

## EFEITO DO GENÓTIPO SOBRE O POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE GEMAS E RAÍZES ADVENTÍCIAS EM *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden *IN VITRO*

Rita de Cassia Sobrosa<sup>1</sup>  
Maisa Pimentel Martins Corder<sup>2</sup>

### RESUMO

A resposta de explantes em um sistema de cultura de tecidos depende do genótipo do material em cultura. Estudou-se a variação genética entre e dentro de famílias de polinização aberta de uma população de *Eucalyptus grandis*, aos 27 anos de idade, para proliferação de gemas e produção de raízes adventícias *in vitro*. O teste foi em blocos ao acaso, com sete tratamentos (progênies), em cinco repetições e oito explantes por parcela. As progênies apresentaram diferenças significativas quanto à formação de gemas e de raízes. Variações genéticas ocorreram entre progênies com elevada amplitude de gemas formadas. Amplas variações genéticas dentro de progênies também ocorreram para a capacidade de produção de gemas. Os efeitos do genótipo e do ambiente foram significativos na formação de gemas e de raízes. Através da seleção de famílias a produção de gemas e de raízes adventícias pode ser aumentada para otimizar a multiplicação *in vitro* dessa espécie.

**Palavras-chaves:** micropropagação, variação genética, enraizamento *in vitro*

### ABSTRACT

## EFFECT OF THE GENOTYPE ON THE POTENTIAL FOR THE PRODUCTION OF SHOOTS AND ADVENTITIOUS ROOTS IN *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden *IN VITRO*

The response of explants in a system of tissue culture is dependent on the genotype of the material in culture. The genetic variation among and within open pollination families of a 27 years old population of *Eucalyptus grandis*, for proliferation of shoots and production of root *in vitro* was studied. The test was carried out in randomized blocks, with seven treatments (progenies), with five replications and eight explants for pots. Progenies showed highly significant differences in relation to the formation of shoots and roots. Genetic variations occurred among progenies with high variation of shoots formed. Wide genetic variations within progenies also occurred for the capacity of production of shoots. The effects of the genotype and of the environment were significant in the formation of shoots and roots. Through selection of families, the production of shoots and of adventitious roots can be increased to optimize the multiplication *in vitro* that specie.

**Key words:** micropropagation, genetic variation, *in vitro* rooting

<sup>1</sup> Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO-Florestas – Centro de Pesquisa de Recursos Florestais, Distrito de Boca do Monte, RS 830, Km 4,5, Santa Maria (RS), CEP: 97001-970, Caixa Postal 346, e-mail: rita-sobrosa@bol.com.br.

<sup>2</sup> Laboratório de Biotecnologia Florestal, Departamento de Ciências Florestais, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria (RS), CEP: 97105-900, e-mail: lbfmaisa@smail.ufsm.br

Recebido para publicação em 2002

## INTRODUÇÃO

Estudos conduzidos com espécies florestais mostraram que os genótipos influenciam significativamente a produção de gemas em cultivo *in vitro* em coníferas (Von Arnold & Eriksson, 1981; Ahuja, 1983; Bergmann & Stomp, 1992; Bergmann & Stomp, 1994 e Handley & Bacwar, 1995).

Considerando o longo ciclo de melhoramento genético das espécies florestais, a manipulação genética é uma alternativa quando visa aumentar as taxas de crescimento, melhorar a capacidade de enraizamento, a qualidade dos produtos ou promover resistência à doenças (Bandyopadhyay et al., 1999).

A otimização da produção de gemas adventícias pode ser feita através da manipulação do meio, do ambiente, do *background* genético ou do estágio de desenvolvimento. Os efeitos do genótipo e do ambiente podem afetar significativamente a formação de gemas. Experimentos para testar vários agentes gelantes (Macrae & Staden, 1990), resposta a diferentes concentrações de sacarose (Cheng et al., 1992), e a diferentes concentrações de reguladores de crescimento (Das & Mitra, 1990; Le Roux & Van Staden, 1991; Silva & Teixeira, 1995; Xavier et al., 1997; Yasodha et al., 1997; Mokotedi et al., 2000; Sharma & Ramamurthy, 2000) e também a regeneração de plantas através da organogênese (Cid et al., 1999; Hervé et al., 2001) têm também sido realizados com várias espécies de *Eucalyptus*.

O sistema de cultura de tecidos oferece muitas oportunidades para a propagação massal e desenvolvimento de clones superiores de árvores. A principal vantagem comercial dos sistemas de cultura de tecidos para as árvores é o seu potencial para produzir centenas de cópias de genótipos superiores. Esta técnica pode ser aplicada para os plantios de espécies florestais através de indivíduos superiores identificados em programas de melhoramento que fossem propagados vegetativamente.

