

PROPAGAÇÃO "IN VITRO" DE *Eucalyptus saligna**

Moacir Fantini Junior

CEPE-KLABIN - Telêmaco Borba - Paraná - Brasil

Maria Elisa Cortezzi Graça

CNPF/EMBRAPA - Curitiba - Paraná - Brasil

RESUMO

As fases de indução, multiplicação, alongamento e enraizamento foram estabelecidas para a propagação "in vitro" de *Eucalyptus saligna* Sm. Segmentos nodais, de 11 matrizes selecionadas, após desinfestados, foram inoculados em meio M & S suplementado de vitaminas B₅, sacarose a 2% (p/v) e agar a 0,6% (p/v). Para cada fase, os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de BAP combinados com AIB, sendo que, para o alongamento, foram acrescidos o carvão ativado (CA) e GA₃ e, para o enraizamento, o meio de KNOPP. A maior porcentagem de brotações ocorreu com o uso de 0,1 mg/l de BAP e 0,01 de AIB. A concentração de 0,1 mg/l de BAP resultou em uma maior taxa de multiplicação das brotações. A adição de 5 g/l de CA ao meio MS foi tão ou mais efetiva quanto aos tratamentos que envolveram o uso deste combinado com reguladores de crescimento. O enraizamento máximo ocorreu em meio de KNOP acrescido de 1,0 mg/l de AIB. A técnica é viável para *E. saligna*, apesar da multiplicação ter sido aparentemente baixa, em função dos critérios para avaliação.

ABSTRACT

Growth induction, multiplication, elongation and rooting stages were established for "in vitro" propagation of *Eucalyptus saligna* Sm. Nodal segments from 11 selected trees were surface sterilized with 1% NaClO (v/v) during 15 min and inoculated on MS medium supplemented with sucrose at 2% (w/v), 0,6% (w/v) agar and vitamins B₅. The treatments consisted of combinations of different levels of BAP and IBA for each stages. Activated charcoal (AC) and GA₃ for shoot elongation and KNOP's medium for rooting were also tried. Maximum shoot initiation occurred with 0,1 mg/l BAP and 0,01 mg/l IBA. Optimal shoot proliferation was accomplished on a medium containing 0,1 mg/l BAP. Single addition of 5 g/l AC to the MS medium was as effective in promoting shoot elongation as the combined use of C.A. with growth regulators. Rooting of "in vitro" produced shoots occurred in KNOP's medium supplemented with 1,0 mg/l IBA. The apparently low multiplication rates were due to the criteria used which took into account only clusters of shoots that could be subcultured. Regeneration by this method by this method as suitable for clonal propagation of this specie.

* Trabalho apresentado no 6.º Congresso Florestal Brasileiro, realizado em Campos do Jordão — São Paulo — Brasil, de 22 a 27 de setembro de 1990.

1 — INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* é o mais utilizado em programas de reflorestamento no Brasil devido à sua alta produtividade, plasticidade e múltiplas utilizações. Dentre as espécies, *Eucalyptus saligna* Sm. se destaca pela sua alta produtividade e capacidade de rebrota, sendo que sua madeira tem utilização na produção de celulose, papel, chapas, de fibras e de partículas.

A utilização da propagação vegetativa nos programas de melhoramento florestal, tem possibilitado ganhos adicionais num menor período de tempo. Entre os métodos de propagação vegetativa, a estaquia é mais largamente utilizada na propagação de material selecionado; entretanto, seu emprego se restringe ao material rejuvenescido, pois o material adulto da maioria das espécies de *Eucalyptus* é recalcitrante ao enraizamento. A enxertia e a alporquia são muitas vezes inadequadas em virtude dos altos custos, incompatibilidade e uso intensivo de mão-de-obra. Portanto, a micro-propagação pode ser uma alternativa potencial, econômica e segura para a multiplicação de materiais selecionados.

