

ESTIMULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE GOMOS INTERFASCICULARES NA Pinus  
pinaster Aiton COM APLICAÇÃO DE BENZILADENINA

Maria Margarida Chagas de Ataíde Ribeiro

Maria Ângela Lima Antunes

Depto Florestal. Escola Superior Agrária de Castelo Branco  
Qta da S<sup>a</sup> de Mérculos. 6000 CASTELO BRANCO. PORTUGAL

#### RESUMO

Efectuou-se um ensaio sobre o efeito da aplicação de uma citocinina, a benziladenina (BAP), nas concentrações de 200, 100, 50 e 0 mg/l e ainda uma testemunha sem tratamento, para estimular o desenvolvimento de gomos interfasciculares em plantas de Pinus pinaster Ait. com um ano e meio de idade. No delineamento experimental utilizaram-se blocos casualizados completos com 5 repetições por tratamento. Um mês após o término do ensaio o tratamento com maior concentração de BAP revelou-se o mais eficaz ( $P < 0,001$ ), com  $47,5 \pm 3,96$  gomos formados em média por planta, relativamente à testemunha que formou  $2,3 \pm 0,67$  gomos em média por planta. Os tratamentos com a BAP não foram tóxicos para as plantas mas foram inibitórios do alongamento dos rebentos.

Palavras chave: Propagação vegetativa, rejuvenescimento, gomos interfasciculares, benziladenina, Pinus pinaster

#### INTRODUÇÃO

O uso da propagação vegetativa no domínio florestal tem sido feito para várias espécies e as suas vantagens, relativamente à possibilidade de propagar material melhorado, têm sido demonstradas por vários autores (Thulin e Faulds, 1968; Burdon e Shelbourne, 1974; Libby, 1974; Kleinschmit, 1983).

A avaliação do fenótipo, em geral, só é possível após a árvore ter atingido uma idade suficiente. Assim, a dificuldade em propagar espécies florestais, nomeadamente Pinus spp., prende-se com a necessidade de utilizar material adulto e por isso com o estado de maturação da planta dadora (Franclet, 1977).

Normalmente quando aumenta a idade diminui a capacidade de enraizamento e a qualidade das raízes formadas (Kleinschmit, 1977). Então, antes de se ampliar a propagação vegetativa de árvores adultas às espécies

economicamente importantes é necessário estudar o problema do rejuvenescimento do material a propagar (Bonga,1982;Franclet,1983).

Existem vários métodos para produzir material «rejuvenescido» com base em árvores adultas. Estas técnicas incluem, entre outras, a «microenxertia» em cascata, a propagação de rebentos de touça, as podas severas e ainda a aplicação de citocininas (Greenwood,1986).

Os gomos interfasciculares de Pinus spp. reactivados pela aplicação de citocininas podem constituir uma fonte inesgotável de material para propagar (Mergen e Simpson citados por Whitehill e Schwabe,1975) que, em virtude do seu estado mais juvenil e do teor mais elevado de promotores de enraizamento, podem ser mais facilmente enraizados que os auxiblastos (Franclet, 1979; Rauter, 1983).

Em coníferas, a aplicação de citocinina, usualmente BAP, em material adulto (com ou sem remoção do gomo apical) estimula o desenvolvimento de gomos interfasciculares com características juvenis (Bouriquet et al., 1985; Whitehill e Schwabe, 1975). No caso do pinheiro bravo foi feita a estimulação de gomos interfasciculares numa árvore de 80 anos para posteriores enxertias (Franclet,1983) Também noutras espécies, como a Quercus suber L., se usou uma citocinina como indutora da brotação axilar (Tonbio,1986). Mazalewski e Hackett (1979) pulverizaram com BAP a base de Eucalyptus ficifolia F.Mull., adultos, e conseguiram obter rebentos epicómicos juvenis. Pereira et al. (1984) estimularam dessa forma a rebentação de touça de Eucalyptus globulus Labill. também adultos, quando decapitados na primavera. Evers et al. (1986) referem que tratamentos com BAP induzem o aparecimento de rebentos vigorosos e ortotrópicos em plantas de Alnus glutinosa (L.) Gaertner.

