

Enraizamento “ex vitro” de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e alongadas “in vitro”

*“Ex vitro” rooting of “in vitro” multiplied and elongated
shoots of Eucalyptus spp.*

Aloísio Xavier; João Comério

ABSTRACT: Rooting of in vitro cultivated *Eucalyptus* spp. shoots directly in the greenhouse was attempted aiming to simplify the micropropagation process. For that, four growth regulator levels and four rooting periods in the greenhouse were tested. Three hybrid clones of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (H5, H12 and H13), grown in micropropagation laboratory, were evaluated. The results showed the viability of this process. The best treatment was that in which the “in vitro” elongated shoots were removed from the laboratory to a 10 - 15 days rooting period in the greenhouse, without any growth hormone treatment on the shoot base.

KEYWORDS: Vegetative Propagation, Rooting, Tissue Culture, Micropropagation of *Eucalyptus* spp.

RESUMO: Objetivando a simplificação do processo de micropropagação de *Eucalyptus* spp. pela transferência de gemas alongadas “in vitro” para enraizamento em casa de vegetação (“ex vitro”), foram testadas quatro doses de regulador de crescimento, associadas a quatro períodos de permanência em casa de vegetação. Foram avaliados três clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (H5, H12 e H13), cultivados em laboratório de micropropagação. Os resultados obtidos indicaram ser este um processo viável, onde o melhor tratamento foi aquele em que gemas alongadas “in vitro” foram enraizadas em casa de vegetação, sem aplicação de regulador de crescimento na base e com permanência entre 10-15 dias.

PALAVRAS-CHAVE: Propagação Vegetativa, Enraizamento, Cultura de Tecidos, Micropropagação de *Eucalyptus* spp.



INTRODUÇÃO

Dentre as técnicas de cultura de tecidos de plantas, a micropropagação tem sido a mais difundida e com aplicações práticas comprovadas. Apesar de ser uma técnica recente na área florestal, esta já se encontra embutida nos programas de melhoramento que, na maioria das vezes, objetivam a maximização ou manutenção do valor genético do clone a ser propagado, permitindo, assim, acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa, dentre outras finalidades.

Murashige (1974) esquematizou a micropropagação “in vitro” basicamente em: a) seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas; b) multiplicação dos propágulos através de sucessivas subculturas em meio próprio para multiplicação e c) transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo. Vale salientar que este esquema padrão não precisa ser necessariamente seguido, permitindo alterações conforme as peculiaridades de cada espécie.

Assim, na busca da otimização do processo de micropropagação, a eliminação da etapa de enraizamento “in vitro” é altamente desejável sob o aspecto econômico e o de qualidade do sistema radicular formado na planta. Segundo Grattapaglia e Machado (1990), o enraizamento “ex vitro”, sob o ponto de vista econômico, representa uma considerável redução de custos de mão-de-obra e infra-estrutura, pois uma repicagem é eliminada e há uma economia de espaço de sala de crescimento, energia elétrica e meio de cultura. Quanto à qualidade, o enraizamento “ex vitro” tende a produzir um sistema radicular mais completo e funcional, evitando-se a manipulação de plan-

tas de raiz nua. Além disso, a regeneração de raízes diretamente no substrato tende a produzir um sistema radicular com maior número de raízes secundárias, sem a formação intermediária de calo, que dificulta a conexão do sistema vascular entre caule e raiz. O enraizamento “ex vitro”, segundo estes mesmos autores, é sinônimo de microestaquia.

Alguns trabalhos nesta linha de pesquisa já foram realizados, tais como o de Driver e Suttle (1987), trabalhando com um híbrido de *Juglans*, onde o cultivo das partes aéreas em altas concentrações de sacarose e a aplicação de auxina (AIB) em talco antes do plantio destacou-se entre os diversos tratamentos. Outros autores, tais como Monette (1986) e Dunstan e Turner (1984), trabalhando com outras culturas, também obtiveram sucesso no enraizamento de partes aéreas diretamente em substrato, após tratamento com auxina (AIB) em solução aquosa. Entretanto, alguns autores obtiveram excelentes resultados quando enraizaram partes aéreas alongadas “in vitro” diretamente em substrato, sem aplicação de auxina (Lloyd e McCown, 1980; Ahuja, 1984).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi de avaliar a viabilidade da transferência de gemas alongadas “in vitro” para enraizamento em casa de vegetação (enraizamento “ex vitro”) de clones de híbridos de *Eucalyptus* spp.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo, foram utilizados 3 clones de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (H5, H12 e H13) existentes em banco clonal “in vitro” e cultivados (fase multiplicação e alongamento)



em meio de cultura JADS, definido por Correia (1993). Os tratamentos testados foram quatro (4) doses de regulador de crescimento para enraizamento e quatro (4) períodos de permanência em casa de vegetação, conforme descrito a seguir:

Doses de regulador de crescimento para enraizamento aplicadas na base das gemas alongadas “in vitro” (DH):

- DH1 - sem aplicação de regulador de crescimento para enraizamento;
- DH2 - 600 ppm de AIB (ácido indolilburtírico) + 0,4% de Captan + 0,4% de ácido bórico;
- DH3 - 1.500 ppm de AIB (ácido indolilburtírico) + 1,0% de Captan + 1,0% de ácido bórico;
- DH4 - 3.000 ppm de AIB (ácido indolilburtírico) + 2,0% de Captan + 2,0% de ácido bórico.

Período de permanência em casa de vegetação para enraizamento das gemas (PCV):

- A - Permanência de 10 dias em casa de vegetação;
- B - Permanência de 15 dias em casa de vegetação;
- C - Permanência de 20 dias em casa de vegetação;
- D - Permanência de 25 dias em casa de vegetação.

Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso, num esquema fatorial 3 x 4 x 4 (3 clones, 4 doses de regulador de crescimento para enraizamento (DH) e 4 períodos de permanência na casa de vegetação (PCV)), sendo 4 repetições com 10 plantas por parcela.

Procedimentos:

Gemas alongadas “in vitro” (> 1,5cm de comprimento) foram transplantadas diretamente em tubetes plástico (55cm³) em

casa de vegetação, recebendo na base as doses de regulador de crescimento para enraizamento, conforme tratamento.

O substrato utilizado para enchimento dos tubetes foi uma mistura de 50% de palha de arroz carbonizada, 30% de vermiculita e 20% de terra de subsolo. Nos 2,0 cm da camada superior do tubete foi utilizado como substrato apenas palha de arroz carbonizada moída.

As condições da casa de vegetação, da casa de sombra/aclimatação e a de pleno sol (controle fitossanitário, irrigação, temperatura, adubação etc.) para a formação da muda foi a comumente utilizada pelo viveiro de estaquia da CHAMFLORA AGRÍCOLA LTDA, ou seja, após os 10 a 25 dias (tratamentos) em casa de vegetação as mudas foram transferidas para casa de sombra (permanência de 10 dias) e em seguida para pleno sol, até completar 90 dias.

Foram realizadas avaliações quanto à percentagem de enraizamento em casa de vegetação (PECV) e ao índice de aproveitamento das mudas (I.A. = número de mudas prontas aos 90 dias de idade / número de gemas colocadas para enraizamento em casa de vegetação). Também determinou-se a altura (ALT) e o diâmetro de colo (DC) das mudas aos 90 dias de idade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise de variância mostraram diferenças significativas ($P < 0,05$) para a interação Clone X DH quanto às características de PECV, I.A. e ALT, ou seja, para estas características, existem respostas diferenciadas dos clones testados quanto à dosagem do regulador de crescimento utilizado. Quanto à interação Clone X PCV, esta mostrou diferença significativa ($P < 0,05$) para as características PECV,



Tabela 1

Análise de Variância da Percentagem de Enraizamento em Casa de Vegetação (PECV), Índice de Aproveitamento de Mudanças (I.A.), Altura (ALT) e Diâmetro de Colo (DC) de Clones Micropropagados de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (H5, H12 e H13), a Partir do Enraizamento Direto em Casa de Vegetação de Gemas Alongadas "in vitro", Submetidas a Diferentes Períodos de Permanência em Casa de Vegetação (PCV) e Doses de Regulador de Crescimento para Enraizamento (DH).

Variance analysis of the rooting percentual in greenhouse (PECV), utilization index (IA), height (ALT) and colon diameter (DC) of micropropagated clones of Eucalyptus grandis x E. urophylla (H5, H12 e H13), from the direct rooting of "in vitro" elongated shoots in greenhouse, submitted to different rooting periods in greenhouse (PCV) and growth regulator levels to rooting (DH).