Apesar de inúmeros trabalhos relatarem a regeneração de plântulas de eucalipto através de propagação "in vitro" (FURZE & CRESSWELL 1985; KARNOSKY 1981; DE FOSSARD & BOURNE 1977; AHUJA 1985; WECHETECK et al. GRAÇA & MENDES 1989), não há, até o momento, informações sobre a propagação "in vitro" de *Eucalyptus saligna*.

O objetivo deste trabalho é a regeneração de plântulas de *E. saligna* através da propagação "in vitro".

2 — MATERIAIS E MÉTODOS

Segmentos nodais obtidos em estacas enraizadas provenientes de onze árvores matrizes de *Eucalyptus saligna* Sm, foram utilizados como explantes para iniciar a propagação "in vitro". Os segmentos nodais foram imersos em uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% (v/v), durante quinze minutos por 3 vezes com água destilada esterilizada.

Para todas as fases, o meio utilizado foi de MURASHIGE & SKOOG (1962) (MS) suplementado com sacarose a 2% (p/v), agar 0,6% (v/v) e vitaminas B₅ (GAMBORG & WETTER 1975). Na fase de indução de gemas foram utilizadas as combinações de 6-Benzilaminopurina (BAP) nas concentrações 0,01, 01 e 1,0 mg/l Ácido Indol-3 Butírico (AIB) nas concentrações de 0,01 e 0,1 mg/l. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, e analisado em um fatorial 11 x 3 x 2 (matrizes, BAP, AIB). Cada tratamento foi repetido 30 vezes.

Os explantes deste experimento e brotações dos demais experimentos foram cultivados sob foto-período de 16 h/8 h luz/escuro, com 2.000 lux de intensidade luminosa. A temperatura foi mantida de 25°C + 8°C.

Os explantes foram avaliados após 30 dias, quanto ao desenvolvimento de gemas axilares em novas brotações.

Na multiplicação adicionaram-se o BAP (0,1, 0,5 ou 1,0 mg/l) e o AIB (0,0, 0,01, 0,1 ou 0,5 mg/l) ao

meio MS. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado analisados como um fatorial 11 x 2 x 4 (matrizes. BAP, AIB) com 20 repetições por tratamento.

Aos trinta dias de cultivo, avaliaram-se a multiplicação (Tabela 1) o aspecto e o vigor, na forma descritiva, com critérios variando desde 1 (brotação verde-claro com a parte aérea oxidada e ou seca) até 6 (brotações decoloração verde intensa, típica da espécie, vigorosas; sem alteração na parte aérea).

Para estimular o alongamento foram utilizados os tratamentos descritos na Tabela 2, os quais se basearam nos resultados de experimentos anteriores. Para análise do número de brotações alongadas, consideraram-se, apenas, as brotações com altura superior a 1 cm. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com 30 repetições por tratamento. A altura média, e a porcentagem das brotações desenvolvidas foram determinados no final de 30 dias de cultivo.

Para o enraizamento das brotações, foram empregados os seguintes tratamentos: a) meio de KNOP (1865) avrescido de 1,0 mg/l de AIB (T1); b) meio MS suplementado com vitaminas B₅ e AIB a 0,2 mg/l (T2); c) igual a (b) mas com AIB a 1,0 mg/l (T3); d) MS reduzido à metade de concentração de sais acrescidos de vitaminas B₅ e 1,0 mg/l AIB (T4). Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com repetições por tratamento. O enraizamento das brotações foi avaliado após 30 dias de cultivo.

Após o enraizamento, as plântulas regeneradas foram transplantadas para tubetes do polipropileno, previamente preenchidos com vermiculita, terra de subsolo e composto vegetal (1:1:3 v/v), e transferidas para casa de vegetação com umidade relativa mantida a 80% por duas semanas, onde posteriormente foram transferidas para o viveiro, sob 50% de intensidade de luz natural.

3 — RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento das gemas dos explantes em brotações foi maior, quando utilizou-se BAP a 0,1 mg/l e AIB a 0,01 mg/l (Figura 1), resultando em 11% a mais de gemas diferenciadas do que as menores concentrações de BAP e AIB. Quando se aumentou o BAP de 0,1 para 1,0 mg/l, o desenvolvimento de gemas diminuiu.