Neste ensaio pretendeu-se estudar a reacção de plantas de pinheiro bravo a várias concentrações de BAP relativamente ao nº de gomos interfasciculares formados e também um possível efeito inibitório ao nível do alongamento dos mesmos. Foi também avaliada uma eventual fitotoxicidade dos tratamentos efectuados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os tratamentos com a citocinina foram efectuados em plantas de pinheiro bravo com um ano e meio de idade provenientes de semente e produzidas em condições normais de viveiro (fig. 1). O ramo terminal foi cortado em cerca de 7 cm e também alguns ramos axilares (ver foto. 1 e 2). Isto só por si leva ao desenvolvimento de gomos interfasciculares, que se encontram entre as "agulhas" (braquiblastos ou pseudófilos) e que por isso se designam impropriamente de "braquiblastos" (fig.4 e foto. 4), e também de gomos axilares que dão origem a ramos axilares (Franclet,1979).

Procedeu-se à pulverização da parte aérea das plantas com cerca de 30 ml de solução com a concentração respectiva de BAP, além de um agente dissolvente, glicerol a 3%, e um agente surfactante, TWEEN 80 a 0,1%. Os tratamentos iniciaram-se no mês de Maio, e as pulverizações foram efectuadas uma vez por semana durante 4 semanas consecutivas (foto.3). Utilizaram-se 4 concentrações distintas de BAP: 200,100.50 e 0 mg/l. Às plantas testemunha não foi aplicada nenhuma solução. Efectuou-se o delineamento experimental em blocos casualizados completos, com 5 repetições e 6 plantas por repetição. A contagem dos resultados foi feita um mês após a última pulverização. Foram recolhidos os seguintes dados por planta: número de gomos interfasciculares formados, medição do maior rebento formado e número de ramos axilares.