FV	Quadrados		Médios		
	GL	PECV (1)	I.A. (1)	ALT (cm)	DC (mm)
Bloco	3	0,0110	0,0291	29,59	0,1347
Clone	2	4,8712 **	4,0356 **	154,55 **	1,1232 **
DH	3	1,6581 **	1,3762 **	119,61 **	0,1429 n.s.
PCV	3	0,0442 n.s.	0,1998 **	820,93 **	5,8951 **
Clone x DH	6	0,3839 **	0,2122 **	16,05 *	0,0716 n.s.
Clone x PCV	6	0,1865 **	0,0623 n.s.	50,93 **	0,4062 **
DH x PCV	9	0,0203 n.s.	0,0210 n.s.	5,31 n.s.	0,0835 n.s.
Clone x DH x PCV	18	0,0114 n.s.	0,0174 n.s.	9,16 n.s.	0,0520 n.s.
Resíduo	141	0,0417	0,0429	7,06	0,0739
CV _{exp.} (%)		20,64	22,63	12,32	9,60

(1) - Dados transformados por $\text{arc.sen } [y/100]^{1/2}$ para realização da análise da variância;

*, ** - Significativo a 1% e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F;

n.s - Não-significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

ALT, DC, indicando a importância do período de permanência em casa de vegetação na performance de cada clone na produção de mudas. As interações DH X PCV e Clone X DH X PCV mostraram efeito não-significativo ($P > 0,05$) pelo teste F para as características avaliadas.

Os valores de coeficientes de variação experimental ($CV_{\text{exp.}}$) se apresentaram condizentes com outros trabalhos semelhantes e segundo Pimentel-Gomes (1987), de modo geral, são considerados como valores médios.

A seguir, são apresentados alguns comentários baseados nos valores das médi-

as das características avaliadas, representadas nas Figuras 1, 2, 3 e 4.

Tratamentos para Enraizamento

Pode-se observar na Figura 1 que os clones H5 e H12 apresentaram menor percentagem de enraizamento (PECV) com aumento da dosagem de regulador de crescimento aplicado. Entretanto, o clone H13, de modo geral, mostrou-se indiferente às dosagens de regulador de crescimento utilizadas, porém, mantendo um bom índice de enraizamento. A característica I.A. (Fi-



gura 2) apresentou-se de forma semelhante à característica PECV, onde se pode verificar um baixo índice de perda de mudas devido ao processo de aclimação e formação da muda até 90 dias.

Quanto à característica de crescimento em altura das mudas aos 90 dias de idade (ALT) (Figura 3), de modo geral, observa-se que os clones H5 e H12 apresentam alturas ligeiramente menores quando utilizaram maiores doses de regulador de crescimento, enquanto o clone H13 mostra-se indiferente às dosagens de regulador de crescimento aplicadas.

Estes resultados indicam que o processo de micropropagação induz rejuvenescimento vegetativo, dada a facilidade de enrai-

zamento em casa de vegetação sem utilização de regulador de crescimento.

Permanência em Casa de Vegetação

Quanto ao efeito da permanência em casa de vegetação, o clone H13 mostra-se indiferente quanto à percentagem de enraizamento em casa de vegetação (PECV) (Figura 1), entretanto, os clones H5 e H12 apresentam perda de vigor, representada pela redução dos valores médios da percentagem de enraizamento para os tratamentos com maior período de permanência em casa de vegetação. Com referência à característica avaliada I.A. (Figura 2), esta apresenta-se de

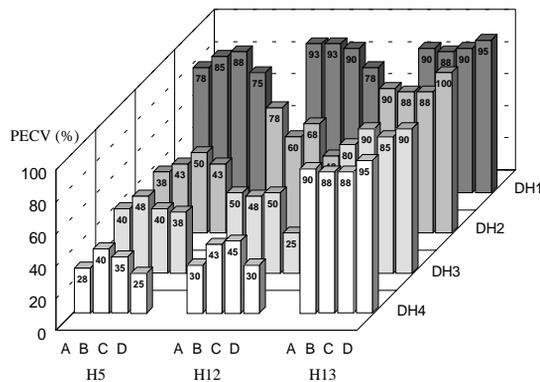


Figura 1

Valores Médios da Percentagem de Enraizamento em Casa de Vegetação (PECV) de Clones Micropropagados de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (H5, H12 e H13), a Partir do Enraizamento Direto em Casa de Vegetação de Gemas Alongadas “in vitro”, Submetidas a Diferentes Períodos de Permanência em Casa de Vegetação (A, B, C e D) e Doses de Regulador de Crescimento para Enraizamento (DH1, DH2, DH3 e DH4).