Altas concentrações de citocinina, a partir de 1,0 mg/l, são geralmente utilizadas para a formação múltipla de brotações. Entretanto, caso os estágios de indução e multiplicação pudessem ser conduzidos simultaneamente, tornaria o processo mais rápido e econômico. Para *E. saligna*, esta hipótese não foi verificada, pois altas concentrações de citocinina inibiram o desenvolvimento das gemas, justificando a necessidade da fase de indução dessa fase para a espécie.

O desenvolvimento das gemas variou com o genótipo. Do total de matrizes 54,5% apresentaram desde 50% até 84% de gemas induzidas em todos os tratamentos, enquanto que o restante variou desde 19% até 42%.

Na multiplicação de brotações de *E. saligna* observou-se que a medida que a concentração de BAP aumentou, a multiplicação diminuiu (Figura 2). Não houve uma tendência definida do AIB, nas concentrações utilizadas. A proliferação das brotações ocorreu com o emprego do BAP a 0,1 mg/l.

Devido ao elevado número de tratamentos, repetições e brotações por repetição, não foi determinado o número de brotações individuais obtidas, mas utilizados os conceitos, já mencionados. Nesses conceitos, consideraram-se como multiplicados os grupos de brotações proeminentes do tufo de brotação inicial. Esse grupo de brotações foi selecionado, por serem mais adequados para os subcultivos subseqüentes ou para o alongamento como pré-determinado por FANTINI & GRAÇA (1989). Assim, o melhor tratamento proporcionou uma média de 1,45, correspondendo entre ausência de multiplicação do tipo especificado (1) e no máximo de 2 grupos de brotações/explante (2).

Apesar desses resultados aparentarem conflitantes com os relatados para outras espécies de eucaliptos, onde o aumento da citocinina foi proporcional ao aumento da taxa de multiplicação (GREWAL et al. 1980; SANKARA & VENKATESWARA 1985) na realidade não os são. Isto, porque, só foram consideradas como multiplicadas, somente os grupos de brotações proeminentes e não a multiplicação total. Geralmente, o aumento de citocinina resulta no aumento de brotações, pouco desenvolvidas, formando um grande aglomerado de pequenas brotações, tornando-se difícil de individualizá-las e, quando individualizadas normalmente não se estabelecem no meio de cultura da fase seguinte.

No presente estudo, as brotações individuais se multiplicaram em detrimento dos grupos de brotações mais desenvolvidas, que diminuíram com o aumento de BAP. Resultados similares foram obtidos por WECHE-TEK et al. (1989), os quais verificaram que concentrações mais baixas de BAP, resultaram em uma maior multiplicação de brotações de *E. viminalis*.

Quanto ao aspecto e vigor das brotações de *E. saligna* verificou-se uma tendência similar a multiplicação (Figura 3). Brotações, na menor concentração de BAP, apresentavam-se de coloração verde intenso individualizadas, as brotações apresentavam-se de coloração verde-escuro, calosidade da parte aérea, chegando até oxidação e murcha das folhas, para BAP a 1,0 mg/l.

Os limites inferior e superior de variação da multiplicação entre as matrizes, dos diferentes tratamentos, foram de 10,4 e de 1,35, respectivamente. Devido ao elevado número de repetições por tratamento, esses limites recaíram sobre o mesmo conceito, não evidenciado portanto em termos práticos algumas diferença entre matrizes em relação a multiplicação.

Por outro lado, o intervalo de variação entre o limite inferior (2,35) até o superior (3,9) para o aspecto e vigor das brotações das matrizes nos diferentes tratamentos foi maior, que na multiplicação.

Essas médias corresponderam a conceitos que influíram apenas no aspecto de intensidade da cor das brotações, de verde-claro para verde-intenso.

No alongamento das brotações, o uso da concentração integral de sais do meio MS aumentou significativamente o crescimento em altura das brotações e o número de brotações alongadas em comparação a sua redução de sais à metade da concentração (Tabela 2).