A propagação clonal através dos sistemas de cultura de tecidos deveria estar integrada dentro de um programa de melhoramento genético para identificar, testar e selecionar aqueles indivíduos

que apresentam as melhores características genéticas. A micropropagação que foi uma vez limitada pelas respostas específicas de genótipos em cultura, está mostrando ser promissora para o desenvolvimento clonal através da produção de gemas e estacas enraizadas (Handley & Bacwar, 1995).

A resposta de explantes em um sistema de cultura de tecidos depende do genótipo do material colocado em cultura. Na multiplicação *in vitro*, esforços vêm sendo feitos visando regenerar espécies de importância econômica.

A base do melhoramento florestal é a seleção que atua sobre a variação entre indivíduos. Muitas características de espécies florestais apresentam variação entre e dentro de famílias. A seleção só será eficiente no melhoramento dessas características se houver variação na constituição genética dos indivíduos e que esta seja do tipo aditivo (Sampaio et al., 2000; Lins et al., 2001; Sampaio et al., 2002). Vários autores têm estudado o efeito do genótipo para diferentes características em espécies de *eucalyptus*, sendo possível detectar variação genética entre e dentro de procedências e famílias (Marcar et al., 2002).

A vantagem de um programa de desenvolvimento clonal é que utiliza tanto as porções dominantes como aditivas da variação genética e conseqüentemente, aumenta o ganho genético potencial, especialmente para as características com alta variância dominante. O método para seleção e desenvolvimento de clones não deveria restringir a capacidade de produzir em massa os melhores genótipos disponíveis. Desde que a resposta da planta em sistemas de cultura de tecidos depende do genótipo, os cuidados deveriam ser tomados para que os genótipos valiosos não sejam eliminados através do processo de cultura.

No presente estudo, analisou-se a variação genética entre e dentro de famílias de polinização aberta de uma população de *E. grandis*, aos 27 anos de idade, para proliferação de gemas e enraizamento adventício em cultivo *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes provenientes de sete famílias de polinização aberta de *Eucalyptus grandis*, as quais foram procedentes de árvores matrizes selecionadas para características de crescimento e forma do fuste, aos 27 anos de idade, na Empresa Flosul Indústria e Comércio de Madeiras Ltda., localizada em Palmares do Sul, Rio Grande do Sul.

As sementes foram submetidas a desinfestação superficial, através da imersão em álcool 70% por 40 segundos, em solução de Hipoclorito de sódio (NaOCl) a 1% (v/v) por 15 minutos. Posteriormente, as sementes foram lavadas por quatro vezes em água bidestilada esterilizada. Após a secagem em temperatura ambiente, as sementes foram semeadas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962). Os explantes foram obtidos da semeadura *in vitro* em meio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado, contendo 0,2 mg/l<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 0,0024mg/l<sup>-1</sup> de pantotenato de cálcio, 0,0018 mg/l<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 2% (p/v) de sacarose e solidificado com 0,6% (p/v) de ágar (Difco Bacto-Sigma), sem adição de reguladores de crescimento.

Os explantes foram transferidos para o meio de multiplicação medindo um centímetro de comprimento, com dois pares de folhas. O meio de cultura utilizado foi MS suplementado com 0,2 mg/l<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 0,0024mg/l<sup>-1</sup> de pantotenato de cálcio, 0,0018 mg/l<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 0,01 mg/l<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético), 0,08 mg/l<sup>-1</sup> de BAP (Benzilaminopurina), 2% (p/v) de sacarose e solidificado com ágar (Difco Bacto-Sigma) a 0,6%.

Foram realizados três subcultivos, que consistiram nas subdivisões dos tufo das brotações, a cada 30 dias. As gemas foram escolhidas no último subcultivo para serem transferidas para o meio de enraizamento. O meio de cultura foi MS contendo macronutrientes do meio de KNOP (1865), 0,5 mg/l<sup>-1</sup> de AIB (ácido indolbutírico), 2% (p/v) de sacarose e solidificado com ágar (Difco Bacto-Sigma) a 0,6%. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8.

As culturas foram mantidas em sala de incubação com fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa média de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de 25  $\pm$  3°C. Em todas as fases de cultivo foram utilizados frascos medindo 16 cm de

diâmetro x 8 cm de altura, contendo 30 ml de meio de cultura em cada frasco.

Na fase de multiplicação fêz-se a contagem do número de gemas formadas para cada uma das progênies nos três subcultivos, durante 90 dias. Na fase de enraizamento, analisou-se o número de raízes adventícias e de calos formados em cada uma das progênies, aos 10 e aos 20 dias.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso. Foram utilizados sete tratamentos, em cinco repetições e oito explantes por parcela. Os tratamentos compreenderam as sete diferentes progênies. As variáveis analisadas foram o número de gemas, a porcentagem de raízes e a porcentagem de calos formados em cada progênie. As médias foram comparadas através do teste de Tukey em nível de 1% de probabilidade. Para o teste de significância relativo a variação dentro de progênie os valores do número de gemas formadas em cada explante de cada progênie no subcultivo III foram lançados no programa estatístico Estat (Sistema para Análises Estatísticas) como blocos com o objetivo de detectar na análise da variância se ocorreriam diferenças significativas dentro de cada progênie.