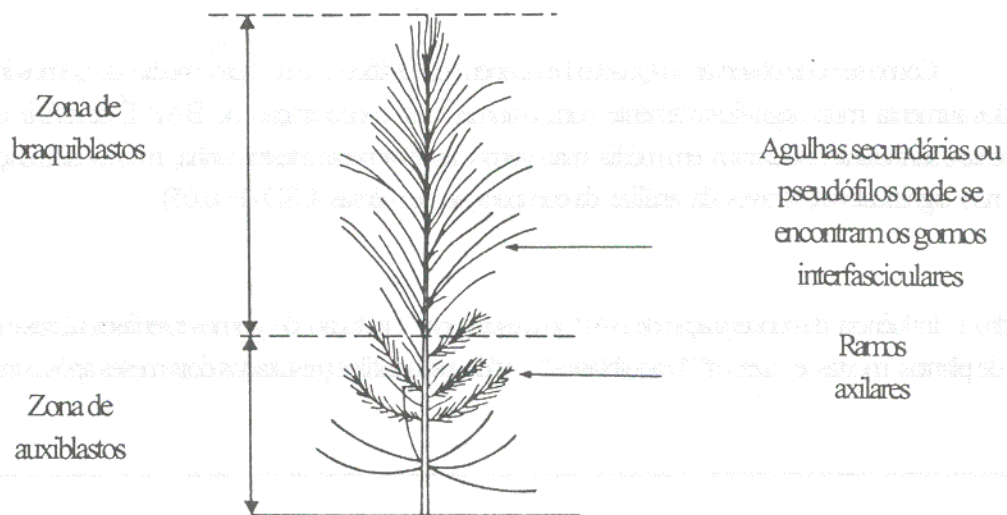


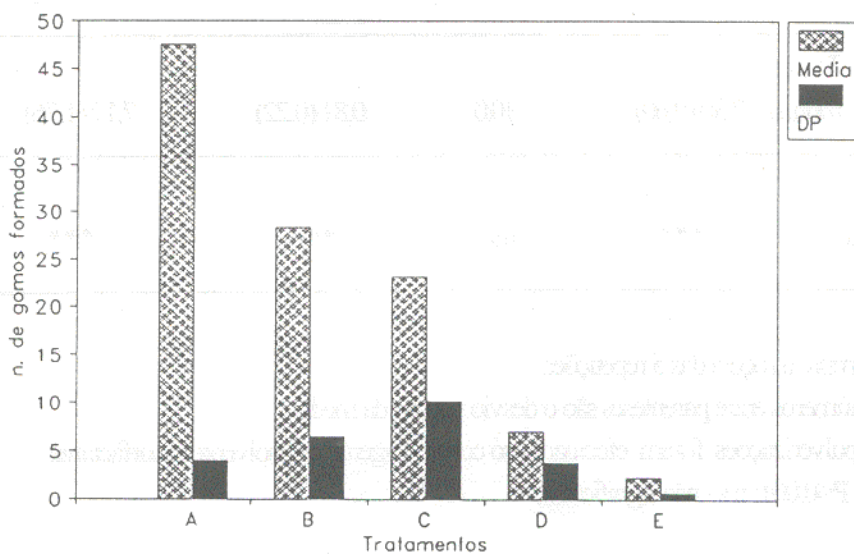
Figura 1 - Representação esquemática da morfologia-tipo da planta utilizada no ensaio

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os gomos interfasciculares apareceram cerca de 20 dias após a primeira pulverização, em todos os tratamentos, excepto nas plantas testemunha (dados não apresentados).

As plantas pulverizadas apresentavam os gomos interfasciculares ("braquiblastos") ao longo de todo o caule (foto.6), enquanto que as plantas testemunha (E) só apresentavam gomos na parte superior do caule (foto.5).

Gráfico 1 - Efeito da concentração de BAP no número médio de gomos interfasciculares formados (Média e desvio padrão)



Como se pode observar no Quadro I e também no Gráfico 1, o número médio de gomos interfasciculares formados aumenta muito significativamente com o aumento da concentração de BAP. É de referir que os agentes dissolvente e surfactante induziram em média mais gomos relativamente à testemunha, mas as diferenças verificou-se serem não significativas, através da análise da comparação de médias -LSD-( $P < 0.05$ ).

Quadro I: Influência da concentração de BAP no crescimento e indução de gomos interfasciculares e ramos axilares, na % de plantas mortas e razão nº "braquiblastos" / nº de pseudófilos (resultados dois meses após o início do ensaio)

Tratamento	BAP mg/l	Nº médio de gomos formados (nº braquibl.)	Plantas mortas %	Comp. médio do maior rebento (cm)	Nº médio ramos axilares	ib nº braq. / nº pseud.
A	200	a b 47,53 (3,96)	13,4	0,70 (0,09)	19,2 (2,37)	0,84 (0,07)
B	100	28,33 (6,42)	16,8	0,64 (0,10)	20,06 (0,95)	0,64 (0,15)
C	50	23,18 (10,15)	40,0	0,60 (0,13)	15,43 (6,36)	0,53 (0,14)
D	c 0	6,93 (3,72)	16,8	1,71 (0,29)	7,70 (3,03)	0,22 (0,16)
E	Teste- munha	2,30 (0,60)	10,0	0,81 (0,22)	7,17 (1,76)	0,06 (0,02)
Significância		d ***	ns	***	***	***

a É sempre a média das 5 repetições

b Os números entre parênteses são o desvio padrão da média

c As pulverizações foram efectuadas só com os agentes dissolvente e surfactante

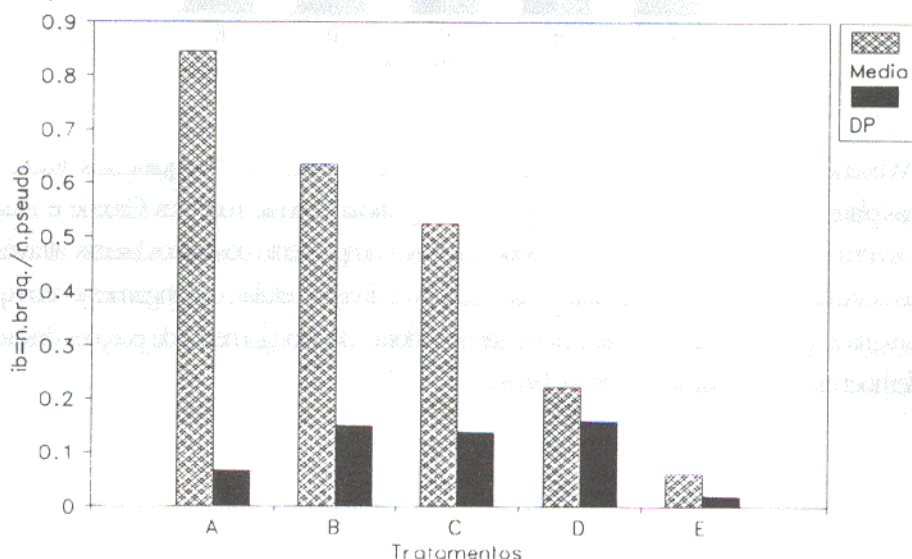
d \*\*\*:  $P < 0.001$ ; ns - não significativo