Adicionalmente ao meio, o alongamento das brotações variou em função dos reguladores de crescimento. No meio MS/2, uma razão baixa de BAP em relação ao AIB (1:5) propiciou brotações mais longas, enquanto que para o meio MS ou MS acrescido de GA₃ e C.A., uma relação de concentração inversa de BAP e AIB (5:1) resultou uma maior altura das brotações.

O GA₃ adicionado conjuntamente com o C.A. causou um acréscimo significativo na altura das brotações (Tabela 2). Maiores incrementos em altura foram verificados na concentração de 0.1 mg/l do que com 1.0 mg/l de GA₃.

Para *E. gunni* e *E. dalrympleana* e seus híbridos, o uso combinado de C.A. e GA₃ no meio MS acrescido de BAP e ácido alfa-naftaleno acético (ANA) recuperou as características morfológicas das brotações alongadas, sendo que o mesmo não se sucedeu quando foram utilizados individualmente (FRANCLET & BOULAY 1982). Por outro lado, o uso combinado de GA₃ e C.A., resultou não somente no decréscimo do incremento em altura das brotações de *E. tereticomis*, como também causou a deterioração e morte de muitas delas (PINEDO 1989). Apesar da adição do C.A. produzir de alturas médias similares as obtidas com o uso do meio MS com BAP e AIB, ou com GA₃, o acréscimo de C.A., além de resultar em um maior número de brotações alongadas do que na sua ausência, recuperou a característica morfológica da espécie, isto é, brotações com folhas lanceoladas, desenvolvidas, de coloração típica da espécie e e mais endurecidas do que as cultivadas sem C.A. Esse "edurecimento" da brotação confere uma melhor adaptação à fase seguinte, enraizamento das brotações, pois brotações alongadas de algumas espécies de eucalipto advindas da multiplicação, quando colocadas diretamente no meio de enraizamento, senescem ou apresentam um baixo enraizamento ou baixa sobrevivência durante o processo de aclimação. Dessa forma, o uso de C.A. no meio MS é tão mais eficaz no alongamento e no número de brotações alongadas quanto o uso deste conjuntamente com reguladores de crescimento no meio MS. Esses resultados corroboram com os relatados para *E. viminalis* (WECHETEK et al. 1985) e *E. citriodora* (AHUJA 1985), onde o uso somente de C.A. promoveu o alongamento das brotações.

Os tratamentos que envolveram o uso do C.A. ou este com reguladores de crescimento no meio MS foram também os que apresentaram os maiores números de matrizes de alturas desejáveis, ou seja, entre 1,0 a 2,0 cm (Tabela 3).

O enraizamento das brotações alongadas variou em função do meio e concentrações de AIB (Figura 4). Uma maior porcentagem de brotações enraizadas foi obtida com o uso de AIB a 1,0 mg/l do que a 0,2 mg/l.

O meio utilizado também influenciou no enraizamento das brotações de *E. saligna*. Houve diferença

significativa entre todos os tratamentos, com o meio de KNOP propiciando 59% de enraizamento contrastando com 11% apresentado no MS acrescido de 0,2 mg/l de AIB.

O fato do meio de KNOP e MS/2 resultarem em um enraizamento superior ao MS indica que para esta fase não é necessária uma alta concentração de sais no meio, pois o meio de KNOP é caracterizado por ser baixo em sais, enquanto que o MS é de alta concentração iônica. Adicionalmente o complexo vitamínico da formulação B₅ parece ser dispensável, uma vez que a única vitamina comum a ambos os meios foi a tiamina; entretanto esse efeito necessita ser melhor investigado.

O enraizamento das brotações das diferentes matrizes variou em função dos tratamentos. Maiores porcentagens de enraizamento das matrizes (66%-100%) ocorreram nos tratamentos 1,2 e 4, sendo que entre esses tratamentos o T1 apresentou o maior número de matrizes de médio e alto enraizamento do que T2 e T4 (Figura 5).

