

Alongamento e enraizamento de brotações de *Eucalyptus grandis* L. utilizando diferentes meios de cultivos e tipos de luz

Thiago Furlan¹¹; Luiz Claudio Offemann²; Ricardo Felipe Braga de Sousa³; Gustavo Ferreira Coelho⁴; Ricardo Faria⁵; Adônis Moreira⁶

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de ANA e BAP e tipos de luz no alongamento e enraizamento de brotações de *E. grandis* L. Foram utilizados explantes com 40 dias, após ter sido induzido em um meio de iniciação e multiplicação. Foram testados dois diferentes meios de cultivo, interagindo com 4 diferentes qualidades de luz, em seguida transferidos para um meio de enraizamento. As avaliações do crescimento e desenvolvimento de gemas do clone mostraram-se que para o meio ANA e o tratamento ausente de luz demonstrou capacidade de produzir brotos maiores que 15 mm, meio 2 e luz 4 demonstrou inferioridade em relação aos demais. A ideal situação para micropropagação é utilizar um meio para multiplicação de brotos seguida da indução de enraizamentos. Broto proveniente de meio de cultivo com hormônios tem melhor capacidade de enraizamento.

Palavras-chave : *Eucalyptus* , micropropagação, *in vitro*, cultura de tecido

Elongation and rooting of *Eucalyptus grandis* L. shoots using different means of crops and types of light

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effect of NAA and PAB and types of light on elongation and rooting of shoots of *E. grandis* L. The explants were used 40 days after being induced in a medium of initiation and multiplication. Two different culture medium were tested, interacting with four different qualities of light, then transferred to a rooting medium. The evaluate of growth and development of shoots of clone have shown that for medium and NAA and light without treatment demonstrated ability to produce greater than 15 mm buds, medium PAB and transparent light showed inferiority to others. The ideal situation is to use a micropropagation medium for multiplication of shoots followed the induction of rootedness. Bud from the culture medium with hormones has better ability to rooting.

Keywords: *Eucalyptus*, micropropagation, *in vitro*, tissue culture

^{1,5,6}Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Cx. Postal 6001, CEP. 86051-990, Londrina, Paraná. tfurlan2@hotmail.com

^{2,3,4}Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do oeste do Paraná, Rua PERNANBUCO, 1777, Marechal Cândido Rondon, Paraná. l.offemann@hotmail.com

Introdução

O *Eucalyptus* pertence à família *Myrtaceae* (Subfamília *Leptospermoidae*), são conhecidas mais de 650 espécies diferentes de *eucalyptus*, sendo bem adaptados a praticamente todas as condições climáticas. Em outros continentes, algumas espécies de *Eucalyptus* têm importância econômica relevante, devido ao fato de crescerem rapidamente. Na América do sul existem extensas plantações das espécies *E.urophylla* e *E.grandis*(SBS, 2013).

A maioria das espécies conhecidas são árvores típicas de florestas altas atingindo entre 30 a50 metros de altura e de florestas abertas, com árvores menores, entre 10 e 25 metros de altura. Plantios clonais de híbridos de *eucalyptus* podem produzir até 50 m³ha⁻¹ano⁻¹. As principais espécies plantadas em climas tropicais e subtropicais são: *E. grandis*, *E. salignae* *E. urophylla*. Em regiões de clima temperado são plantados o *E. dunnii* e *E. viminalis*. As florestas plantadas existentes no Brasil em 2013 totalizaram cerca de 5,6 milhões de hectares, sendo 3,4 milhões de hectares com eucalipto. A produção florestal provê a principal fonte de polpa celulósica para produção de papel de alta qualidade, madeira para construção e carvão vegetal. Outros produtos também podem ser obtidos, como por exemplo, óleos essenciais e mel (SBS, 2013).