Os dados referentes à variável número de gemas foram transformados em  $\bar{O}_x$ , e os valores expressos em porcentagem foram transformados pela fórmula  $\text{arc. sen. } \bar{O}_x / 100$  antes da análise da variância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Efeito do genótipo na produção de gemas

Os resultados da análise da variância mostraram diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre as progênies analisadas em relação à produção de gemas, nos três subcultivos (Tabela 1). Foi possível verificar que o comportamento de cada progênie em relação à capacidade de formação de gemas foi similar nos três subcultivos. As progênies com maiores taxas de multiplicação foram as progênies P3, P6 e P10. Observou-se também, em todas as progênies, que as maiores taxas de multiplicação foram obtidas no terceiro subcultivo.

**Tabela 1.** Número médio de gemas formadas mediante cultivo *in vitro*, em meio de multiplicação MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado em diferentes progênie de *Eucalyptus grandis*, em três subcultivos.

**Table 1.** Mean number of shoots formed by cultivate *in vitro*, in medium of multiplication MS (Murashige & Skoog, 1962) modified in different progenies of *Eucalyptus grandis*, in three subcultivate.

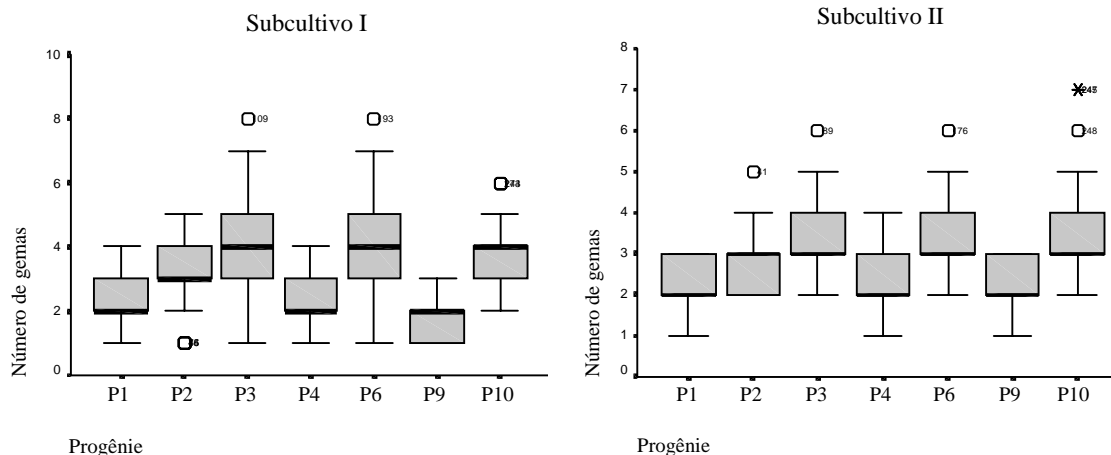
Progênie	Taxa de Multiplicação		Totais	
	Subcultivo I	Progênie	Subcultivo II	Progênie
<b>P3</b>	5,8 a	<b>P10</b>	5,2 a	<b>P10</b>
<b>P6</b>	5,8 a	<b>P3</b>	5,2 a	<b>P6</b>
<b>P10</b>	5,5 a b	<b>P6</b>	5,2 a	<b>P3</b>
<b>P2</b>	5,0 b	<b>P2</b>	4,8 a b	<b>P2</b>
<b>P1</b>	4,4 c	<b>P4</b>	4,4 b c	<b>P4</b>
<b>P4</b>	4,2 c	<b>P9</b>	4,1 c	<b>P1</b>
<b>P9</b>	3,9 c	<b>P1</b>	4,1 c	<b>P9</b>
<b>C.V.(%)</b>	5,8	<b>C.V.(%)</b>	5,2	<b>C.V.(%)</b>
<b>DMS</b>	0,58	<b>DMS</b>	0,49	<b>DMS</b>

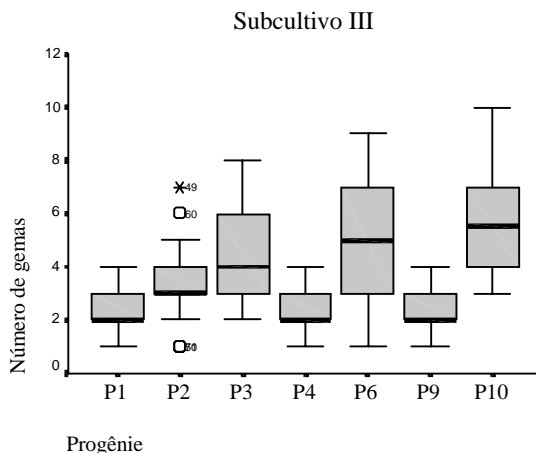
C.V.(%): Coeficiente de variação experimental; médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1%; DMS: diferença mínima significativa.