4 — CONCLUSÕES

A baixa taxa de multiplicação obtida neste trabalho foi devido aos critérios que foram utilizados para a sua avaliação onde foram considerados somente grupos de brotações proeminentes multiplicadas em um período de 30 dias os quais poderiam ser subcultivados com êxito. Se considerada a multiplicação total, esta seria comparável as espécies com altas taxas de multiplicação.

Essa multiplicação aliada a sobrevivência de 66% das plântulas regeneradas quando transferidas a casa de vegetação demonstra a viabilidade da propagação "in vitro" de *E. saligna* para propagação de material selecionado somente para fins específicos como bancos, testes e pomares clonais, não sendo recomendada para a propagação massal da espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a KLABIN do Paraná ao suporte financeiro e a Srta. Marli Bueno da Silva, laboratorista do Centro de Pesquisa da KPAF, ao apoio técnico durante a realização deste trabalho.

5 — REFERÊNCIAS

- AHUJA, A.A. In vitro shoot differentiation in *Eucalyptus citriodora* Hook: effect of activated charcoal. *Indian J. For.* 8(4):340-41, 1985.
- DE FOSSARD, R.S. & BOURNE R.A. Clonal propagation of *Eucalyptus* by nodal culture In: WORLD CONSULTATION ON FORESTRY BREEDING. 3., Canberfra, 1977. *Third consultation...* Canberra, CSIRO, 1978, v. 2, p. 1025-29.
- FANTINI JUNIOR, M. & GRAÇA, M.E.C. A micropropagation system for *Eucalyptus dunnii* x *Eucalyptus* sp. *Ann. Sci. For.*, 46 (Suppl.): 136-39, 1989..
- FRANCLET, A. & BOULAY, M. Micropropagation of frost resistant eucalypt clones. *Aust. For. Res.*, 15:85-9, 1982.
- FURZE, M.J. & CRESSWELL, C.F. Micropropagation of *Eucalyptus grandis* and nitens using tissue culture techniques *S. African. For. J.* (135):20-25, 1985.

GAMBORG, O.L. & WETTER, L.R. *Plant tissue culture methods*. Saskatoon, National Research Council of Canadá, 1975. 109 p.

GRAÇA, M.E.C. & MENDES, S. Micropropagation of *Eucalyptus dunnii* Maid. *Ann. Sci. For.*, 46 (suppl.): 140-44, 1989.

GREWAL, S.; AHUJA, A. & ATAL, C.K. *In vitro* proliferation of shoots apices of *Eucalyptus citriodora* Hook. *Indian. J. Exp. Biol.* 18:775-77, 1980.

KARNOSKI, D.F. Potential for forest tree improvement via tissue culture. *Bio Sci.*, 31(2):114-20, 1981.

KNOP, W. Quantitative untersuchungen uber den ernahrungsprozersder pflanzen. *Landwirtsch Vers. St.* 7:93-107, 1865.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-97, 1962.

PINEDO, D.M.H. "Micropropagação de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus tereticomis*". Curitiba, Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 1989. 63 p. Tese mestrado.

SANKARA RAO, K. & VENKATESWARA, R. Tissue culture of forest trees: Clonal multiplication of *Eucalyptus grandis* L. *Plant. Sci.*, 40:51-5, 1985.

WIECHETEK, M.S.S.; GRAÇA M.E.C. & ARAÚJO, A.J. Micropropagation of *Eucalyptus viminalis* Labill. *Ann. Sci. For.*, 46 (Suupl.): 161-4, 1989.