O método mais econômico de propagação vegetativa é por enraizamento de estacas. Este pode ser realizado com algumas espécies de *Eucalyptus*, mas, como foi bem documentado por Pryor e Willing (1963), está limitado a plantas muito jovens. Entretanto, como em outros métodos vegetativos, também há problemas com o desenvolvimento de técnicas de cultivo de tecidos adequadas para propagar árvores seletas adultas (GUPTA; MASCARENHAS, 1987).

A iniciação de raízes em material adulto é evitada pelo aumento de uma substância inibidora do enraizamento em árvores mais velhas. Deste modo, no momento em que as árvores de *Eucalyptus* alcançam uma idade em que podem ser avaliadas por florestais e geneticistas, geralmente já passaram do estado na qual podem ser facilmente propagadas na forma vegetativa (Patonet al. 1970, FURZE; CRESSWELL, 1985).

Como método para a propagação de genótipos superiores a micropropagação tem algumas vantagens em relação com os métodos tradicionais pois permite propagar árvores adultas sem a necessidade de abatê-las. Obtêm-se milhares de réplicas em pouco espaço e independentemente da época do ano e os propágulos são facilmente armazenáveis e intercambiáveis entre programas de melhoramento (TRUJILLO, 2005).

A propagação vegetativa de indivíduos elite permite multiplicar exatamente todas as características de interesse, como: taxas de crescimento rápido, qualidade da madeira, conteúdo de óleos essenciais, resistência a enfermidades e insetos, etc. Se as técnicas de propagação são

as adequadas para permitir a produção de plantas em escala comercial, logram-se plantações geneticamente superiores e com um grau de uniformidade que facilita e melhora todas as atividades de manejo e exploração (TRUJILLO, 2005).

O cultivo de tecidos de *E. grandis* vem sendo estudado por muitos pesquisadores e botânicos. Porém a maioria dos trabalhos publicados refere-se ao uso de material juvenil, principalmente proveniente da germinação de sementes (DE FOSSARD et al., 1974; CRESSWELL; DE FOSSARD, 1974; HARTNEY, 1981; SITA, 1981). Isto não é o adequado para os programas de reflorestamento, onde o que se procura é clonar massivamente genótipos superiores seletos com o fim de obter plantações altamente produtivas e homogêneas.

De acordo com Carpineti (2005), o êxito de todo processo de clonagem está na obtenção de plantas com um bom enraizamento, já que valores inferiores a 70% limitam seu uso em grande escala por razões econômicas.

Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de ANA e BAP e tipos de luz no alongamento e enraizamento de brotações de *E. grandis* L.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultivo de Tecidos Vegetais da Faculdade de Ciências Agrárias (UNNE). Foi utilizado como explante segmentos uninodais do clone Ginta 36 de *Eucalyptus grandis* provenientes do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA), Corrientes, Argentina.

Foram testados dois diferentes meios de cultivo: M1) $\frac{1}{2}$ MS (Murashige&Skoog, 1962) contendo 3% Sacarose + 3 mg L^{-1} BAP + 2 mg L^{-1} ANA + Ágar 0,7%; M2) $\frac{1}{2}$ MS contendo 3% Sacarose + Ágar 0,7%.

O pH dos meios de cultivo foi ajustado a 5,8 com soluções de KOH e/ou HCl. A esterilização dos meios foi realizada em autoclaves a 0,101 pa durante 20 minutos.

Foram também utilizados quatro tipos de luz: escuridão, meia luz, amarela e branca, sendo que a luz amarela foi obtida com a utilização de papel celofane amarelo e a luz branca utilizado o papel transparente.

Foram feitos 3 repetições de 10 frascos, sendo cada frasco composto por 5 grupos de hastes. Os frascos utilizados eram de 160mL, contendo 20 mL de meio de cultura.

Os explantes foram cultivados em condições controladas com temperatura constante de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ sob escuridão por 30 dias e após este período foram transferidos a luz ($116 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) com fotoperíodo de 14 horas por mais 15 dias. Aos 45 dias foram feitas amostragens de todos

os tratamentos, para determinar o crescimento de entrenós e também o número de brotos obtidos, durante o processo de alongação.