A área hachurada nos gráficos representa a quantidade e freqüência de explantes que apresentaram o número de gemas nesse intervalo em cada progênie, e as extremidades inferior e superior de cada barra indicam o número de gemas produzidas mínimo e máximo observados em cada progênie. Os números observados acima das barras correspondem ao número que o explante ocupou na planilha do programa estatístico da análise dos dados. Por exemplo, observou-se que no subcultivo I a progênie P6 apresentou um único explante com oito gemas formadas (o qual ocupou o número 193

na planilha dos dados). Esses valores aparecem isolados porque representam explantes que apresentaram um número de gemas formadas acima e abaixo do intervalo observado (Figura 1).

As progênie P3, P6 e P10, com maior capacidade de formação de gemas, apresentaram também uma maior taxa de multiplicação aos 90 dias (Subcultivo III). As progênie P1, P4 e P9, que apresentaram as menores taxas de multiplicação, aos 30 dias (subcultivo I), mantiveram os mesmos índices de formação de gemas nos subcultivos consecutivos (Figura 1).





**Figura 1.** Amplitude do número total de gemas formadas em cada progênie de *Eucalyptus grandis*, em meio de multiplicação MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado, em que a área hachurada representa a quantidade e freqüência de explantes que apresentaram o número de gemas formadas dentro deste intervalo.

**Figure 1.** Ampleness of the total number of shoots formed in each progeny of *Eucalyptus grandis*, in medium of multiplication MS (Murashige & Skoog, 1962) modified, in that the hachured area represent the amount and explants frequency that presented the number of shoots formed inside of this interval.

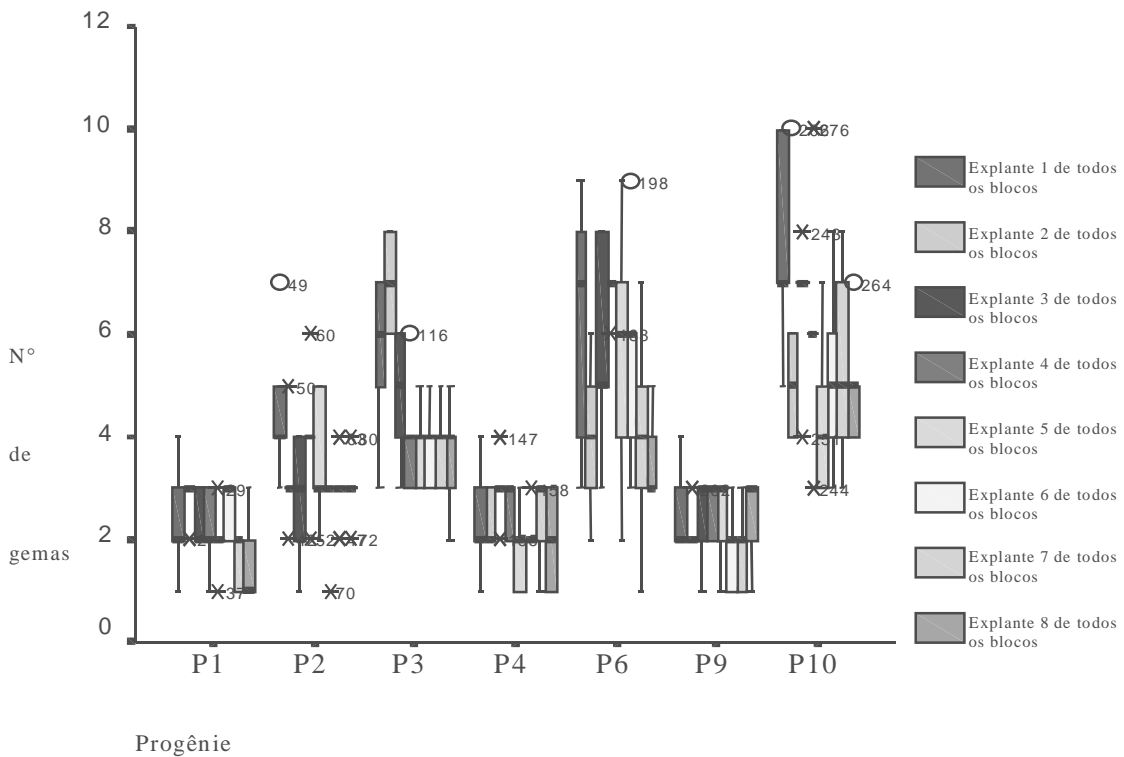
Isso indicou que subsequentes subcultivos promoveram maiores taxas de multiplicação nas progênies com maior potencial genético para essa característica. Grewal *et al.* (1980) verificaram que a produção de gemas múltiplas de *E. citriodora* (3-10 gemas por explante) ocorreu somente após o quinto subcultivo. Kapoor & Chauhan (1990) obtiveram na micropropagação de *E. torrelliana* x *E. citriodora*, aumentos na taxa de multiplicação de 20 para 25 gemas por cultura, após a sexto subcultivo. Jambhale & Patil (1996) também verificaram aumento na formação de gemas na micropropagação de árvores elite de *Eucalyptus tereticornis*, em vários subcultivos. A figura 1 apresentou também a amplitude do número de gemas formadas em cada progênie. Foi possível verificar, por exemplo, que no primeiro subcultivo a progênie P1 produziu de 1 a 4 gemas e a progênie P10 produziu de 2 a 5 gemas; no terceiro subcultivo a progênie P1 apresentou de 1 a 4 gemas, enquanto a progênie P10 apresentou 3 a 10 gemas.

