

- RAYMOND,C.A.; HARWOOD,C.E.; OWEN,J.V. A Conductivity Method for Screening populations of *Eucalyptus* for Frost Damage and Frost Tolerance. Aust. J. Bot. 34: 377-393. 1986.
- RIKIN,A.; BLUMENFELD,A.; RICHMOND,A.E. Chilling Resistance as affected by Stressing Environments and Abscisic Acid. Bot. Gaz. 137 (4): 307-312. 1976.
- SHERRY,S.P.; PRYOR,L.D. Growth and Differential Frost Resistance of Topoclinal forms of *Eucalyptus fastigata* D. & M. Planted in South Africa. Aust.For. 31 (1): 33 -49. 1967.

EFEITO DE CITOCININAS NA MULTIPLICAÇÃO E NO ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES DE CLONES DE *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden CULTIVADOS *in vitro*

Rosângela M. S. Resende
Maria Elisa C. Graça
CNPFFlorestas/EMBRAPA - Curitiba-PR

ANEXO 1. Composição química do fertilizante OSMOCOTE™.

ELEMENTOS	CONCENTRAÇÃO
Nitrogênio	18%
(Nitrato de Amônia	2.1%)
(Fosfato de Amônia	8.5%)
Fósforo	2.6%
(Solúvel em água	2.1%)
(Solúvel em ácido	0.5%)
Potássio (Sulfato de potássio)	10.0%
Enxofre (Sulfato de potássio)	4.0%
Cálcio (Fosfato e Sulfato de cálcio)	0.6%
Outros elementos não nutrientes	11.0%

RESUMO

O efeito das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), 6-(g.g-dimetilamino) purina (2iP) e 6-furfurilaminopurina (CIN) na multiplicação e enraizamento foi estudado em três clones de *E. grandis*. Foram testados nove tratamentos, sendo que seis deles consistiam na alternância das citocininas e os outros no uso contínuo de cada uma delas em três subcultivos seriados. A alternância de citocininas permitiu a maximização na obtenção de brotações com mais de 5 mm, enquanto que o uso contínuo de 2iP levou a uma deterioração das brotações. As maiores porcentagens de enraizamento para os três clones ocorreram nos tratamentos em que 2iP ou CIN eram usadas no terceiro subcultivo da multiplicação. A redução da taxa de enraizamento pela exposição prévia ao meio com BAP na multiplicação e subsequente enraizamento foi evidenciada para os três clones estudados.

Abreviações: BAP - 6-benzilaminopurina;
2iP - 6-(g.g-dimetilamino) purina
CIN - 6-furfurilaminopurina (cinetina)

Palavras-Chave: Micropropagação - *Eucalyptus*; *E. grandis*, citocininas - enraizamento; citocininas - multiplicação

ABSTRACT

The effects of cytokinins 6-benzylaminopurine (BA), 6-(g.g dimethylallylamino) purine (2iP) and 6-furfurylamino-purine (KIN) on "in vitro" shoot multiplication and rooting of three clones of *E. grandis* were studied. The experiment was composed by nine treatments, being six of them consisted of alternancy of the cytokinins and the others by three subcultures with each cytokinins. Maximum shoot proliferation with shoots greater than 5 mm was achieved by alternating different cytokinins, while culturing successively with 2iP caused shoot deterioration. For all clones rooting was higher when 2iP or KIN was added to the media in the third multiplication subculture. Whereas BA added to the media in the third subculture caused a significant decrease in rooting.

Key words: *Eucalyptus* - micropropagation; *E. grandis*, cytokinins - rooting; cytokinins - shoot multiplication.

INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus grandis* é uma das essências florestais mais importantes na produção de celulose e papel no Brasil. As técnicas de cultura *in vitro* tem sido empregadas como um método alternativo de propagação desta espécie. A micropropagação do *E. grandis* tem se mostrado eficiente na multiplicação massal de genótipos superiores, muitos deles difíceis de serem propagados pelos métodos tradicionais de propagação vegetativa (IKEMORI, 1987). Por outro lado, mesmo sob as condições de cultivo *in vitro* tem-se observado uma extensa

variabilidade interespecífica e intraespecífica na capacidade de enraizamento no gênero *Eucalyptus* (WILLYAMS et al., 1992). Isto também ocorre no *E. grandis*, sendo que a dificuldade de enraizamento é um dos fatores limitantes na propagação massal de muitos de seus clones selecionados.

Alguns fatores que influenciam a capacidade de enraizamento *in vitro* em *E. grandis* tem sido estudados e tem-se buscado a adequação destes para que sejam atingidos melhores resultados. Dentre esses fatores podem ser citados a exsudação de compostos fenólicos e a posição do explante na planta-mãe (DURAND-CRESSWELL & NITSCH, 1977); efeitos de diferentes auxinas (SANKARA-RAO & VENKATESWARA, 1985); efeitos dos nutrientes, do pH do meio de enraizamento e do número de subcultivos no meio de multiplicação (WARRAG et al., 1990).

Recentemente, BENNETT et al. (1992) avaliaram o efeito de duas citocininas na multiplicação e subsequente enraizamento de várias espécies de *Eucalyptus*. Os autores evidenciaram que, para a maioria dos clones avaliados, a maior porcentagem de enraizamento ocorreu em brotações oriundas da alternância de citocininas no meio de multiplicação finalizando com cinetina, sendo que a utilização de BAP na multiplicação ou no último subcultivo reduziu a capacidade de enraizamento. Esta inibição já foi evidenciada em *E. gunnii* (CURIR et al., 1990); *E. nitens* (RASMUSSEN, 1991); *E. regnans* (BLOMSTEDT et al., 1991); *E. globulus*, *E. marginata* e *E. occidentalis* (BENNETT et al., 1992).

Para o *E. grandis* evidenciou-se que o uso de BAP no meio de enraizamento, mesmo em baixas concentrações, inibe completamente a formação de raízes (WARRAG et al., 1990), mas ainda não foi estabelecido o seu efeito no meio de multiplicação.

Estas informações devem ser consideradas no processo de micropropagação do *E. grandis*, uma vez que na sua multiplicação e alongamento é utilizado, geralmente, o BAP como citocinina.

Com base no exposto, este trabalho teve como objetivo estabelecer o efeito de diferentes citocininas, bem como sua alternância, na multiplicação e capacidade de enraizamento de três clones de *E. grandis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Fonte de material

Foram utilizados como fonte de material três clones de *E. grandis* obtidos da CENIBRA FLORESTAL S/A. Os clones foram introduzidos *in vitro* a partir de segmentos nodais e mantidos em condições de cultivo em meio contendo macro e micronutrientes de MURASHIGE & SKOOG (1962), vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968), sacarose 3% (p/v), BAP (6-Benzilaminopurina) 0,5mg/l e AIB (ácido-3-indol-butírico) 0,05mg/l, solidificado com ágar 0,55% (p/v). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. As brotações foram subcultivadas em intervalos de 21 dias por cerca de 3 anos antes do experimento ser realizado.

Multiplicação das brotações

O meio utilizado é basicamente o mesmo descritor anteriormente, com as seguintes modificações: apenas uma das citocininas (BAP; 2iP - 6-(, -dimetilamino) purina ou CIN - 6-furfurilamino-purina) foi acrescentada ao meio, na concentração de 0,5mg/l e foi acrescido de 2mg/l de glicina.

Os tratamentos basearam-se na alternância de citocininas ou no uso contínuo de apenas uma delas, conforme Tabela 1. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento em cada clone, sendo que cada repetição foi composta por qua-

tro brotações. Os subcultivos foram realizados em intervalos de 21 dias, sendo que em cada um deles os explantes foram avaliados quanto ao número de brotações com mais de 5 mm de comprimento.