Na sequência das avaliações, os brotos medindo entre 1 à 15 mm foram subcultivados em tubos de ensaio, com único meio de enraizamento, contendo ¼ MS (sacarose 2%) + ANA 0,2 mg/L, onde foram avaliados a capacidade de enraizamento.

O subcultivo foi reservado em um ambiente controlado com ausência de luz e após 10 dias transferido para ambiente com luz branca, sendo colhidas amostras de brotos enraizados a cada dois dias.

O delineamento experimental usado foi de blocos ao acaso, com 8 tratamentos, 3 repetições, sendo cada repetição composta por 10 frascos e cinco grupos de hastes por frascos. Os resultados foram analisados calculando-se valores médios, tendo em conta seu desvio padrão. Finalmente, estes foram submetidos a análise de variância seguida do Teste de Comparação de médias de Tukey a 5% (FERREIRA, 2003).

Resultados e Discussão

Os resultados das análises de variância para de porcentagem de brotações alongadas (% BROT); peso seco dos brotos (PSBROT) e porcentagem de brotos enraizados (% ENR), porcentagem de enraizamento total (% ENRTOT) e peso seco total (PST) do clone ginta 36, encontra-se na tabela 1.

A ocorrência de uma média de brotações alongadas baixa menores que 5 mm, no meio 1 com luz 1, pode estar relacionado com a ausência de luz durante os primeiros trinta dias, pois esta situação de ausência de luz com o meio com reguladores de crescimento apresentaram ótimos valores para o peso seco dos brotos. Os brotos menores de 5 mm depois de subcultivado em um meio de enraizamento, os brotos do meio 1 com luz 1 apresentaram-se de forma semelhante as demais situações de luz e meio.

Para brotos menores que 5 mm, o meio 2 com luz 4 apresentou a maior média de brotações alongadas, com médias de peso seco e porcentagem de enraizamento extremamente baixos. Meio 2 com luz 4 ao enraizar obteve a menor média. As melhores médias de enraizamento dos brotos menores que 5 mm foram obtidos dos meio 1 com luz 3, meio 1 com luz 4, meio 2 com luz 3, mas isso não significa que esses tratamentos obtiveram maior número de brotações.

Para a porcentagem de brotações entre 5-10 mm o meio 1 com luz 2 apresentou superioridade em relação aos demais tratamentos utilizados apresentando o maior número de brotações entre 5-10 mm. Quanto ao peso seco dos brotos de 5-10 mm, os brotos do meio 1 com

luz 2 foram as que apresentaram as menores medias. Dentre os brotos de 5-10 mm, o meio 1 com a luz 3 foi o que proporcionou maior capacidade de enraizamento.

Para os brotos entre 10-15 mm o tratamento que proporcionou os melhores resultados, exceto para peso seco foi o meio 1 e luz 1, em seguida o meio 2 com a luz 1, consequentemente o meio 1 com luz 1 foi o que apresentou menor média para peso seco dos brotos e o meio 2 com luz 3 foi o que apresentou maior média para peso seco dos brotos. Sendo assim a melhor resposta para enraizamento de brotos entre 10-15 mm, ocorreu no meio 1 e luz 1.

Tabela 1- Índice de porcentagem de brotações alongadas (%BROT); Peso seco dos brotos (PSBROT) e porcentagem de brotos enraizados (% ENR), porcentagem de enraizamento total (% ENRTOT) e peso seco total (PSBT) em dois tipos de meio de cultura submetidos a quatro tipos de luz