Esses resultados mostraram variações genéticas entre as progênies em relação à capacidade de formação de gemas, destacando

diferenças no potencial genético do material em relação à característica. Quanto aos valores totais de gemas formadas nos três subcultivos, constatou-se que essas variações foram detectadas através de uma extensa amplitude: 254 a 525 gemas formadas (Tabela 1).

A posição classificatória das progênies nos três subcultivos foi P10; P6; P3; P2; P4; P1 e P9, em que as três primeiras progênies não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, entre si.

Também, houve amplas variações no número de gemas formadas por explante dentro de progênies. Através da média de todos os blocos de cada explante das parcelas de cada progênie observou-se variação no número de gemas dentro de cada progênie. A maior amplitude foi observada na progênie P6, que apresentou de 1 a 9 gemas no subcultivo III (Figura 2), porém, essas diferenças não foram significativas ( $P < 0,01$ ) em nenhum dos 3 subcultivos. Foi observado, portanto, que a variação genética em relação à formação de gemas foi maior entre progênies do que dentro de progênies.



**Figura 2.** Amplitude do número médio de gemas formadas em cada explante dentro de cada progênie de *Eucalyptus grandis*, aos 90 dias, em meio de multiplicação MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado, nas cinco repetições, em que a área hachurada representa a quantidade e freqüência de explantes que apresentaram o número de gemas formadas dentro deste intervalo.

**Figure 2.** Ampleness of the mean number of shoots formed in each explant within each progeny of *Eucalyptus grandis*, to the 90 days, in medium of multiplication MS (Murashige & Skoog, 1962) modified, in the five repetitions, in that the hachured area represent the amount and explants frequency that presented the number of shoots formed inside of this interval.

O uso da micropropagação nos programas de melhoramento florestal tem possibilitado ganhos adicionais em menor período de tempo (Fantini Júnior & Graça, 1990). A superioridade genética de uma espécie, para uma determinada característica, pode ser revelada quando essa espécie é cultivada em diferentes meios nutritivos com diferentes combinações de reguladores de crescimento.

No presente estudo, verificou-se que o uso de ANA a 0,01 mg/l<sup>-1</sup> e BAP a 0,08 mg/l<sup>-1</sup> foi eficiente para promover uma taxa de multiplicação satisfatória.

Vários autores têm testado diferentes concentrações de citocininas e auxinas para

maximizar a micropropagação de espécies de *Eucalyptus*. Fantini Júnior & Graça (1990) verificaram que a multiplicação de gemas de *E. saligna* foi maior quando foi utilizado BAP a 0,1 mg/l<sup>-1</sup>. Quando a concentração de BAP aumentou de 0,1 para 1,0 mg/l<sup>-1</sup>, o desenvolvimento de gemas foi diminuído. Os autores também verificaram que o desenvolvimento de gemas, a partir de segmentos nodais obtidos de estacas enraizadas provenientes de árvores matrizes, variou com o genótipo. Dentre 11 árvores matrizes de

*E. saligna* testadas, 55% apresentaram de 50 a 84% de gemas induzidas em todos os tratamentos, enquanto que o restante variou desde 19 até 42%.

Lubrano (1991) obteve uma taxa de multiplicação de gemas de *E. grandis* satisfatória, em que os explantes usados foram provenientes de sementes. Esse autor também verificou variação na produção de gemas entre os explantes, o que evidenciou a variação genética desse material em relação à capacidade de multiplicação. Silva & Teixeira (1995) observaram diferenças altamente significativas nas taxas de multiplicação de diferentes procedências de *Eucalyptus* sp. quando submetidas a diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA) e de 2-isopenteniladenina (2 ip). Outros estudos também foram desenvolvidos testando diferentes combinações de reguladores de crescimento para melhorar a resposta do cultivo *in vitro* de *Eucalyptus* sp. (Sankara Rao & Venkateswara, 1985; Kapoor & Chauhan, 1990; Pinedo et al., 1990; Le Roux & Van Staden, 1991; Niccol et al., 1994; Yasodha et al., 1997; Souza et al., 1999; Bandyopadhyay et al., 1999; Hervé et al., 2001).