Tabela 1. Tratamentos efetuados para avaliar o efeito de diferentes citocininas e sua alternância na multiplicação e enraizamento de clones de *E. grandis*.

Tratamentos	Subcultivo 1	Subcultivo 2	Subcultivo 3
T1	BAP	2iP	CIN
T2	2iP	BAP	CIN
T3	2iP	CIN	BAP
T4	CIN	2iP	BAP
T5	BAP	CIN	2iP
T6	CIN	BAP	2iP
T7	BAP	BAP	BAP
T8	2iP	2iP	2iP
T9	CIN	CIN	CIN

Enraizamento das brotações

O enraizamento foi estabelecido em meio KNOP (KNOP, 1865), acrescido de 1mg/l de AIB (ácido indol butírico), 1,5% (p/v) de sacarose, solidificado com 0,55% (p/v) de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 15 repetições por tratamento por clone. As brotações foram mantidas no escuro por 5 dias e, posteriormente, transferidas para fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro, sob 2000 lux de intensidade luminosa. A temperatura foi mantida em 25°C ± 2°C. Na avaliação, feita após 15 dias, foram consideradas a porcentagem de enraizamento e o número de raízes por brotação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferentes citocininas (BAP, 2iP e CIN) afetaram significativamente a multiplicação dos três clones desde o primeiro subcultivo. Observou-se que no subcultivo contínuo em meio com 2iP ocorreu uma menor taxa de multiplicação do que com as demais citocininas, como pode ser observado pela média dos clones no Tratamento 8 (T8 - Tabela 2).

Na análise do número de brotações obtidas nos três subcultivos evidenciou-se que tanto a alternância de citocininas quanto o uso contínuo de BAP promoveram as maiores taxas de multiplicação, considerando apenas as brotações com mais de 5 mm (Tabela 2). Entretanto, para brotações com menos de 5 mm o uso contínuo de BAP mostrou-se mais benéfico, conforme avaliação visual. A obtenção de elevadas taxas de multiplicação utilizando BAP como citocinina para a espécie *E. grandis* foi evidenciada por outros autores (SANKARA RAO & VENKATESWARA, 1985; WARRAG et al., 1990).

Foi detectada uma diferença significativa entre os clones, bem como interação clone x tratamento significativa para as taxas de multiplicação (Tabela 2).

Quando os clones foram cultivados em meios alternando as citocininas (T1 a T6) observaram-se alterações morfológicas nos explantes. No primeiro subcultivo, em meio com 2iP ou com cinetina (CIN) evidenciou-se um maior alongamento das brotações e uma intensa formação de calos. No segundo subcultivo observou-se uma redução nos calos e um maior alongamento das brotações, principalmente quando eram cultivadas em meio com 2iP precedido de CIN (T4). Esse resultado foi confirmado no terceiro subcultivo em que ocor-

reu a mesma sequência de citocininas (T5). O subcultivo contínuo em meio com 2iP ou CIN causou uma degeneração dos explantes, com intensa formação de calos e abscisão foliar. Esta característica não foi observada em brotações subcultivadas continuamente em BAP.

Tabela 2. Multiplicação de brotações de *E. grandis* em função dos tratamentos após três subcultivos com diferentes citocininas.

Sequência de citocininas	Número médio de brotações (maiores que 5mm)			
	clone 1	clone 2	clone 3	Médias
T1 (BAP-2iP-CIN)	6,65a(ab)	5,05b(a)	7,20a(a)	6,30a
T2 (2iP-BAP-CIN)	6,45a(ab)	4,60b(a)	5,57ab(ab)	5,60abc
T3 (2iP-BAP-CIN)	5,45ab(b)	4,20b(a)	5,85a(ab)	5,16bc
T4 (CIN-2iP-BAP)	6,35a(ab)	4,50b(a)	6,15a(ab)	5,67ab
T5 (BAP-CIN-2iP)	7,50a(a)	5,70b(a)	5,95b(ab)	6,38a
T6 (CIN-BAP-2iP)	6,90a(ab)	5,65a(a)	6,55a(a)	6,36a
T7 (BAP-BAP-BAP)	6,60a(ab)	5,90a(a)	6,00a(ab)	6,17ab
T8 (2iP-2iP-2iP)	5,30a(b)	4,20a(a)	4,70a(b)	4,73c
T9 (CIN-CIN-CIN)	6,65a(ab)	4,90b(a)	6,15ab(ab)	5,90ab
Médias	6,43a	4,97b	6,03a	

Diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,01$) pelo teste de Tukey.

