

Efeito de Diferentes Combinações de Fitorreguladores e Vitaminas no Desenvolvimento *in vitro* e *ex vitro* de *Grevillea robusta* Cunn.

Danielle Cristine dos Santos¹
Ivar Wendling²
Fernando Grossi³

Fotos: Ivar Wendling



RESUMO

O objetivo deste trabalho, em sua primeira etapa, foi avaliar o comportamento *in vitro* de explantes de *Grevillea robusta* oriundos de 30 subcultivos *in vitro* em relação aos seguintes tratamentos de alongamento: T1 – 1 mg L⁻¹ de GA3; T2 – 1,2 mg L⁻¹ de AIA + 0,08 mg L⁻¹ de BAP + 5 mg L⁻¹ de Tiamina-HCl; T3 – 0,1 mg L⁻¹ de AIB + 0,1 mg L⁻¹ de BAP e; T4 - 0,1 mg L⁻¹ ANA + 0,05 mg L⁻¹ de BAP. Na segunda etapa, objetivou-se avaliar a possibilidade de enraizamento *ex vitro* dos explantes obtidos e alongados *in vitro*. De forma geral, observou-se a viabilidade da técnica de micropropagação de *Grevillea robusta* para multiplicação e alongamento *in vitro* dos explantes, sem a presença de giberelina na concentração testada no meio de cultura para a multiplicação dos explantes. Em relação ao enraizamento *ex vitro* em casa de vegetação, conclui-se que a técnica é viável e que seu resultado independe dos tratamentos adotados para o alongamento dos explantes.

INTRODUÇÃO

A *Grevillea robusta* é uma espécie florestal de origem australiana; seu nome foi dado em homenagem a C.F. Greville, patrono inglês da botânica. A palavra robusta vem do latim robustus (duro, forte, robusto), em referência ao vigor das árvores da espécie cujo gênero caracteriza-se por muitas espécies arbustivas (Martins, 2000).

A grevilea, como é conhecida popularmente no Brasil, é uma espécie alternativa para reflorestamento por apresentar tolerância a solos de baixa fertilidade. O interesse pela espécie foi despertado pelo seu uso em cortinas quebra-ventos e para proteção das geadas; tem sido utilizada em sombreamento de pastagens com benefícios reconhecidos. Hoje é uma espécie de grande aceitação, graças a seu rápido crescimento, rusticidade, plasticidade e qualidade da madeira (Ferreira e Martins, 1998; Carvalho, 1998; Shimizu, 1998). Diversas empresas moveleiras do Noroeste do Estado do Paraná e São Paulo a utilizam para produzir esquadrias e móveis como camas, mesas e cadeiras (Martins, 2000).

¹ Acadêmica em Química Industrial, Estagiária da *Embrapa Florestas*. olicato@yahoo.com.br

² Engenheiro Florestal, Doutor, Pesquisador *Embrapa Florestas*. ivar@cnpf.embrapa.br

³ Engenheiro Florestal, Doutor, Professor da Universidade Federal do Paraná. fgrossi@floresta.ufpr.br

Embora a produção de mudas de grevilea seja relativamente fácil, principalmente por via sexuada (Harwood, 1992; Harwood, 1989), a micropropagação mostra-se cada vez mais como uma poderosa ferramenta para programas de melhoramento genético, por meio de técnicas como a embriogênese somática, cultura de órgãos, fusão de protoplastos e cultura de embriões e resgate de material modificado geneticamente (Ratnieks e Assis, 1993).

O sucesso da aplicação de técnicas de micropropagação em material adulto de várias espécies arbóreas indica que esta pode ser usada como ferramenta para o rejuvenescimento de genótipos de interesse comercial ou de melhoramento (Bonga e Von Aderkas, 1992; Eldridge et al., 1994; Guimarães et al., 1997; Xavier et al., 1997).

Com o avanço das técnicas de propagação vegetativa por microestaquia, a micropropagação tem servido como ferramenta para a formação de jardins microclonais a partir de explantes de material selecionado no campo, os quais constituem a base para o processo de microestaquia do gênero *Eucalyptus*.