Mean values of rooting rate in the greenhouse (PECV) of micropropagated clones of Eucalyptus grandis x E. urophylla (H5, H12, H13), from the direct rooting of "in vitro" elongated shoots in greenhouse, submitted to different rooting periods in greenhouse (A, B, C and D) and growth regulator levels to rooting (DH1, DH2, DH3 and DH4).

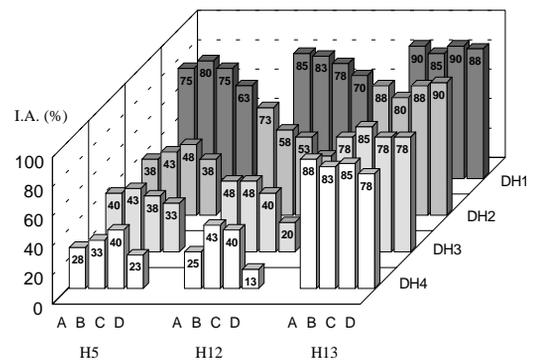


Figura 2

Valores Médios do Índice de Aproveitamento (I.A.) de Clones Micropropagados de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (H5, H12 e H13), a Partir do Enraizamento Direto em Casa de Vegetação de Partes Aéreas Alongadas “in vitro”, Submetidas a Diferentes Períodos de Permanência em Casa de Vegetação (A, B, C e D) e Doses de Regulador de Crescimento para Enraizamento (DH1, DH2, DH3 e DH4).

Mean values of utilization index (I.A.) of micropropagated clones of Eucalyptus grandis x E. urophylla (H5, H12 e H13), from the direct rooting of "in vitro" elongated shoots in greenhouse, submitted to different rooting periods in greenhouse (A, B, C and D) and growth regulator levels to rooting (DH1, DH2, DH3 and DH4).



Figura 3

Valores Médios da Altura das Mudas aos 90 dias de Idade (ALT) de Clones Micropropagados de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (H5, H12 e H13), a Partir do Enraizamento Direto em Casa de Vegetação de Gemas Alongadas “in vitro”, Submetidas a Diferentes Períodos de Permanência em Casa de Vegetação (A, B, C e D) e Doses de Regulador de Crescimento para Enraizamento (DH1, DH2, DH3 e DH4).

Mean values of height at 90 days old seedlings (ALT) of micropropagated clones of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (H5, H12 e H13), from the direct rooting of “in vitro” elongated shoots in greenhouse, submitted to different rooting periods in greenhouse (A, B, C and D) and growth regulator levels to rooting (DH1, DH2, DH3 and DH4).

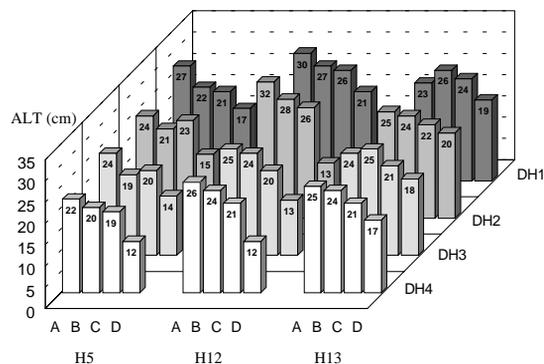
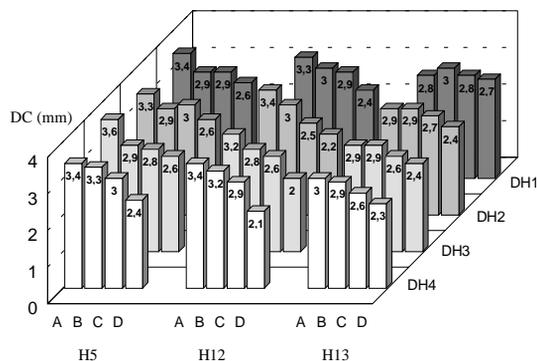


Figura 4

Valores Médios do Diâmetro de Colo das Mudas aos 90 Dias de Idade (DC) de Clones Micropropagados de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (H5, H12 e H13), a Partir do Enraizamento Direto em Casa de Vegetação de Gemas Alongadas “in vitro”, Submetidas a Diferentes Períodos de Permanência em Casa de Vegetação (A, B, C e D) e Doses de Regulador de Crescimento para Enraizamento (DH1, DH2, DH3 e DH4).