Letras entre parênteses indicam diferenças para meios dentro de clone e fora para clones dentro de meio. (c.v.% = 13,5)

Os três clones apresentaram diferentes taxas de enraizamento, bem como, diferentes respostas quando considerados os meios nos quais foram subcultivados (Tabela 3). O clone 1 apresentou maior porcentagem de enraizamento (66,7%) nas brotações provenientes da alternância BAP-CIN-2iP (T5), não enraizando com BAP no último subcultivo. O clone 2 apresentou a maior porcentagem de enraizamento (60%) nas brotações provenientes da alternância CIN-BAP-2iP (T6) ou no uso contínuo de 2iP (T8). O clone 3 apresentou maior porcentagem de enraizamento (46,7%) nas brotações provenientes de subcultivos contínuos em meio com CIN, não enraizando quando BAP era utilizado no último meio de subcultivo.

Tabela 3. Efeito residual das citocininas na porcentagem de enraizamento (E) e número médio de raízes por brotação enraizada (NR) de *E. grandis*.

Sequência de citocininas	Clone 1		Clone 2		Clone 3	
	E(%)	NR	E(%)	NR	E(%)	NR
T1 BAP-2iP-CIN	33,3abc	1,2	6,7b	4,0	13,3ab	2,5
T2 2iP-BAP-CIN	20,0bc	2,3	20,0ab	1,3	26,7ab	2,0
T3 2iP-CIN-BAP	0,0c	0,0	0,0b	0,0	0,0b	0,0
T4 CIN-2iP-BAP	0,0c	0,0	13,3b	1,3	0,0b	0,0
T5 BAP-CIN-2iP	66,7a	2,0	0,0b	0,0	26,7ab	1,0
T6 CIN-BAP-2iP	60,0ab	2,8	60,0a	2,1	6,7ab	3,0
T7 BAP-BAP-BAP	0,0c	0,0	0,0b	0,0	0,0b	0,0
T8 2iP-2iP-2iP	46,7ab	1,7	60,0a	1,7	26,7ab	1,3
T9 CIN-CIN-CIN	46,7ab	2,0	13,3b	1,5	46,7a	1,4

Diferentes letras indicam diferenças significativas entre tratamentos ($P < 0,01$) pelo teste de Tukey.

(c.v. para porcentagem de enraizamento = 13,7%, com transformação $(x + 1)$).

As porcentagens de enraizamento obtidas foram bastante significativas quando comparadas com os dados de enraizamento dos mesmos clones obtidos sob outras condições pela CENIBRA FLORESTAL S/A (VIANA, V., 1993, comunicação pessoal). As médias de enraizamento fornecidas foram de 42%, 62% e 10% para os clones 1, 2 e 3, respectivamente, enquanto que as obtidas no presente trabalho equivaleram a 66,7%, 60,0% e 46,7%, para os mesmos clones. Por esses dados observa-se que o efeito das citocininas apenas não é evidente para o clone 2, cujas médias foram praticamente semelhantes nos dois diferentes trabalhos.

No presente trabalho, evidenciou-se que o efeito inibitório do BAP sobre a capacidade de formação de raízes na espécie *E. grandis* não ocorreu apenas quando este foi usado no meio de enraizamento como reportado por WARRAG et al. (1990), mas também quando foi usado no meio do último subcultivo antes do enraizamento (Tabela 3).