### Efeito do genótipo na formação de raízes adventícias

Os resultados da análise da variância mostraram diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) entre as progênies analisadas em relação à formação de raízes adventícias, aos 10 e aos 20 dias de cultivo (Tabela 2). Verificou-se que a progênie P10 apresentou maior porcentagem de enraizamento aos 10 (47%) e aos 20 dias de cultivo (81%). A progênie P9 apresentou a menor porcentagem de enraizamento aos 10 (24%) e aos 20 dias de cultivo (49%) Os resultados demonstraram que as progênies P3, P6 e P10, com as maiores taxas de multiplicação, também apresentaram maior porcentagem de enraizamento, evidenciado a superioridade genética dessas progênies quanto à capacidade de formação de gemas e enraizamento. As progênies P2, P4 e P9, com as menores taxas de multiplicação, também apresentaram menor porcentagem de enraizamento (Tabela 2).

**Tabela 2.** Análise da capacidade de enraizamento e formação de calos, aos 10 e aos 20 dias de cultivo, em gemas alongadas de progênies de *Eucalyptus grandis*.

**Table 2.** Analysis of the capacity rooting and formation of callus, to the 10 and to the 20 days of cultivation, in prolonged shoots of progenies of *Eucalyptus grandis*.

Progênie	Enraizamento aos 10 dias (%)	Progênie	Formação calos aos 10 dias (%)	Progênie	Enraizamento aos 20 dias (%)	Progênie	Formação calos aos 20 dias (%)
<b>P10</b>	47 a	<b>P1</b>	23 a	<b>P10</b>	81 a	<b>P9</b>	41 a
<b>P3</b>	45 a	<b>P4</b>	23 a	<b>P6</b>	72 a b	<b>P4</b>	38 a
<b>P6</b>	38 a b	<b>P2</b>	19 a	<b>P1</b>	60 b c	<b>P2</b>	37 a
<b>P1</b>	36 a b	<b>P3</b>	13 a	<b>P3</b>	60 b c	<b>P1</b>	30 a b
<b>P4</b>	34 a b	<b>P6</b>	13 a	<b>P2</b>	53 c	<b>P3</b>	30 a b
<b>P2</b>	26 b	<b>P9</b>	12 a	<b>P4</b>	53 c	<b>P6</b>	19 b c
<b>P9</b>	24 b	<b>P10</b>	9,0 a	<b>P9</b>	49 c	<b>P10</b>	9,0 c
<b>C.V.(%)</b>	26	<b>C.V.(%)</b>	65	<b>C.V.(%)</b>	14	<b>C.V.(%)</b>	31
<b>DMS</b>	19	<b>DMS</b>	21	<b>DMS</b>	18	<b>DMS</b>	18

C.V.(%): Coeficiente de variação experimental; médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1%; DMS: diferença mínima significativa.

As progênies P1, P2, P3, P4 e P9, nas quais ocorreu maior formação de calos na base dos explantes, também apresentaram menores taxas de enraizamento, evidenciando que a formação de calos inibiu a formação de raízes (Tabela 2). Kapoor & Chauhan (1990) também observaram menores

taxas de enraizamento quando ocorreu maior formação de calos, na micropropagação de *E. torrelliana* x *E. citriodora*, em meio de cultura MS diluído à 50 e à 20%, contendo 1,0 mg/l<sup>-1</sup> de AIB.

A formação de calos aos 10 dias variou de explante para explante dentro de cada progênie,

também observou-se muitos valores nulos (zero) o que contribuiu para haver maior amplitude entre a porcentagem de calos formados nas gemas, justificando o alto coeficiente de variação (65%) para a porcentagem de calos formados aos 10 dias (Tabela 2).

Observou-se que aos 20 dias de cultivo, as progênies diferiram estatisticamente quanto à porcentagem de calos formados, verificando-se que as progênies P6 e P10, com menor formação de calos, apresentaram as maiores taxas de enraizamento (Tabela 2). A maior capacidade de formação de raízes adventícias foi observada nas progênies P1, P3, P6 e P10.

Altas concentrações de auxina no meio de enraizamento podem promover a formação de calos na base dos explantes, comprometendo a rizogênese e o crescimento da parte aérea (Grattapaglia & Machado, 1998). A resposta de explantes em um sistema de cultura de tecidos depende do genótipo do material colocado em cultura. Vários estudos têm mostrado que a resposta de um tecido a um determinado sistema de cultura de células é dependente do genótipo (Handley et al., 1995). No presente estudo, foi verificado que o uso de  $0,5\text{mg/l}^{-1}$  de AIB favoreceu o enraizamento das progênies com maior potencial genético para a formação de raízes adventícias, após 20 dias de cultivo. Pinedo et al. (1990) também obtiveram maiores porcentagens de gemas enraizadas de *E. citriodora* (87%) quando foi usado  $0,5\text{mg/l}^{-1}$  de AIB, após 21 dias de cultivo.