		LUZ 1- Escuridão		LUZ 2 - Tenue		LUZ 3 - Amarela		LUZ 4 -Branca		CV %
% BROT <5 mm	M1	3,89	Bc*	22,22	Bb	37,22	Ab	57,22	Ba	11,27
	M2	25,56	Ac	47,22	Ab	29,44	Ac	87,22	Aa	
%BROT 5-10 mm	M1	55,55	Aab	67,22	Aa	61,11	Aa	40,55	Ab	9,53
	M2	57,77	Aa	51,66	Ba	65,55	Aa	12,77	Bb	
%BROT 10-15 mm	M1	31,67	Aa	10,55	Ab	1,66	Ac	2,22	Abc	30,65
	M2	16,66	Ba	1,11	Bb	5,00	Ab	-	Ab	
%BROT >15 mm	M1	6,67		0,00		0,00		0,00		
	M2	0,00		0,00		0,00		0,00		
PSBROT <5 mm	M1	0,55	Aa	0,03	Ab	0,02	Ab	0,02	Ab	
	M2	0,08	Ba	0,04	Aab	0,04	Aab	0,02	Ab	
PSBROT 5-10 mm	M1	0,03	Bb	0,02	Bb	0,03	Bb	0,06	Ba	
	M2	0,06	Ab	0,07	Ab	0,05	Ab	0,24	Aa	
PSBROT 10-15 mm	M1	0,07	Ba	0,28	Ba	0,32	Aa	0,35	Aa	32,05
	M2	0,35	Ab	1,18	Aa	0,66	Ab	-		
PSBROT >15 mm	M1	0,38		-		-		-		
	M2	-		-		-		-		
% ENR <5 mm	M1	13,33	Ab	10,00	Ab	66,67	Aa	60,00	Aa	21,00
	M2	20,00	Ab	10,00	Ab	55,00	Aa	16,67	Bb	
% ENR 5-10 mm	M1	50,00	Ab	36,66	Ab	76,66	Aa	53,33	Aab	18,62
	M2	43,33	Aa	30,00	Aab	20,00	Bab	10,00	Bb	
% ENR 10-15 mm	M1	66,67		30,00		-		-		
	M2	-		-		-		-		
% ENR >15 mm	M1	70,00		53,33		-		-		
	M2	-		-		-		-		
PSBT	M1	0,07	Ba	0,04	Aab	0,02	Bb	0,06	Aa	
	M2	0,10	Aa	0,07	Abc	0,09	Aab	0,05	Ac	
PS60	M1	4,40	Ba	2,71	Aab	1,77	Bb	3,47	Acb	
	M2	6,37	Aa	4,10	Abc	5,32	Aab	3,21	Ac	
%ENRAIZAMENTO TOTAL	M1	48,33	Aa	32,50	Ab	35,83	Aab	28,33	Ab	11,35
	M2	15,83	Ba	10,00	Bab	15,83	Ba	6,66	Bb	

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade **M1**=½ MS contendo 3% sacarose + 3mg/L BAP + 2mg/L ANA + Ágar 0,7% ;**M2**= ½ MS contendo 3% Sacarose + Ágar 0,7%.

Somente o meio 1 com luz 1 demonstrou capacidade de produzir brotos maiores que 15 mm, estes apresentaram peso seco elevado e uma das maiores médias de enraizamento, este tratamento apresentou uma elevada potencialidade em produzir brotos grandes e capazes de enraizar.

O alongamento da parede celular é a resposta inicial dos tecidos vegetais às auxinas. Uma reserva de glicose, além de outros carboidratos, deve estar presentes no sistema que dará origem ao material necessário para o processo de alongação. O ácido naftalenacético tem capacidade de promover a formação de primórdios radiculares e tem sido utilizado para provocar e acelerar o enraizamento de estacas na propagação vegetativa de numerosas espécies vegetais (MARASSI, 2006).