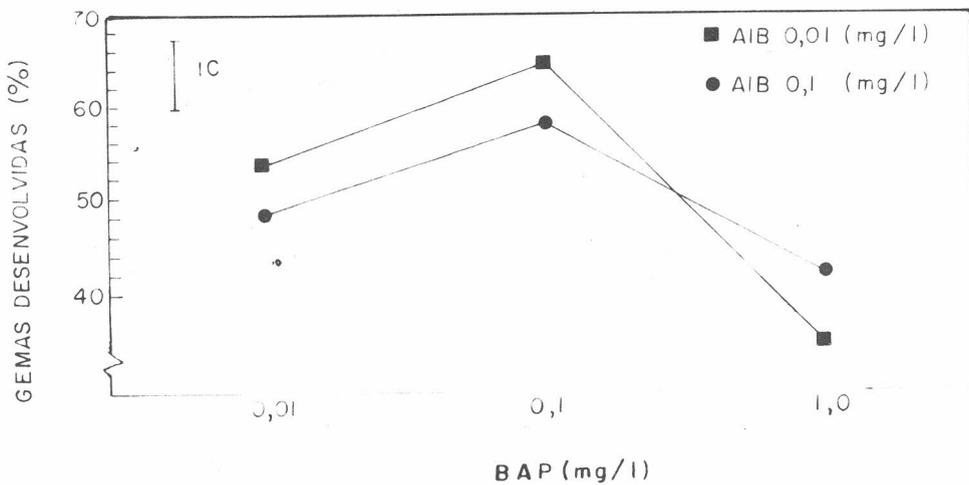


Figura 1: Efeito de concentrações de BAP e AIB no desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus saligna*. Linha vertical representa o intervalo de confiança (IC) a 95% de probabilidade.

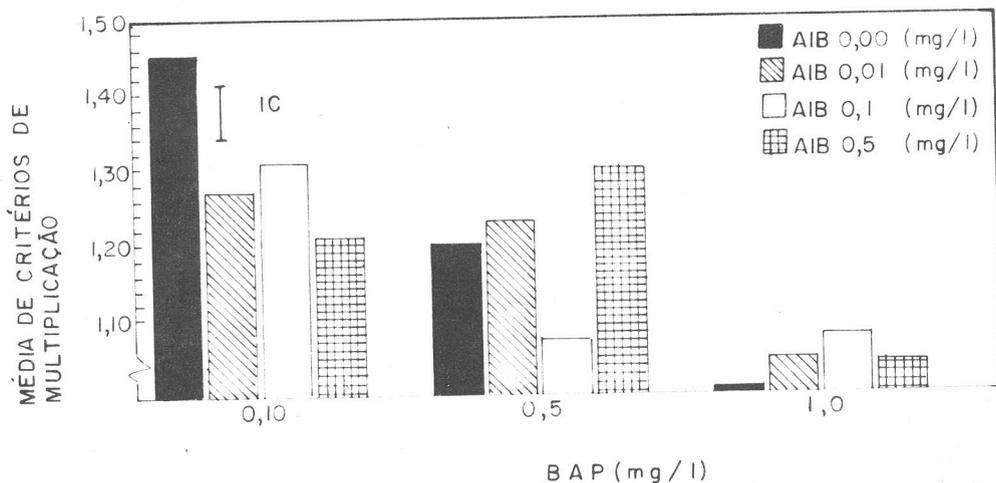


Figura 2: Efeito de concentrações de BAP e AIB na multiplicação de *Eucalyptus saligna*. Linha vertical representa o intervalo de confiança (IC) a 95% de probabilidade.