Num mesmo clone, para porcentagens de enraizamento iguais ou semelhantes evidenciou-se a formação de diferentes números de raízes por brotação enraizada (Tabela 3). Esta característica é importante na aclimação e fases posteriores, como fixação da planta ao solo e absorção de nutrientes. Desta forma, deve ser considerada também como critério na escolha da melhor condição de cultivo *in vitro*.

Em *E. gumii* a baixa taxa de enraizamento foi correlacionada com os baixos níveis de flavonóides endógenos (principalmente glicosídeos de quercitina) observados em brotações provenientes de meio com BAP em relação àquelas de meio com cinetina ou zeatina. Observaram-se que a adição de quercitina e isoquercitina ao meio de enraizamento elevava a taxa de enraizamento de brotações provenientes de meio com BAP (CURIR et al., 1990).

Para o *E. globulus* a adição de quercitina ao meio de enraizamento não afetou o desenvolvimento de raízes em brotações provenientes de meio de multiplicação com BAP, mas inibiu o enraizamento de brotações provenientes de meio com cinetina (BENNETT et al., 1992). Estes resultados demonstraram que o efeito flavonóides não pode ser generalizado para as espécies de *Eucalyptus*, sendo que para *E. grandis* o envolvimento de flavonóides no enraizamento deverá ainda ser investigado.

Pelos resultados obtidos para o enraizamento dos três clones nas diferentes condições de cultivo pode-se observar a existência de interação clone x meio de multiplicação na formação de raízes. A ocorrência de interação demonstra a importância de serem avaliados vários genótipos antes de se estabelecer a resposta de uma dada espécie ao cultivo *in vitro*.

Tendo sido evidenciado o efeito das citocininas usadas no meio de multiplicação, bem como sua alternância, no enraizamento de clones de *E. grandis*, sugere-se a realização de testes em outros clones da espécie que apresentem taxas insatisfatórias, visando uma otimização e maior viabilidade econômica da técnica.

CONCLUSÕES

- As citocininas usadas no meio de multiplicação, bem como a sua alternância, influenciaram na capacidade de enraizamento dos clones de *Eucalyptus grandis* avaliados.

- O BAP usado no meio de multiplicação, ou no último subcultivo, reduziu ou impediu o enraizamento dos clones de *E. grandis* avaliados.

- A utilização das citocininas CIN e 2iP, alternadas ou em sequência, elevaram a porcentagem de enraizamento dos clones testados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao corpo técnico da CENIBRA FLORES-

TAL S/A por gentilmente cederm os clones de *E. grandis* utilizados neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENNETT, I.J.; McCOMB, J.A.; TONKIN, C.M.; McDAVID, D.A.J. Effect of cytokinins on multiplication and rooting of *Eucalyptus globulus* and other *Eucalyptus* species. In: SYMPOSIUM MASS PRODUCTION TECHNOLOGY FOR GENETICALLY IMPROVED FAST GROWING FOREST TREE SPECIES, 1992, Bordeaux, França. Proceedings, p. 195-202.
- BLOMSTEDT, C.; CAMERON, J.; WHITEMAN, P.; CHANDLER, S. Micropropagation of juvenile *Eucalyptus regnans* (Mountain Ash.) Australian Journal of Botany, v.39, p.179-186, 1991.
- CURR, P.; VANSUMERE, C.F.; TERMINI, A.; BARTHE, P.; MARCHESINI, A.; DOLCI, M. Flavonoid accumulation is correlated with adventitious roots formation in *Eucalyptus gumii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. Plant Physiology, v.92, p.1148-1153, 1990.
- DURANDI-CRESSWELL, R.; NITSCH, C. Factors influencing the regeneration of *Eucalyptus grandis* by organ culture. Acta Horticulturæ, v.78, p.149-155, 1977.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., v.50, p.151-158, 1968.
- KEMORI, Y.K. Epicormic shoots from the branches of *Eucalyptus grandis* as an explant source for *in vitro* culture. Commonwealth Forestry Review, v.66, p.351-356, 1987.
- KNOP, W. Quantitative untersuchungen uber die ernahrungsprozesse der pflanzen. Landwirtsch. Vers. Stn., v.7, p.93, 1865.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiologia Plantarum, v.15, p.473-497, 1962.
- RASMUSSEN, G.F. Micropropagation of *E. nitens* and hybrid clones. In: RWGI (FOREST GENETIC) MEETING, 11, 1991, Coonawarra, S. Australia. Proceedings, p.106-109.
- SANKARA RAO, K.; VENKATESWARA, R. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Eucalyptus grandis* L. Plant Science, v.10, p.51-55, 1985.
- WARRAG, E.I.; LESLEY, M.S.; ROCKWOOD, D.L. Micropropagation of field tested superior *Eucalyptus grandis* hybrids. New Forests, v.4, p.67-79, 1990.
- WILLIAMS, D.; WHITEMAN, P.; CAMERON, J.; CHANDLER, S.F. Inter- and intra-family variability for rooting capacity in micropropagated *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*. In: SYMPOSIUM MASS PRODUCTION TECHNOLOGY FOR GENETICALLY IMPROVED FAST GROWING FOREST TREE SPECIES, 1992, Bordeaux, França. Proceedings, p.177-181.