Com relação a *Grevillea robusta*, há poucos registros de trabalhos de pesquisa com micropropagação. Em vista disto e em razão do interesse cada vez maior na espécie, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes relações hormonais e vitaminas no meio de cultura para o alongamento de explantes de *Grevillea robusta*, bem como, sua influência no enraizamento e formação de mudas em condições *ex vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo foram utilizados tufo (brotações múltiplas) de *Grevillea robusta*, originadas de explantes em fase de multiplicação, obtidos a partir de mudas produzidas via semente. Para a desinfestação, os explantes foram submetidos a uma solução contendo 1g L⁻¹ de Benlate (Benomil) por 15', seguida de solução de NaClO a 1% acrescida de 2 gotas de Twenn 20 por 15'. Decorrido os tratamentos, os explantes foram introduzidos em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescido de 3,0% de sacarose e 0,7% de ágar. Uma vez estabelecidos, os explantes foram subcultivados 30 vezes em meio de cultura Jads (Correia, 1993), para multiplicação do material.

Após a fase de multiplicação, os explantes foram transferidos para meio de cultura constituído dos sais básicos de Jads, modificado conforme o Quadro 1, acrescido de 2,5% de sacarose e 0,7% de ágar, com pH ajustado para 5,8, onde foram aplicados os diferentes tratamentos para alongamento.

Quadro 1. Sais e vitaminas utilizados para o preparo do meio de cultura JADS 89.

Composição	Concentração (g L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	32,4
KNO ₃	80,9
Ca (NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	118,1
KH ₂ PO ₄	40,8
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	73,95
MnSO ₄ . 7 H ₂ O	1,69
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,125
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,432
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	7,450
Na ₂ EDTA . 2 H ₂ O	5,560
H ₃ BO ₃	0,310
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,015
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025
KI	0,016
Tiamina-HCl	0,050
Mio Inositol	5,000
Glicina	0,100
Ácido Nicotínico	0,025
Piridoxina HCl	0,025

Foram utilizados quatro tratamentos, com seis repetições e cinco explantes de 1 a 3 cm por repetição, em delineamento inteiramente casualizado, sendo: T1 = 1 mg L⁻¹ de GA3 (Ácido Giberélico); T2 = 1,2 mg L⁻¹ de AIA (Ácido Indol Acético) + 0,08 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) + 5 mg L⁻¹ de Tiamina.HCl; T3 = 0,1 mg L⁻¹ de AIB (Ácido Indol Butírico) + 0,1 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e; T4 = 0,1 mg L⁻¹ de ANA (Ácido Naftalenoacético) + 0,05 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina).

As condições da sala de crescimento foram mantidas sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, a uma temperatura de 25 °C ± 2 °C e intensidade lumínica de 4000 lux.

Para a avaliação dos tratamentos *in vitro*, as seguintes características foram consideradas, trinta dias após os explantes serem submetidos aos diferentes tratamentos: número de tufo produzidos, altura média e peso médio dos tufo e o número de tufo mortos.

Após a avaliação, os explantes alongados *in vitro* (com aproximadamente 1,5 cm de comprimento) foram enraizados *ex vitro*, em tubetes plásticos (55 cm³) em casa de vegetação, com umidade relativa do ar acima de 80% e temperaturas entre 22 a 28° C. O substrato foi formado pela mistura de 35% de casca de arroz carbonizada, 35% de vermiculita fina e 35% de substrato comercial.

As mudas permaneceram durante 25 dias em condições da casa de vegetação e 10 dias em casa de sombra para aclimatação, sendo finalmente transferidas para pleno sol, onde foram avaliadas ao final de 100 dias de idade. Nesta fase *ex vitro*, foram avaliados a taxa de sobrevivência na saída da casa de vegetação, o % de plantas enraizadas na saída da casa de sombra, a sobrevivência, a altura e o diâmetro do colo das mudas.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Conforme pode ser observado na Figura 1 (A e B), foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) para a taxa de multiplicação (número de tufos produzidos) e para o percentual de tufos mortos.