A utilização no meio de cultura de enraizamento de macronutrientes de Knop (1865) também favoreceu o enraizamento das progênies com maior capacidade de formação de raízes adventícias. Isso indicou que para essa fase, não é necessária uma alta concentração de sais no meio, pois o meio de KNOP é caracterizado pelo seu baixo teor em sais, enquanto que o meio MS apresenta altas concentrações iônicas. Fantini Júnior & Graça (1990) verificaram uma maior porcentagem de enraizamento de *E. saligna* em meio de KNOP acrescido de  $1,0\text{mg/l}^{-1}$  de AIB. Os autores obtiveram 59% de enraizamento com o meio de KNOP, contrastando com 11% obtido em meio MS contendo  $0,2\text{ mg/l}^{-1}$  de AIB. Lubrano (1991) também utilizou o meio de KNOP diluído a

50% no enraizamento de *E. grandis*, em que observou uma variação de 58 a 93% na porcentagem de enraizamento.

Verificaram-se diferenças altamente significativas entre as progênies quanto à capacidade de formação de raízes adventícias, em que foi observada uma variação de 49% (P9) a 81% (P10) após 20 dias de cultivo (Tabela 2).

## CONCLUSÕES

As diferenças entre progênies influenciaram significativamente a micropropagação de *E. grandis*. As progênies apresentaram diferenças significativas quanto à capacidade de formação de gemas e de raízes adventícias. Variações genéticas foram observadas entre progênies, com elevada amplitude de gemas formadas nos subcultivos.

As progênies apresentaram, na maioria, tendências semelhantes para a formação de gemas nos três subcultivos. Nos três subcultivos foram verificadas variações genéticas dentro de progênies para capacidade de produção de gemas.

A produção de gemas e raízes adventícias poderia ser melhorada através da seleção de progênies que apresentem superioridade genética em relação a essas características.

A otimização da produção de gemas adventícias pode ser feita através do *background* genético. Os efeitos do genótipo e do ambiente físico foram significativos na formação de gemas e de raízes. A produção de gemas e de raízes adventícias pode ser aumentada através da seleção de famílias visando capturar os benefícios da propagação clonal.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Empresa Flosul Indústria e Comércio de Madeiras Ltda., pela cessão do material genético, e à Engenheira Florestal Cristiane Raddatz pelo apoio técnico.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUJA, M. R. Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.1, n. 32, p. 131-135, 1983
- BANDYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSSEN, G. *et al.* Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species - *Eucalyptus nitens* and *Eucalyptus globulus*. **Plant Science**, Tamilnadu, v.15, n. 140, p.189-198, 1999.
- BANZATTO, D.A.; MALHEIROS, E.B.; KRONKA, S.N. *et al.* **Programa ESTAT (Sistema para Análises Estatísticas)** UNESP/FCAV, Jaboticabal/São Paulo, Departamento de Ciências Exatas, 1989.
- BERGMANN, B. A. & STOMP, A. M. Influence of taxonomic relatedness and medium composition on meristematic nodule and adventitious shoot formation in nine pine species. **Can Journal For. Res.**, Ottawa, v.30, n.22, p.750-755, 1992.
- BERGMANN, B. A. & STOMP, A. M. Effect of genotype on *in vitro* adventitious shoot formation in *Pinus radiata* and correlations between pairs of phenotypic traits during *in vitro* shoot development. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.1, n.39, p.185-194, 1994.
- CHENG, B.; PETERSON, C. M.; MITCHELL, R. J. The role of sucrose, auxin and explant source on *in vitro* rooting of seedling explants of *Eucalyptus sideroxylon*. **Plant Science**, Tamilnadu, v.87, n.5, p.207-214, 1992.
- CID, L. P. B.; MACHADO, A. C. M. G.; CARVALHEIRA, S. B. R. C. *et al.* Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.3, n.56, p.17-23, 1999.
- DAS, T. & MITRA, G. C. Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.1, n.3, p. 95-103, 1990.
- FANTINI JUNIOR, M. & GRAÇA, M. E. C. Propagação *in vitro* de *Eucalyptus saligna*. In: 6º CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 3, 1990, Campos do Jordão. **Anais...** São Paulo: Soc. Brasileira de Silvicultura, 1990, p. 373-378.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, Brasília, 1998, v.1, p.183-260.
- GREWAL, S.; AHUJA, A.; ATAL, C. K. *In vitro* proliferation of shoot apices of *Eucalyptus citriodora* Hook. **Indian Journal Exp. Biol.**, Osaka, v. 18, n.10, p.775-777, 1980.
- HANDLEY, L.W.; BECWAR, M.R. *et al.* Research and development of commercial tissue culture systems in loblolly pine. **Tappi Journal**, Atlanta, v.78, n.5, p. 169-175, 1995.
- HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M. *et al.* A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of elite *Eucalyptus gunni* clone: comparative histology. **Plant Science**, Tamilnadu, v.1, n.161, 2001.
- JAMBHALE, N. D. & PATIL, S. C. Micropropagation of elite *Eucalyptus* types through shoot tip culture. **Indian Forester**, Tamilnadu, v.32, n.1, p. 61-64, 1996.
- KAPOOR, M. L. & CHAUHAN, M. S. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*E. torelliana* F. V. Muell x *E. citriodora* Hook.) **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.46, n.6, p.143-147, 1992.
- KNOP, W. **Quantitative Untersuchungen über den Ernährungsprozess der Pflanzen**. Landwirtsch Vers. St. Poland, v.7, n.5, p.93-107, 1865.