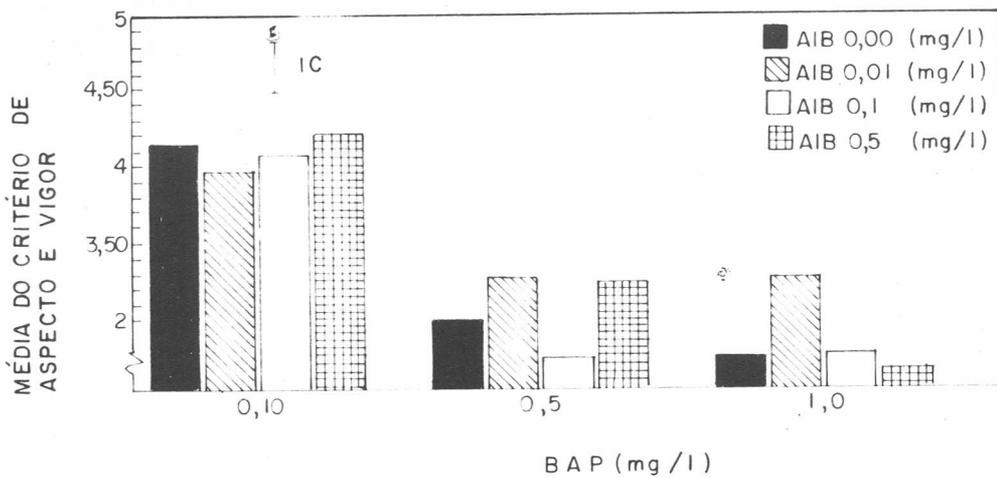


Figura 3: Efeito de concentrações de BAP e AIB no aspecto e vigor das brotações multiplicadas de *Eucalyptus saligna*. Linha vertical representa o intervalo de confiança (IC) a 95% de probabilidade.

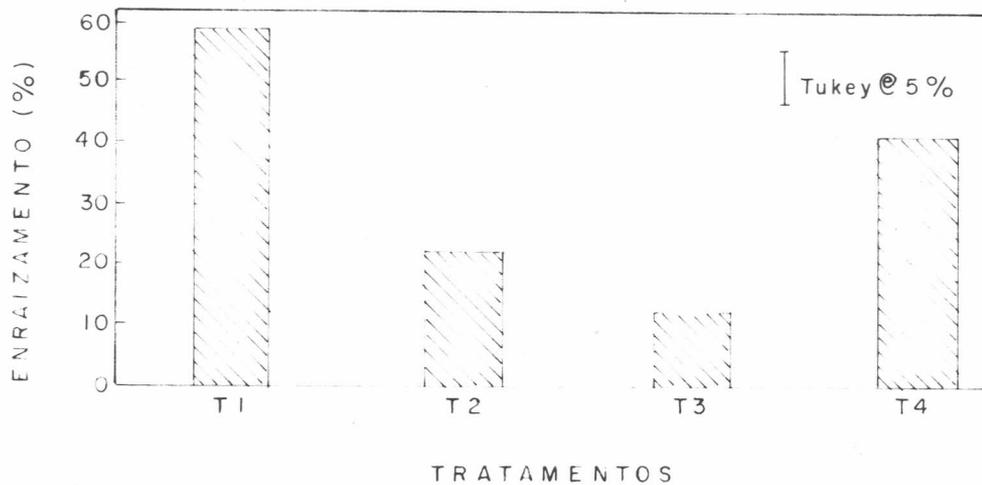


Figura 4: Efeito de diferentes concentrações e meios no enraizamento de brotações de *Eucalyptus caligna*.