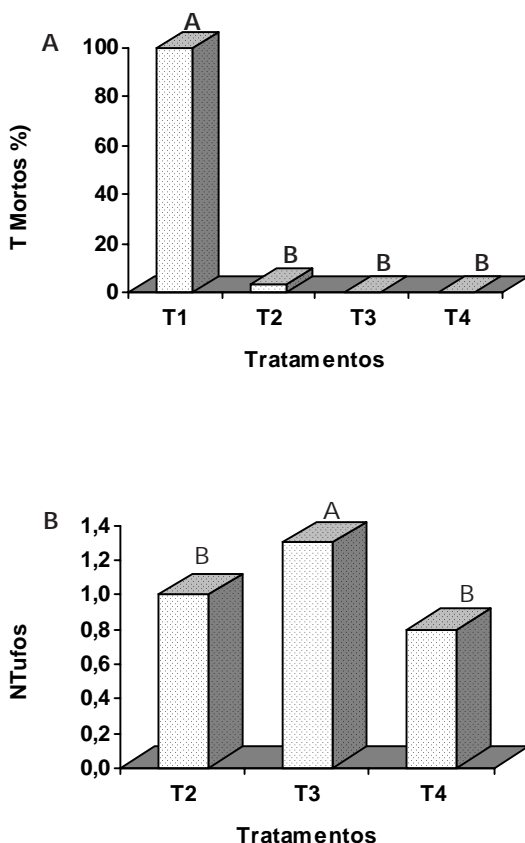


Figura 1. Percentagem média de tufos mortos (T Mortos - A) e número de tufos produzidos (NTufos - B) para cada tufo introduzido *in vitro*. Médias seguidas de uma mesma letra entre os diferentes tratamentos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As giberilinas, principalmente na forma de GA_3 , são conhecidas por estimular o alongamento de partes aéreas dos vegetais. No presente estudo, ao contrário do que se esperava, o tratamento T1 (contendo giberelina a 1 mg L^{-1}) resultou em mortalidade total dos explantes. Tal resultado pode ser devido a um provável efeito tóxico do GA_3 na concentração utilizada, a ineficácia deste fitorregulador para a espécie em questão ou a falta de outros fitorreguladores, como o AIA, o AIB, BAP e ANA, utilizados nos outros tratamentos.

De acordo com a Figura 1 (B) o número de tufos produzidos foi significativamente superior nos tratamentos T2 e T3 (1,0 e 1,4 tufos, respectivamente) em relação ao tratamento T4 (0,8 tufos). As menores taxas de multiplicação obtidas no tratamento T4 ocorreram, provavelmente, por causa da baixa concentração de BAP no meio de cultura. O BAP é um fitorregulador sintético eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies, induzindo a multiplicação de gemas pré-existentes e a formação de gemas adventícias. É sem dúvida a principal fonte de auxina utilizada na micropropagação de plantas (Hasegawa, 1980; Hu e Wang, 1983; Zaerr e Mapes, 1985).

O resultado obtido em T4 indica que uma relação citocinina/auxina mais baixa pode permitir que os explantes direcionem seu esforço metabólico para o alongamento ao invés da multiplicação, como demonstra o resultado apresentado na Figura 2 (A). De acordo com Lundergan e Janick, citados por Hu e Wang (1983), parece que a auxina anula o efeito inibitório que as citocininas têm sobre o alongamento das culturas. Foi verificado, por exemplo, que nos meios de multiplicação de diversos clones de *Eucalyptus*, contendo citocinina, as partes aéreas se alongaram com a adição de AIA e, ou AIB, sugerindo um efeito significativo destas auxinas no meio de alongamento. Contudo, certamente a fonte de auxina também teve efeito sobre os explantes uma vez que os resultados para alongamento obtidos em T3 não diferiram significativamente de T2 e T4, apesar da relação auxina/citocinina neste tratamento ser inferior em relação aos outros dois.