Mean values of colon diameter at 90 days old seedlings (DC) of micropropagated clones of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (H5, H12 e H13), from the direct rooting of “in vitro” elongated shoots in greenhouse, submitted to different rooting periods in greenhouse (A, B, C and D) and growth regulator levels to rooting (DH1, DH2, DH3 and DH4).



forma semelhante à característica PECV, confirmando, inclusive, o baixo índice de perda de mudas devido ao processo de aclimação em casa de sombra e formação da muda até os 90 dias de idade. Quanto às características de crescimento em altura (ALT) e diâmetro de colo (DC) das mudas aos 90

dias de idade (Figura 3 e 4), observa-se, de forma geral, que quanto maior o tempo de permanência em casa de vegetação, menores são os valores dessas características, ou seja, ocorre um atraso na formação da muda devido ao maior período de permanência em casa de vegetação.



CONCLUSÃO

Com base nos valores encontrados para as características de PECV, I.A., ALT e DC, a transferência de gemas alongadas “in vitro” de clones micropropagados de *Eucalyptus* spp. para enraizamento em casa de vegetação mostra-se altamente viável, pois evita-se a manipulação de plantas de raiz nua, que muitas vezes resultam em má qualidade e até à morte das plantas; reduz o período de formação da muda, uma vez que elimina a etapa de enraizamento “in vitro”; aumenta a capacidade do laboratório na produção de gemas alongadas, dado que o espaço reservado para enraizamento pode ser agora utilizado também para multipli-

cação/alongamento; reduz uma fase de desenvolvimento de pesquisa (enraizamento “in vitro”), além das vantagens já citadas anteriormente.

Para o presente estudo, o procedimento mais recomendado, técnica e economicamente, é aquele em que gemas alongadas “in vitro” são transferidas para enraizamento em casa de vegetação nas seguintes condições:

- sem aplicação de regulador de crescimento na base das gemas alongadas “in vitro”;
- permanência em casa de vegetação entre 10-15 dias.

AUTORES

ALOÍSIO XAVIER é Engenheiro Florestal, Pesquisador Florestal Pleno da Área de Melhoramento Genético Florestal da CHAMPION PAPEL E CELULOSE LTDA. Caixa Postal 176 - 13840-000 - Mogi Guaçu - SP

JOÃO COMÉRIO é Engenheiro Florestal, Gerente da Pesquisa Florestal na CHAMPION PAPEL E CELULOSE LTDA. Caixa Postal 176 - 13840-000 - Mogi Guaçu - SP

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHUJA, M.R.A. Commercially feasible micropropagation method for Aspen. *Silvae Genetica*, v.33, p.4-5, 1984.

CORREIA, D. *Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de Eucalyptus spp. “in vitro” em meio de cultura líquido e sólido*. Piracicaba, 1993. 139 p. (Dissertação - Mestrado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz)

DRIVER, J.A. & SUTTLE, G.R. Nursery handling of propagules. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J., eds. *Cell and tissue culture in forestry*. Dordrech: Martinus Nijhoff, 1987. v.2, p. 320-331.

DUNSTAN, D.I. & TURNER, K.E. The acclimatization of micropropagated plants. In: VASIL, I.K., ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. London: Academic Press, 1984. v.1, p.123-129.



- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília:ABCTP/EMBRAPA - CNPH, 1990. 433 p.
- LLOYD, G. & MCCOWN, B. Commercially-Feasible Micropropagation Of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Intl. Plant. Prop. Soc.*, v.30, p.421-427, 1980.
- MONETTE, P.L. Micropropagation of Kiwifruit using non axenic shoot tips. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v.6, p.73-82, 1986.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*, v.25, p.135-166, 1974.
- PIMENTEL-GOMES, F. *Curso de Estatística Experimental*. 12.ed. Piracicaba: ESALQ/USP, 1987. 467p.