

009

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES RELAÇÕES DE REGULADORES DE CRESCIMENTO NO ALONGAMENTO *IN VITRO* DE MICROESTACAS DE *Grevillea robusta* (Cunn.)¹

Danielle Cristine dos Santos²
Ivar Wendling³
Fernando Grossi⁴

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de explantes de *Grevillea robusta* oriundos de 30 subcultivos *in vitro* em meio JADS 89 modificado 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 - 0,05 mg L⁻¹ de BAP + 0,1 mg L⁻¹ ANA. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Vegetal, da Embrapa Florestas, Colombo-PR. De forma geral, observou-se a viabilidade da técnica de micropropagação de *Grevillea robusta* para multiplicação e alongamento de 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 grevéia, como é conhecida simplesmente 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, devido 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).

A produção de mudas de grevéia é relativamente fácil, principalmente por via sexuada. A propagação vegetativas, via enxertia ou estaquia, partindo de ramos novos de plantas jovens ou de mudas novas provenientes de sementes, também é um método bastante utilizado (HARWOOD, 1992; HARWOOD, 1989).

O método de micropropagação é uma técnica de reprodução de plantas a partir de órgãos diferenciados, podendo ser: gemas, embriões ou hipocótilos (ELDRIDGE et. al., 1994), partes de órgãos ou simples células (GOMES, 1987), em cultura estéril (ELDRIDGE et. al., 1994) e *in vitro* (McCOWN, 1987). Na fase de multiplicação o objetivo é produzir o maior número de explantes possíveis em menor tempo (com alta taxa de multiplicação, rápido crescimento e alto vigor), sem muita variação de explante para explante. A fase de alongamento consiste na colocação dos explantes no meio de alongamento, objetivando a obtenção de material mais apto a fase posterior de enraizamento.

¹Trabalho desenvolvido na *Embrapa Florestas*

²Aluna do Curso Técnico em Química Industrial, CEFET/PR

³Pesquisador da *Embrapa Florestas* ivar@cnpf.embrapa.br

⁴Professor da Universidade Federal do Paraná

Em termos de *Grevillea robusta*, não se tem registros de trabalhos de micropropagação. Em função da atual total ausência de trabalhos de pesquisa com micropropagação de *Grevillea*, o presente estudo objetivou avaliar o comportamento de explantes de *Grevillea robusta* oriundos de 30 subcultivos *in vitro* em meio JADS 89 modificado, 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 - 0,05 mg L⁻¹ de BAP + 0,1 mg L⁻¹ ANA. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Vegetal, da Embrapa Florestas, Colombo-PR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o presente estudo, durante a fase de multiplicação, foram utilizados tufo (brotações originadas de um explante introduzido no meio de cultura) de *Grevillea robusta* oriundo de mudas produzidas por semente, submetidos a 30 subcultivos *in vitro* em meio JADS 89 modificado, a intervalos de 30 dias, tendo por finalidade obter o rejuvenescimento. Após a fase de multiplicação, os explantes foram transferidos para meio de alongamento constituído de meio JADS, 89 (modificado), acrescido de 2,5% sacarose, 0,7% de ágar e a pH 5,8.

Foram utilizados quatro tratamentos, com seis repetições e cinco explantes de 1 a 3 cm, alongados em meio de cultura composto pelos sais básicos e vitaminas do meio JADS 89 (CORREIA, 1992) modificado, conforme quadro abaixo:

Quadro 1 – Sais e vitaminas utilizadas para o preparo do meio de cultura para o alongamento de explantes de *Grevillea robusta*.

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

Os tratamentos testados foram diferentes tipos de regulador de crescimento, bem como, diferentes relações entre estes, conforme descrito a seguir:

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).

T4→ 0,05 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) + 0,1 mg L⁻¹ de ANA (Ácido Indol Acético).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Pelas características analisadas neste experimento, foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas para a taxa de multiplicação (número de tufos) e para alongamento dos explantes produzidos.