- LE ROUX, J. J. & VAN STADEN, J. Micropropagation of *Eucalyptus* species. **Journal of Hort. Science**, Bangalore, v.26, n.5, p.199-200, 1991.
- LINS, V.S.; MORAES, M.L.T. de; SILVA, A.M. da. *et al.* Variações e ganhos genéticos em progênies de *Grevillea robusta* A. Cunn. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v.8, n.1, p. 180-186, 2001.
- LUBRANO, L. Micropropagation of *Eucalyptus grandis*. **Acta Horticulturae**, Genova, v.300, n.4, p.89-94, 1991.
- MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A. , McKEE, R.A. Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, 1994, 382p.
- MACRAE, S. & STADEN, J.V. *In vitro* culture of *Eucalyptus grandis*: effect of gelling agents on propagation. **Journal of Plant Physiology**, Dakar, v.137, n.8, p.249-251, 1990.
- MARCAR, N.E.; CRAWFORD, D.F.; SAUNDERS, A. *et al.* Genetic variation among and within provenances and families of *Eucalyptus grandis* W. Hill and *Eucalyptus globulus* Labill subspecie globulus seedlings in response to salinity and waterlogging. **Forest Ecology and Management**, Kingston, v.162, n.5, p.231-249, 2002.
- McCOMB, J.A. & BENNET, I.J. Eucalypts (*Eucalyptus* spp.) In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotecnology in Agriculture and Forestry**. Berlin: Springer-Verlag, 1985, v.1, p.340-362.
- MOKOTEDI, M.E.O.; WATT, M.P.; PAMMENTER, N.W.; BLAKEWAY, F.C. *In vitro* rooting and subsequent survival of two clones of a cold-tolerant *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus nitens* hybrid. **Hortscience**, Athelstone, v.35, n.6, p.1163-1165, 2000.
- MURASHIGE, J. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.1, p.473-497, 1962.
- NICCOL, R.J.; REGAN, P.A.; DE FILIPPIS, L.F. Simplified protocol for the micropropagation of selected *Eucalyptus* and *Banksia* species. **Australian Forestry**, Melbourne, v.57, n.4, p.143-147, 1994.
- PINEDO, D.N.H.; GRAÇA, M.E.C.; ARAÚJO, A.J. de. Micropropagação de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus tereticornis*. In: 6º CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 3, 1990, Campos do Jordão. **Anais...** São Paulo: Soc. Bras. de Silvicultura, 1990, p.361-372.
- SAMPAIO, P. de T.B.; RESENDE, M.D.V. de; ARAÚJO, A.J. de. Estimativa de parâmetros genéticos e métodos de seleção para o melhoramento genético de *Pinus caribaea* Var. *Hondurensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.11, p.2243-2253, 2000.
- SAMPAIO, P. de T.B.; RESENDE, M.D.V. de; ARAÚJO, A.J. Estimativa de parâmetros genéticos e métodos de seleção para o melhoramento genético de *Pinus oocarpa* Schiede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.5, p.625-636, 2002.
- SANKARA RAO, K. & VENKATESWARA, R. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Eucalyptus grandis* L. **Plant Science**, Tamilnadu, v.40, n.1, p.51-55, 1985.
- SHARMA, S.K. & RAMAMURTHY, U. Micropropagation of 4 years old elite *Eucalyptus tereticornis*. **Trees. Plant Cell Reports**, New Delhi, v. 19, n.5, p.511-518, 2000.
- SILVA, L.L. da. & TEIXEIRA, S.L. Multiplicação clonal *in vitro* de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, a partir de segmentos nodais e brotações epicórnicas. **Revista Ceres**, Viçosa, v.30, n.3, p.391-395, 1995.
- SOUZA, G.M.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA,

M. de. Water deficit in relation to leaf and stem anatomy of *Eucalytus camaldulensis* Dehn. shoots cultivated *in vitro*, **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.56, n.3, p.25-38, 1999.

VON ARNOLD, S.& ERIKSSON, T. *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. **Can J. Bot.** Ottawa, v.53, n. 59, p.870-874, 1981.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J.; IANNELLI, C.M. Eficiência da estaquia, da microestaquia e da

micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* spp. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 2, 1997, Salvador. **Anais...** Colombo: Embrapa CNPF, 1997, p.40-45.

YASODHA, R.; SUNATHI, R., GURUMURTHI, K. Micropropagation of difficult to propagate clones of *Eucalyptus* . In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 2, 1997, Salvador, **Anais...** Colombo: Embrapa CNPF, 1997, p.123-128.