Em muitas espécies, tratamentos da parte aérea com citocininas, libertaram os gomos axilares de uma inibição correlativa (Tamas, 1987). Parece que o desenvolvimento dos rebentos requer esta hormona produzida nas raízes, que se acumula preferencialmente no gomo apical, privando os gomos laterais do seu suprimento em citocinina (Philips, 1976). No entanto existem evidências de que a aplicação de citocinina externa por si só, tem um efeito passageiro na perda de dominância apical (Hillman, 1985). Assim, a decapitação das plantas é um processo muito usado com esse fim em ensaios deste tipo (Whithehill e Schawbe, 1975; Pereira et al., 1984). Em pinheiro bravo com dois a três anos foram induzidos ramos interfasciculares através do corte do ramo apical (Franclet, 1979). Neste ensaio os resultados devidos a essa operação são-nos dados pela análise das plantas testemunha (tratamento E), e de facto o valor obtido em relação ao número de gomos interfasciculares formados é significativamente inferior a todos os outros tratamentos (ver Gráfico 1).

Foi considerado quer o nº de "braquiblastos" despertados pelos tratamentos com o regulador de crescimento dependeria do nº de pseudófilos ("agulhas") pré-existent. Construiu-se por isso o índice *ib* como a razão entre o número de gomos interfasciculares induzidos sobre o número de pseudófilos, contados estes imediatamente antes de se terem iniciado as pulverizações. Verificou-se ainda, que as diferenças entre as plantas distribuídas pelos diferentes tratamentos e blocos, no número de pseudófilos após o corte do ramo terminal, eram não significativas.

O tratamento dos dados com este índice, pareceu-nos mais correcto pois eliminaria alguma da variação devida à capacidade potencial da planta para formar gomos interfasciculares, que dependeria pelo menos em parte do seu número de pseudófilos no início do ensaio. Os dados foram tratados após a transformação  $\arcsen \sqrt{ib}$ , e verificou-se serem os resultados altamente significativos. Observando o Quadro I e Gráfico 2 podemos concluir que o tratamento com maior concentração de BAP promoveu em média o aparecimento de gomos interfasciculares em 85% dos pseudófilos, o que poderá significar que a utilização de concentrações mais elevadas não iria levar a uma resposta de muito interesse.

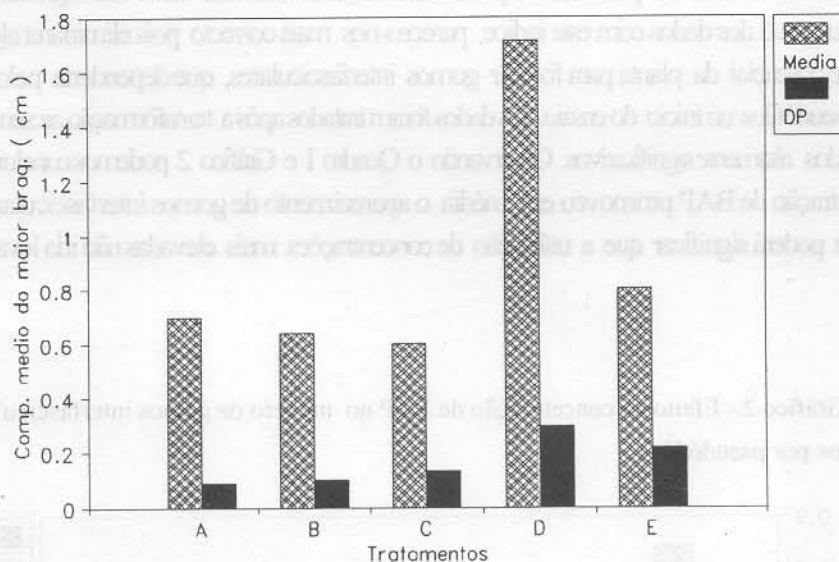
Gráfico 2 - Efeito da concentração de BAP no número de gomos interfasciculares induzidos por pseudófilo



O número de plantas mortas em cada tratamento parece não estar correlacionado com a concentração da citocinina, já que o tratamento E (testemunha) apresenta o mesmo nº de plantas mortas que o tratamento com a mais elevada concentração de BAP (ver Quadrol). Talvez as plantas tenham morrido por terem sido decapitadas numa altura do ano desfavorável.