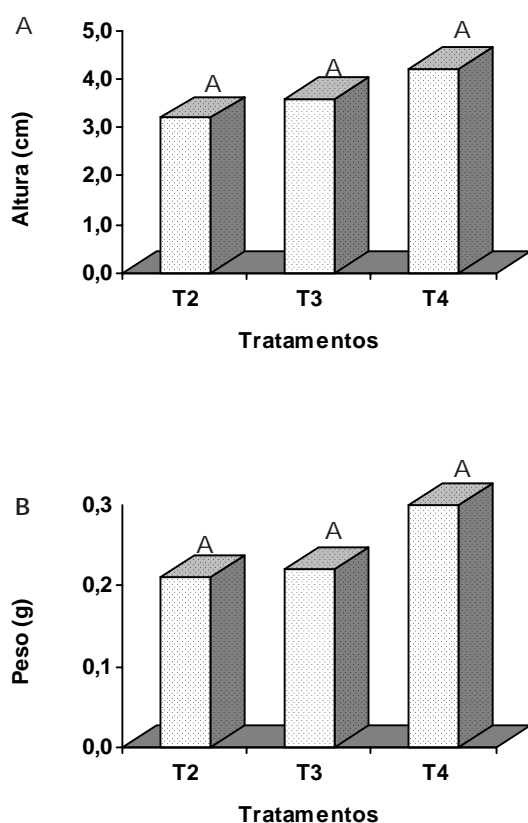


Figura 2. Altura média (A) e peso médio de matéria fresca por tufo produzido (B). Médias seguídas de uma mesma letra entre os diferentes tratamentos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A produção de matéria fresca variou de 0,0 a 0,3 g por tufo, porém não foi afetada significativamente pelos diferentes tratamentos utilizados neste experimento, como mostra a Figura 2 (B). Normalmente, esta característica é afetada pela concentração de citocinina no meio de cultura, a qual induz maior taxa de multiplicação e, conseqüentemente maior absorção dos componentes do meio de cultura em decorrência do estímulo no metabolismo do nitrogênio. Contudo, as baixas concentrações utilizadas neste experimento não devem ter sido suficientes para que este efeito se manifestasse.

A possibilidade de indução de raízes em condições *ex vitro* tem sido observada para algumas espécies vegetais micropropagadas. A eliminação da etapa de enraizamento *in vitro* é aprovada sob o aspecto econômico e da qualidade do sistema radicular, podendo-se produzir um sistema radicular mais completo e funcional, evitando a manipulação da raiz nua (Grattapaglia e Machado, 1990; Xavier e Comério, 1997).

A opção pelo enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* de material micropropagado depende da qualidade das partes aéreas obtidas na multiplicação, da espécie, do genótipo e da disponibilidade de infra-estrutura adequada em casa de vegetação. De maneira geral, pôde-se observar (Fig. 2 A) que a *Grevillea robusta* apresentou um adequado alongamento *in vitro* (de 3,2 a 4,2 cm de comprimento), levando a formação de microestacas com um bom padrão de tamanho para permitir o enraizamento *ex vitro*, de forma similar ao relatado para *Eucalyptus* por XAVIER e COMÉRIO (1997).

Conforme pode ser visualizado na Figura 3 (A e B), microestacas de *Grevillea robusta* possuem uma boa capacidade de enraizamento em condições *ex vitro*. Embora neste estudo o material propagativo tenha sido originado de explantes juvenis, se observa a possibilidade de uso da técnica de micropropagação como forma de multiplicação massal da espécie.