FLORAÇÃO DE *Eucalyptus dunnii* MAIDEN EM DIFERENTES POSIÇÕES DA COPA

Valderês Aparecida de Sousa

José Elidney Pinto Junior

EMBRAPA/CNPFFlorestas - Colombo-PR

RESUMO

Os estudos de fenologia reprodutiva fornecem as principais ferramentas para a compreensão dos processos de florescimento, principalmente a polinização, que são importantes fatores na produção de sementes de qualidade superior. Avaliações periódicas são necessárias para possibilitar o conhecimento da dinâmica dos processos reprodutivos e assegurar a ocorrência da panmixia. Isto garante o sucesso, a longo prazo, dos programas de melhoramento genético. O objetivo deste trabalho foi levantar o período de floração em um Banco Clonal de *Eucalyptus dunnii*, localizado no município de Colombo-PR, e averiguar a influência da posição do órgão reprodutivo no florescimento. O período de observação compreendeu todo o ano de 1991, com concentração de observação da floração nos meses de fevereiro a maio, em 18 clones, num total de 61 árvores. Os resultados mostraram que 62,9% das árvores apresentaram flores em períodos distintos, com pico de floração ocorrendo entre os meses de fevereiro a março. Verificou-se, também, uma maior porcentagem de flores na face norte e no terço superior da copa. O terço superior também foi o que apresentou "maior período de tempo florescendo", embora nem sempre foi o primeiro a florescer.

Palavras-chaves: Floração/florescimento; fenologia reprodutiva; banco clonal; *Eucalyptus dunnii*.

ABSTRACT

Studies on reproductive phenology provide the main tools to understand flowering processes and effective pollination, which are important factors in the production of high quality seed. Periodic evaluations are necessary, to describe the dynamics of reproductive processes promoting panmixis. These processes will determine the long term success of breeding programs. We studied flowering in a clonal bank of *Eucalyptus dunnii*, in Colombo (PR-Brazil), to examine the distribution of flowers at different positions within the canopy. The evaluations have covered the year 1991. Observing 18 clones and a total of 61 trees, we concluded that flowering concentrated between February and May, 62.9% of the trees had distinctive flowering periods and the peak of flowering occurred between February and March. The highest percentage of flowers were located at the Northern side and in the upper third of the canopy. This part of the canopy also flowered for a longer period of time, but it was not always the site of flowering initiation.

Key words: Flowering; reproductive phenology; clonal bank; *Eucalyptus dunnii*.

INTRODUÇÃO

Dentre as principais espécies potencialmente econômicas para a silvicultura brasileira, em climas subtropicais, destaca-se *Eucalyptus dunnii* Maiden, pelas suas características de crescimento, tolerância às geadas e múltiplos usos. Contudo, problemas relacionados à produ-