O número médio de ramos axilares formados também aumentou significativamente do tratamento E para o A (ver o mesmo quadro). Mas, por outro lado, a citocinina parece inibir o comprimento dos "braquiblastos" formados. No tratamento D (sem BAP) o comprimento médio do maior "braquiblasto" mais que duplica relativamente aos outros tratamentos (com BAP), como se pode observar no gráfico 3, sendo essa diferença muito significativa. As plantas testemunha (E) apresentam um comprimento médio do maior "braquiblasto" é inferior ao do tratamento D, possivelmente devido ao facto de os gomos só terem aparecido, em média, uma semana depois.

Gráfico 3 - Efeito da concentração de BAP no comprimento médio do maior "braquiblasto"



Whitehill e Shwabe (1975) compararam o comprimento médio dos "braquiblastos" tratados com BAP (100 mg/l) com o das plantas testemunha e verificaram que eram significativamente menores. Greene e Autio (1990) referem que tratamentos com BAP em *Malus domestica* Bork. reduziu o comprimento dos ramos laterais através de um aumento da competição entre eles. Apesar das citocininas estimularem e divisão celular, o alongamento tem que se verificar na presença de auxina e, pelo contrário, as citocininas são inibidoras do alongamento de porções destacadas do caule ou da raiz (Vanderhoef citado por Salisbury e Ross, 1978).

## CONCLUSÕES

Os ramos interfasciculares servem perfeitamente para a propagação vegetativa do pinheiro bravo, embora fosse interessante testar em que medida os tratamentos com citocinina externa poderão afectar a capacidade de emissão de raízes, apesar do aspecto deles ser mais juvenil (foto.4). Mazalewesky e Hackett (1979) testaram a capacidade de enraizamento de ramos provenientes de gomos induzidos por aplicação de citocinina e verificaram que enraizavam melhor do que ramos da mesma árvore não submetidos ao tratamento, mas segundo eles isso aconteceu sobretudo devido ao facto de os ramos tratados se situarem mais perto da raiz e serem por isso ontogenicamente mais jovens.

Parece que aplicações de citocinina externa contrariam o fenómeno da dominância apical, e a resposta em termos de gomos interfasciculares induzidos é função da concentração de citocinina aplicada mas também do número de pseudófilos por planta. Este tipo de resposta tem sido encontrada por vários autores e em várias espécies arbóreas (ver pág.2).

O aumento do número de gomos leva a uma diminuição no comprimento dos mesmos. Este fenómeno poderá surgir por via indirecta, pelo aumento da quantidade de "sinks" metabolicamente activas para os fotoassimilados, mas também por via directa devido à própria acção da citocinina. Tamas (1987) refere que o crescimento de gomos pode ser substancialmente aumentado com a aplicação de giberelina externa (GA3). Poderiam ser efectuados ensaios para verificar este tipo de efeito, que ao ser reproduzido, aumentaria a rapidez na obtenção de material em condições de ser propagado.

Tem constado na literatura efeitos fitotóxicos em ensaios com citocininas, que poderão estar relacionados com o solvente utilizado (Mazalewzky e Hackett, 1979; Evers et al., 1986) Nesta experiência não houve uma reacção específica das plantas no que se refere a esse aspecto.