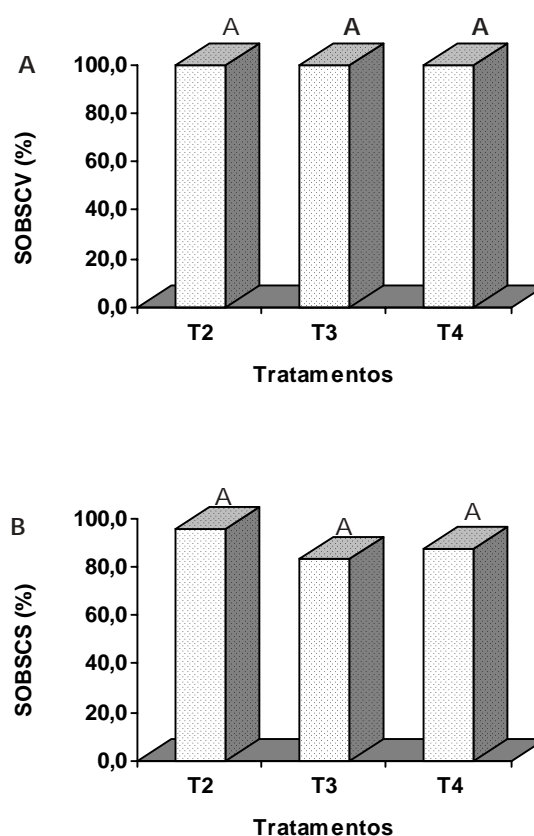


Figura 3. Sobrevivência dos explantes na saída da casa de vegetação (SOBSCV - A) e enraizamento na saída da casa de sombra (SOBSCS - B). Médias seguídas de uma mesma letra entre os diferentes tratamentos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando se analisam as mudas a pleno sol (Figura 4) observa-se uma redução significativa no percentual de sobrevivência (média geral de 56,9%) para todos os tratamentos em relação a sobrevivência na saída da casa de vegetação (média geral de 100%) e enraizamento na saída da casa de sombra (média geral de 88,9%), o que pode ser atribuído a necessidade de maior período de adaptação a estas condições, quando em comparação ao ambiente de casa de vegetação e de sombra (Figura 3A e 3B). Além disso, desajustes no sistema de manejo adotado, no substrato utilizado, entre outros, podem ter levado a este comportamento, indicando a necessidade de novos estudos nesta linha de conhecimento.

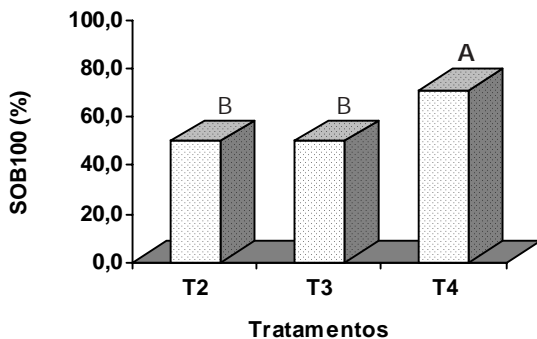


Figura 4. Sobrevivência das mudas aos 100 dias de idade (SOB100), em pleno sol. Médias seguidas de uma mesma letra entre os diferentes tratamentos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quando se analisam os valores de altura e diâmetro do coleto das mudas aos 100 dias de idade (Figura 5 A e B), observam-se valores que estão dentro de relações consideradas adequadas em termos de qualidade de mudas, considerando-se a altura dos tubetes utilizados (12 cm), resultando em valores ao redor de 1:1 na relação raiz / parte aérea.

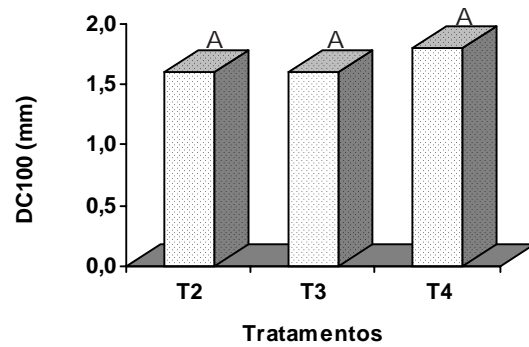
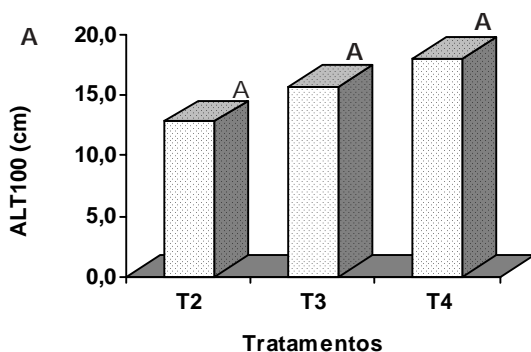


Figura 5. Altura média das mudas (ALT100 - A) e diâmetro do coleto médio aos 100 dias de idade das mudas (DC100 - B). Médias seguidas de uma mesma letra entre os diferentes tratamentos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

Em razão dos objetivos inicialmente propostos e nas condições com que o experimento foi desenvolvido, conclui-se que:

- a técnica de micropropagação de *Grevillea robusta* é viável para multiplicação de explantes oriundos de mudas produzidas por sementes;
- o alongamento dos explantes oriundos de subcultivos *in vitro* é possível sem a presença de giberelinas nas concentrações e tipo testado;
- o enraizamento em condições *ex vitro* é uma alternativa interessante para a formação de mudas de *Grevillea robusta* com um bom sistema radicular;
- estudos buscando definir protocolos para multiplicação de materiais adultos são imprescindíveis para programas de melhoramento genético da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BONGA, J. M., VON ADERKAS, P. *In vitro culture of trees*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236 p.
- CARVALHO, P.E.R. Espécies introduzidas alternativas às do Gêneros *Pinus* e *Eucalyptus* para reflorestamento no centro-sul do Brasil. In: GALVÃO APM. (Coord.). *Espécies não tradicionais para plantios com finalidades produtivas e ambientais*. Colombo: Embrapa Florestas, 1998, p. 75-99.