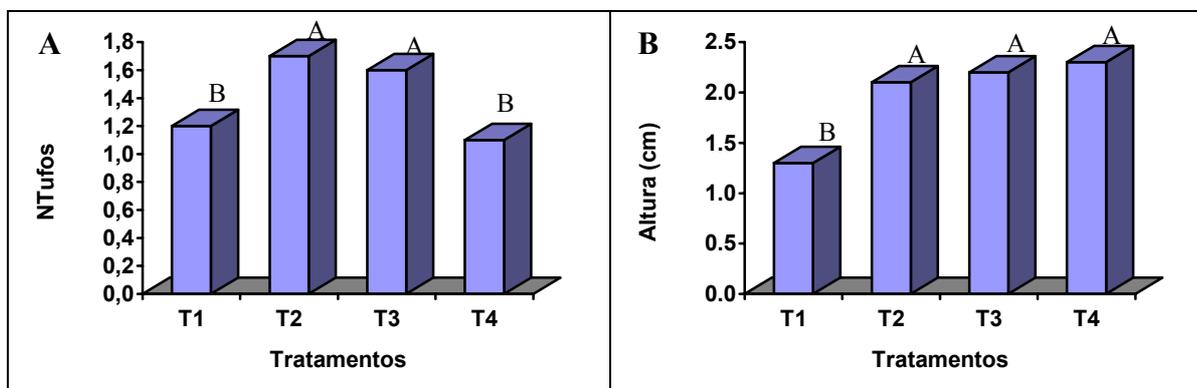


Figura 1 – Número de tufos produzidos (NTufos) para cada tufo introduzido originalmente *in vitro* (A) e altura média dos tufos produzidos (B). Médias seguidas de uma mesma letra entre os diferentes tratamentos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com a Figura 1 (A) o número de tufos produzidos foi superior nos tratamentos T2 e T3 (1,7 e 1,6, respectivamente), em relação aos tratamentos T1 e T4 (1,2 e 1,1 respectivamente).

As menores taxas de multiplicação obtidas nos tratamentos T1 e T4 ocorreram, provavelmente, devido à ausência total de BAP em T1 e devido a sua baixa concentração em T4. Outra possível explicação para esta resposta está no fato de que os tratamentos T1 e T4 não continham as auxinas AIA e AIB, sugerindo um efeito significativo destas no meio de alongamento.

Ao contrário do que se esperava, o tratamento T1 proporcionou menor alongamento dos explantes em relação aos demais tratamentos. Tal resultado, sugere um provável efeito tóxico do GA3 na concentração utilizada em T1, já que este tratamento apresentou uma elevada taxa de explantes mortos (Figura 2 B) enquanto os demais tratamentos não diferiram entre si quanto a esta característica.

De maneira geral, pôde-se observar que a *Grevillea robusta* se mostrou responsiva aos meios de alongamento, uma vez que microestacas obtidas se mostraram com bom padrão de tamanho para o posterior enraizamento, tanto *in vitro*, quanto *ex vitro*, quando comparado com *Eucalyptus* (XAVIER e COMÉRIO, 1997).