A ausência de luz proporciona o estiolamento dos brotos pois a auxina se concentra em locais com ausência de luz. Com isso as células menos iluminadas se alongam mais do que as do lado mais iluminado. Citocinina BAP estimula a divisão celular e formação de órgãos, desenvolvimento de gemas laterais e tecidos meristemáticos provavelmente responsável por peso seco elevado de alguns tratamentos. (MARASSI, 2006)

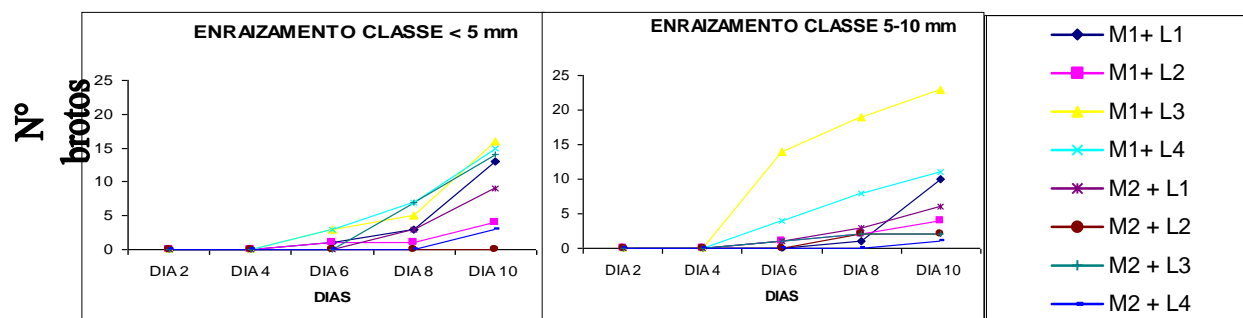
De acordo com Calderon (1994), o estiolamento estimula a acumulação de calmodulina nas regiões apicais e como consequência aumentaria o número de células, levando a um maior crescimento que se utiliza em maior proporção somente um tratamento hormonal. Situação semelhante aos brotos que estiveram na situação de escuridão.

Marassi (2006) cita que a auxina ANA estimula a alongação das células subsequentemente regula esse arranjo de diversos eventos fisiológicos não é ainda conhecido. ANA em baixas concentrações provoca a inibição do sistema radicular.

Correia et al, (1995), descreve que de acordo com o aumento do nível do BAP endógeno ocasionou elevação da concentração de etileno no frasco das culturas. BAP estimula o metabolismo de nitrogênio e consequentemente favorece o alongamento das gemas uma vez que influencia na produção endógena de AIA, de etileno e outros reguladores de crescimento que estão diretamente envolvidos no crescimento e desenvolvimento de plântulas.

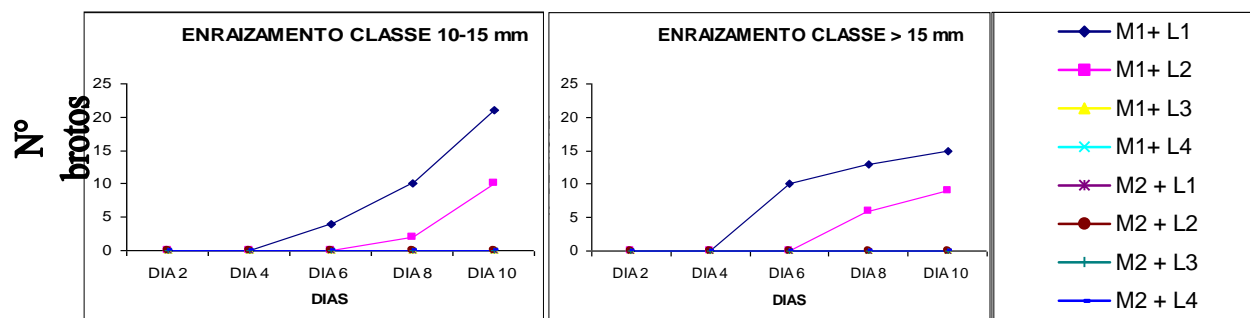
Na figura 1, podemos observar os gráficos relacionados ao número de brotos enraizados das classes <5mm e de 6 - 10 mm em meio de cultura para enraizamento pelo período de 10 dias, onde percebe-se que tanto o meio 1 com luz 3 quanto o meio 1 com luz 4 foram superiores em números de brotos enraizados, indicando que foram os melhores explantes subcultivados provenientes da alongação para induzir o enraizamento de brotos menores que 10mm.