CORREIA, D. **Otimização da fase de multiplicação de gemas *in vitro* de *Eucalyptus* spp.** Mestrado – ESALQ/USP. Piracicaba, 1922, p. 109.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIND, C.; VAN WYK, G. ***Eucalypt* domestication and breeding.** Oxford: Clarendon Press, 1994, p. 228-246.

FERREIRA, C. A.; MARTINS, E.G. O potencial da grevillea (*Grevillea robusta*) Cunn para reflorestamento. In: GALVÃO, APM. (Coord.) **Espécies não tradicionais para plantios com finalidades produtivas e ambientais.** Colombo: Embrapa Florestas, 1998, p.6.

GOMES, A. L. **Propagação clonal: Princípios e particularidades.** Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1987, p. 69. (Série Didática, Ciências Aplicadas, 1).

GUIMARÃES, M. P., CORREIA, F., COUCEL, F. Integração de um laboratório de micropropagação de *Eucalyptus globulus* no viveiro de uma empresa do sector papeleiro português. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, 1997. v. 4, p. 79.

HARWOOD, C.E. ***Grevillea robusta* na annotated bibliography.** Canebra: Internacional Council for Research in Agroforestry, 1989.

HARWOOD, C. E. Natural distribution and ecology of *Grevillea robusta* Cunn. In: HARWOOD, C.E. ***Grevillea robusta* in agroforestry and forestry.** Naerobi: ICRAF, 1992, p.10.

MARTINS, E. G. **Seleção genética e características fisiológicas e nutricionais de procedências de *Grevillea robusta* (Cunn.) estabelecidas no Estado do Paraná.** Curitiba, 2000. Tese (Pós-graduação). Universidade Federal do Paraná.

MCCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIES, T. D., HAISSIG, B. E., SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings.** Portland: Dioscorides Press, 1987. p. 289 - 302. (Advances in Plant Sciences Series, 2).

RATNIEKS, E., ASSIS, T. F. O que há adiante da árvore? **O papel**, v. 54, n. 1, p. 41-48, 1993.

SHIMIZU, J.Y. Espécies não tradicionais para plantios com finalidades produtivas e ambientais silvicultura e usos. In: GALVÃO APM. (Coord.) **Espécies não tradicionais para plantios com finalidades produtivas e ambientais.** Colombo: Embrapa Florestas, 1998, p. 63-71.

XAVIER, A., COMÉRIO, J., IANNELLI, C. M. Eficiência da microestaquia e da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* spp. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, 1997. v. 4, p. 40-45.

XAVIER, A., COMÉRIO, J. Enraizamento *ex vitro* de gemas de *Eucalyptus* spp. Multiplicadas e alongadas *in vitro*. **Scientia Forestales**, 1997. n. 51, p 29 – 36.

Comunicado Técnico, 112

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: **Embrapa Florestas**

Endereço: Estrada da Ribeira km 111 - CP 319

Fone: (0**) 41 666-1313

Fax: (0**) 666-1276

E-mail: sac@cnpf.embrapa.br

Para reclamações e sugestões *Fale com o*

Ouvidor: www.embrapa.br/ouvidoria

1ª edição

1ª impressão (2004): conforme demanda



Comitê de publicações

Presidente: Luciano Javier Montoya Vilcahuaman

Secretária-Executiva: Cleide da S.N.F.de Oliveira

Membros: Antonio Maciel Botelho Machado / Edilson

Batista de Oliveira / Jarbas Yukio Shimizu / José

Alfredo Sturion / Patricia Póvoa de Mattos / Susete

do Rocio Chiarello Penteado

Supervisor editorial: Luciano J. Montoya Vilcahuaman

Revisão gramatical: Ralph D. M. de Souza

Normalização bibliográfica: Elizabeth Câmara

Trevisan / Lidia Woronkoff

Editoração eletrônica: Cleide Fernandes de Oliveira

Expediente