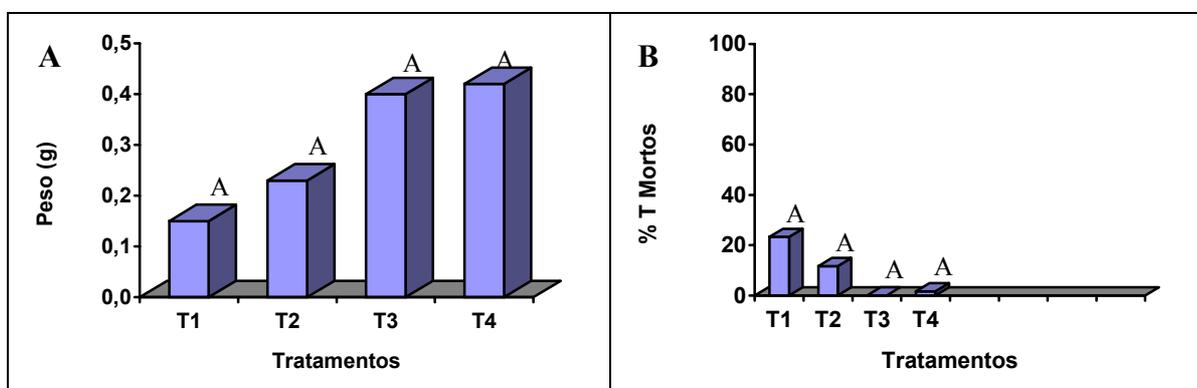


Figura 2 – Peso médio por tufo produzido (A) e percentagem média de tufos mortos (B). Médias seguidas de uma mesma letra entre os diferentes tratamentos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A produção de matéria verde (peso) variou de 0,2 a 0,4g porém não foi afetada pelos diferentes tratamentos de balanços hormonais utilizados neste experimento, como mostra a Figura 2 (A). 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, devido ao estímulo no metabolismo do nitrogênio. Contudo, as baixas concentrações utilizadas neste experimento não devem ter sido suficientes para que este efeito se manifestasse.

Em relação a mortalidade dos explantes, não se observaram diferenças significativas e, de modo geral (Figura 2 B), a mortalidade foi baixa (de 0 a 23,3 %).

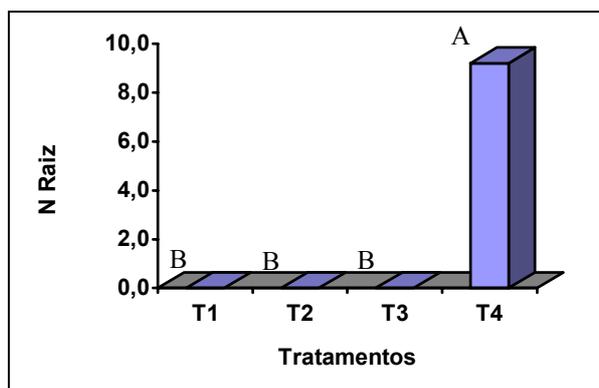


Figura 3 – Número de raízes produzidas (N Raiz) por tufo introduzido *in vitro*. Médias seguidas de uma mesma letra entre os diferentes tratamentos não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com relação à indução de raízes proporcionada apenas pelo tratamento T4, esta deve ter ocorrido em função da presença de auxina no meio de cultura, em relação ao tratamento T1, devido à fonte de auxina, em relação ao tratamento T2 e de uma combinação dos efeitos da fonte e da relação auxina/citocinina, em relação ao tratamento T3.

Embora o tratamento T2 apresente uma relação auxina/citocinina bem mais elevada que o tratamento T4, o AIA é um componente termodegradável que sofre degradação durante o processo de autoclavagem, perdendo assim grande parte de seu efeito fitorregulador. E, embora o AIB utilizado no tratamento T3 seja termoestável, a relação auxina/citocinina neste tratamento representa metade daquela utilizada no tratamento T4.

CONCLUSÃO

Em função dos objetivos inicialmente propostos e nas condições com que o experimento foi desenvolvido, os resultados encontrados para as características de número de tufos, altura média, peso médio, percentagem de tufos mortos e número de raízes, a transferência de explantes multiplicados *in vitro* de *Grevillea robusta* para alongamento, demonstrou a viabilidade da técnica de micropropagação de *Grevillea robusta* para multiplicação de explantes oriundos de mudas produzidas por sementes, bem como, a possibilidade de alongamento de explantes para futuro enraizamento *in vitro* e, ou *ex vitro*. Conclui-se também que estudos evidenciando o enraizamento *in vitro* e *ex vitro* são de fundamental importância para o aproveitamento máximo da técnica de micropropagação em *Grevillea robusta*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, 1992, 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.
- HARWOOD, C.E. *Grevillea robusta* na annotated bibliography. Canebra: Internacional Council for Research in Agroforestry, 1989.
- HARWOOD, C.E. Natural distribuion and ecology of *Grevillea robusta* Cunn. In: HARWOOD, C.E. *Grevillea robusta* in agroforetry 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).
- 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. Enraizamento *ex vitro* de gemas de Eucalyptus spp. Multiplicadas e alongadas *in vitro*. Scientia Forestales, 1997. n. 51, p 29 – 36.