Figura 1- Número de brotos enraizados das classes <5mm e de 6 - 10 mm em meio de cultura para enraizamento pelo período de 10 dias.



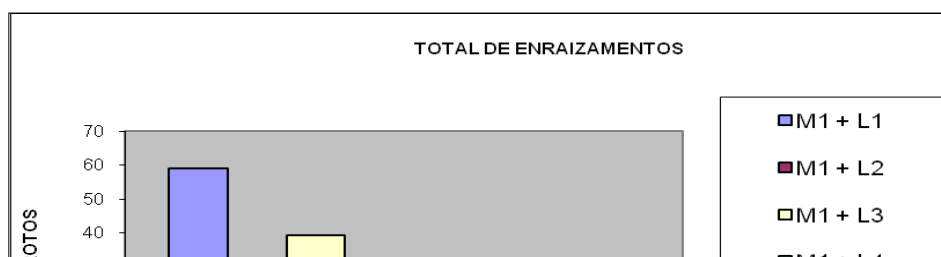
Na figura 2, observa-se os gráficos para o número de brotos enraizados para as classes de 10-15 mm e > 15 mm em meio de cultura para enraizamento pelo período de 10 dias, onde o meio 1 com luz 1 e meio 1 com luz 2 obtiveram maiores números de brotos enraizados, sendo que no meio 1 com luz 1 ocorrem em maiores números.

Figura 2 - Número de brotos enraizados para as classes 10-15 mm e >15 mm em meio de cultura para enraizamento pelo período de 10 dias.



A figura 3 apresenta uma explanação geral sobre o total de enraizamento de acordo com as condições utilizadas no trabalho, onde a multiplicação das gemas variou entre os tratamentos, porém, observou-se maior número de brotações nos tratamentos em meios de cultura com presença de reguladores de crescimento. Variando de 60 até 5 brotos.

Figura 3- Número total de brotos enraizados, no meio de cultura de enraizamento por período de 10 dias.



A ideal situação para micropropagação é quando se utiliza um meio para multiplicação de brotos seguida de inicialização e de enraizamentos. Esse é o caso de *E. marginata*, mais outras espécies tem melhores resultados quando adicionados em meios de elongações e desenvolvimento inicial de raízes. Geralmente as culturas são iniciadas na escuridão e depois transferidas a condições similares que foram incubadas na fase de multiplicação, a espécie *grandis* por algum motivo procurou a responder de forma diferente dependendo do meio de iniciação. (MCCOMB e BENNETT,1986).

Sankara e Venkateswara (1985) obtiveram plantas enraizadas de *Eucalyptus grandis* utilizando combinações de auxinas e citocininas e obtiveram sucesso em meio com concentrações hormonais. Campinhos e Ikemori (1986) estudaram a clonagem de *Eucalyptus* spp. através do enraizamento de estacas (macropropagação) e utilizando técnicas de cultivo in vitro (micropropagação), descrevendo como este processo apresenta vantagens quando comparados a outros métodos.

Furze e Cresswell (1985), cita que brotos induzidos ao enraizamento durante um período inicial de 7-10 dias em escuro, estimula os primórdios radiculares.

Tais resultados corroboram com Mroginski e Roca (1991), onde estas técnicas constituem uma ferramenta muito valiosa para a propagação rápida e massiva de plantas selecionadas, assim como também para a produção e bioconversão de compostos úteis, para o incremento da variabilidade genética, o saneamento de plantas, a obtenção de embriões somáticos, a conservação e crioconservação de germoplasma.

Conclusões

A ausência de luz favoreceu o alongamento dos brotos.

O uso de hormônios favorece o desenvolvimento radicular, assim como o desenvolvimento normal de folhas, raízes e caule.

O uso de reguladores BAP e ANA na ausência de luz ou luz tênue, houve favorecimento o enraizamento das brotações.

Referências

BOLAND et al. **Forest trees of Australia**. Melbourne, CSIRO, 1984. 687p.