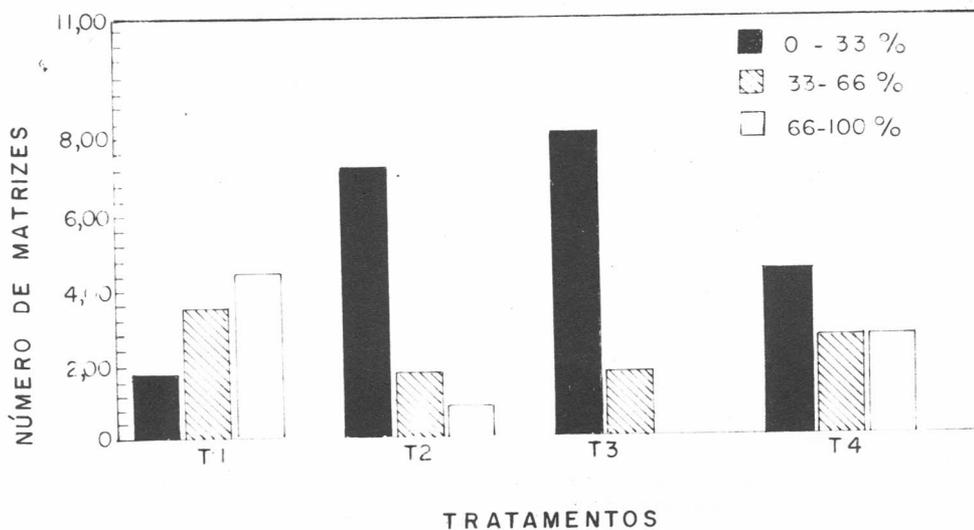


Figura 5: Frequência de distribuição das matrizes de *Eucalyptus saligna*, em classes de enraizamento nos diferentes tratamentos.

TABELA 1

CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE BROTAÇÕES MULTIPLICADAS APROVEITÁVEIS PARA O ALONGAMENTO

Conceito	Grupo de Gemas Multiplicadas
1	sem multiplicação
2	2
3	3 a 5
4	6 a 8
5	> 8

TABELA 5

FREQÜÊNCIA DE MATRIZES EM DIFERENTES CLASSES DE ALTURA E % DE MATRIZES ALONGADAS DE *E. SALIGNA* NOS DIFERENTES TRATAMENTOS

Tratamentos	Classes de altura			Matrizes alongadas ^z
	0,5-1,0	1,0-1,5	1,5-2,0	
	cm			%
	Freqüência			
T1	3	4	4	84 ± 18
T2	3	4	4	84 ± 18
T3	3	4	4	84 ± 20
T4	6	2	2	78 ± 16
T5	6	2	3	66 ± 26
T6	1	8	1	71 ± 24
T7	4	5	1	60 ± 33
T8	6	4	0	57 ± 29
T9	7	3	0	61 ± 27

z — Médias ± desvio padrão.

TABELA 2

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE SAIS NO MEIO, REGULADORES DE CRESCIMENTO, E CARVÃO ATIVADO NA ALTURA E NO NÚMERO DE BROTAÇÕES ALONGADAS DE *E. SALIGNA*

Meio de cultura	Tratamentos C.A. ^z (g/l)	GA ₃	BAP	AIB	Altura média das brotações	Número de brotações alongadas
			mg/l			
T ₁ MS	5,0	0	0	0	1,30	1,89
T ₂ MS	5,0	0,1	0,5	0,1	1,32	1,95
T ₃ MS	5,0	1,0	0,5	0,1	1,25	2,05
T ₄ MS	5,0	0,1	0,1	0,5	1,20	2,18
T ₅ MS	5,0	1,0	0,1	0,5	1,15	2,06
T ₆ MS	0	0	0,5	0,1	1,29	1,89
T ₇ MS	0	0	0,1	0,1	1,21	1,26
T ₈ M/2	0	0	0,5	0,1	0,97	1,62
T ₉ MS/2	0	0	0,1	0,5	0,98	2,31

Contrastes ortogonais

MS vs MS/2

**

**

MS+CA vs MS sem CA

ns

**

MS/2+BAP(0,5)+AIB(0,1) vs MS/2+BAP(0,1)+AIB(0,5)

*

ns

MSs/CA+BAP(0,5) vs MSs/CA+BAP(0,1)

*

ns

MS+CA s/GA₃,BAP₂,AIB vs MS+CA c/GA₃, BAP e AIB

*

ns

MS+CA+GA₃(0,1) vs MS+CA+GA₃(1,0)

*

ns

MS+CA+GA₃(0,1)+BAP(0,5)+AIB(0,1) vs MS+CA+GA₃(0,1)+BAP(0,1)+AIB(0,5)

**

ns

MS+CA+GA₃(0,1)+BAP(0,5)+AIB(0,1) vs MS+CA+GA₃(0,1)+BAP(0,1)+AIB(0,5)

*

**

z — C.A. Carvão Ativado

y — GA₃ Ácido Giberélico

ns, *, ** indicam não significativo ou significativo aos níveis de 5% e 1% ,respectivamente

x — Valores transformados em $\sqrt{x + 0.5}$