreactor containers. In the elongation step, it was evaluated the influence of different periods of cultivation (14, 21, 28 and 35 d) in elongation *in vitro* of explants cultured in temporary immersion bioreactors RITA<sup>®</sup> and BIT<sup>®</sup> (liquid medium) and in plastic pots (semi-solid medium). In multiplication stage, the culture medium MS, the combination of 1.0 µM BAP and 0.5 µM NAA, the ratio 3:1 of N(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>):N(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), the smallest intervals between immersions (2 and 4 h) and support filter paper promoted greater fresh weight accumulation and number of shoots per explant; for these characteristics, the RITA<sup>®</sup> system was more efficient as compared to agar-jellified medium. There was a remarkable difference in the development of cultures between the two clones evaluated. The increase in ammonium concentration in the culture medium (1:1, 1:2 and 1:3 of N(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>))

:N(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) led to smaller effect of explants and the injection of additional air (0.8 L min<sup>-1</sup>) to the RITA<sup>®</sup> bioreactor container did not influence the development of the cultures. In general, under the experimental conditions, cultures displayed high percentages of hyperhydricity, and this physiological disorder was a limiting factor for the *Eucalyptus* cultivation in bioreactors, but not for plants grown in semi-solid agar medium. In the elongation phase, the BIT<sup>®</sup> bioreactor and cultivation on agar in plastic pots promoted the highest fresh weight accumulation and the final number of shoots at all ages during assessment; however, shoot elongation was not satisfactory, with most shoots (> 60%) within the of class-size of 0.0-2.0 cm. In conclusion, there is a need to adjust of the culture management in multiplication and elongation steps, in order to obtain shoots with greater vigor and competence to root in *ex vitro* conditions, in order to make this technique potentially viable to be applied to a large scale shoot production.