CAMPINHOS E. JR., E. I., Y.K.. Cloning *Eucalyptus* spp. **Aracruz Florestal S. A.**, Aracruz- Es, maio 1986.p. 1-5.

MARASSI A.M,L. **Importancia de la Silvicultura Clonal**.Disponivelem :<<http://www.biologia.edu.ar/plantas/hormona.htm#Elongación#Elongación>>.Acesso em: 20 out. 2013.

CORREIA D., GONCALVES A.N. ZARATE H.T.C.,RIBEIRO M.C..**Efeito do meio de cultura liquido e solido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* multiplicação in vitro**. Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP.Piracicaba, SP.1995

CRESSWELL, R. J.; FOSSARD, R.A. Organculture of *Eucalyptus grandis*. **Australian Forestry**, Armidale, v.37, n.1, p. 55-69, set. 1974.

DE FOSSARD, R. A. Tissue culture of eucalyptus. **Australian Forestry**, Armidale, v.37, n.1, p. 43-54, set. 1974.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**. Universidade Federal de Lavras, MG, 2003.

FURZE, M. J; Cresswell, C.F. Micropropagation of *Eucalyptus grandis* and *nitens* using tissue culture techniques.**South African Forestry Journal**, dez.1985. p. 20-23.

GUPTA, P. K; MASCARENHAS, A.F. *Eucalyptus*. In: BONGA J. M.; DURZAN D. J. **Cell and Tissue Culture in Forestry, Case Histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms**.v3. Dordrecht, Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers set, 1987. p. 385-399.

HARTNEY, V. J..**Vegetative propagation of eucalypts in vitro**.In: Proc IUFRO Sect s2 01 5. Int Workshop “In vitro” Cultivation For Tree Species, Fontainebleau, France, AFOCEL, 1981. p. 175-180.

MROGINSKI, Luis A: ROCA, William M . 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales in vitro. In: ROCA William.M. e MROGINSKI Luis.A.; **Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones**. (eds.) W.M. Roca y L.A. Mroginski, CIAT (Cali, Colombia),1993. p.20-40.

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

PATON, D.M.; WILLING, R.R.; NICHOLLS, W. AND L.D. PRYOR. Rooting of stem cuttings of *Eucalyptus*: a rooting inhibitor in adult tissue. **Australian Journal of Botany**, Collingwood, Australia, v.18, n.2, p 175-183, 1970.

PRYOR, L.D.; WILLING, R.R. Vegetative propagation of *Eucalyptus* – an account of progress. **Australian Forestry**, Amidale, v.27: p. 52-62, 1963.

QUOIRIN, M., P. BOXUS, T.H. GASPAR. 1974. "Root initiation and isoperoxydases of stem tip cuttings from mature *Prunus* plants", **Physiologia Vegetable** 12: p.165-174.1974.

SITA, L. Tissue culture of *Eucalyptus* species. **Tissue Culture Economically Important Plants**, Singapore, India, p. 180-184.1981.

SANKARA RAO, K.; VENKATESWARA, R. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Eucalyptus grandis* L. **Plant Science**, Tamilnadu, v.40, n.1, p.51-55, 1985.

SELING, Irene; SPATHELF, Peter; NUTTO Leif. **Los Australianos en Brasil**. Disponível <[http://219.127.136.74/live/Live_Server/126/tfu.2001.03\(14-15\).s.pdf](http://219.127.136.74/live/Live_Server/126/tfu.2001.03(14-15).s.pdf)> Acesso em: 18 de set. 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, **Fatos e Números do Brasil Florestal**. Disponível <<http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/SBS-2013.pdf>> Acesso em : 20 de jan. 2014

TRUJILLO, M.I. Propagación vegetativa de *Eucalyptus grandis*. **En Actas del Seminario Avances en Propagación Vegetativa para el género Eucalyptus**. Uruguay, INIA, Tacuarembó, p.1-14, 2005.