## BIBLIOGRAFIA

- Bonga, J.M., 1982, Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In "Tissue Culture in Forestry", Ed. J.M. Bonga e D.J. Durzan, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publis, pp 387-412.
- Bourtiqet, R., M. Tsogas, A. Blaselle, 1985, Essai de rajeunissement de l'épicea par les cytokinines, "Annales Recherches Sylvicoles AFOCEL 1984", pp 173-185
- Burdon, R.D., C.J.A. Shelbourne, 1974, The use of vegetative propagules for obtaining genetic information, "N. Z. For. Sci." 4(2):418-425.
- Evers P., J. Donkers, A. Pratt, E. Vermeer, 1986, Micropropagation of forest trees through tissue culture. Final Report in the EEC Programme "Wood as a Renewable Raw Material" Dorchkamp Res. Int. For. and Land. Planning. Wageningen.
- Franclét, A., 1977, Manipulation des pieds-mères et amélioration de la qualité des boutures, "AFOCEL, Études et Recherches, n°8".

- Franclet,A.,1979,Rajeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation vegetative, "AFOCEL,Études e Recherches, n°12".
- Franclet,A., 1983, Rejuvenation:teory and pratical experiences in clonal silviculture, "Proc. 19th Meeting Can. Tree Impro. Asso.", Aug.22-26, Toronto, pp 96-134.
- Green D.W.,W.R.Autio,1990,Vegetative responses of apple trees following benziladenine aplication and growth regulator sprays,"J.Amer.Soc.Hort.Sci." 115(3):400-404.
- Greenwood,M.S., 1986, Rejuvenation of forest trees, In "Hormonal Control of Tree Growth" Ed. S.V.Kossuth e S.D.Ross, 6:1-12, Marti.Nijh.Publ., Dordrecht.
- Hillman,J.R.,1985, Apical dominance, In "Advanced Plant Physiology" Ed M.B. Wilkins, pp:127-148, Pitman.
- Kleinshmit,J.,1977, Problems of vegetative reproduction, Proc. 3rd World Cons. on For. Tree Breed., FAO/IUFRO, Canberra.
- Kleinschmit,J., 1983,Concepts and experiences in clonal plantations of conifers, Proc. 19th Meeting Can. Tree Impro. Asso., Aug. 22-26, Toronto, pp 26-56.
- Libby,W.J., 1974, The use of vegetative propagules in forest genetics and tree improvement, "N.Z.J.For.Sci" 4(2):440-447.
- Mazalewsky,R.L., W.P.Hackett, 1979, Cutting propagation of Eucalyptus ficifolia using cytokinin-induced basal trunk shoots, "Int.Plant.Prop.Soc".,29:118-125.
- Pereira,J.S.,I.Almeida,M.G.Esquivel,Novais M.C.,Santos R.M.,1984, Annual variation in sprouting capacity of stumps of coppiced Eucalyptus globulus. In "Bioenergy 84,Biomass Resources" Ed. H. Ègneus e A. Ellegard, 2:127-131, Elsevier Appl. Sci. Publ. London.
- Phillips,I.D.J.,1975, Apical Dominance, "Ann. Rev. Plant Physiol".,26:341-367
- Rauter,M.R.,1983, Current status off macropropagation,"Proc.19th Meeting Can. Tree Impro.Asso."Aug 22-26,Toronto,pp 58-74.
- Salisbury,F.B.,C.W.Ross, 1978, Plant Physiology, 2<sup>ed.</sup>, Wadsworth Publ.Comp.
- Steel,R.G.D.,J.H.Torrie, 1980, Principles and Procedures of Statistics:A Biometrical Approach, McGraw Hill.

Tamas, I.A., 1987, Hormonal regulation of apical dominance, In "Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development", Ed. P.J.Davies, pp 393-410, Marti. Nijh. Publ., Dordrecht.

Thulin, J.J., T.Faulds, 1968, The use of cuttings in the breeding and afforestation of Pinus radiata, "N.Z.Jour.For.", 13(1):66-77.

Toribio, M., 1986, Rejuvenecimiento de tejidos de especies leñosas. Inducción de la brotación en Quercus suber L. mediante tratamientos con benciladenina, 1º Congre.Flor.Nacio., pp 124-127, Lisboa.

Whitehill, S.J., W.W.Schwabe, 1975, Vegetative propagation of Pinus sylvestris, "Physiol.Plant.", 35:66-71.



Foto.1: Corte do ramo terminal (com cerca de 7cm).



Foto.2: Corte de um ramo axilar (só se efectuava se o seu comprimento fosse superior a 5 cm).



Foto.3: Pulverização da parte aérea.

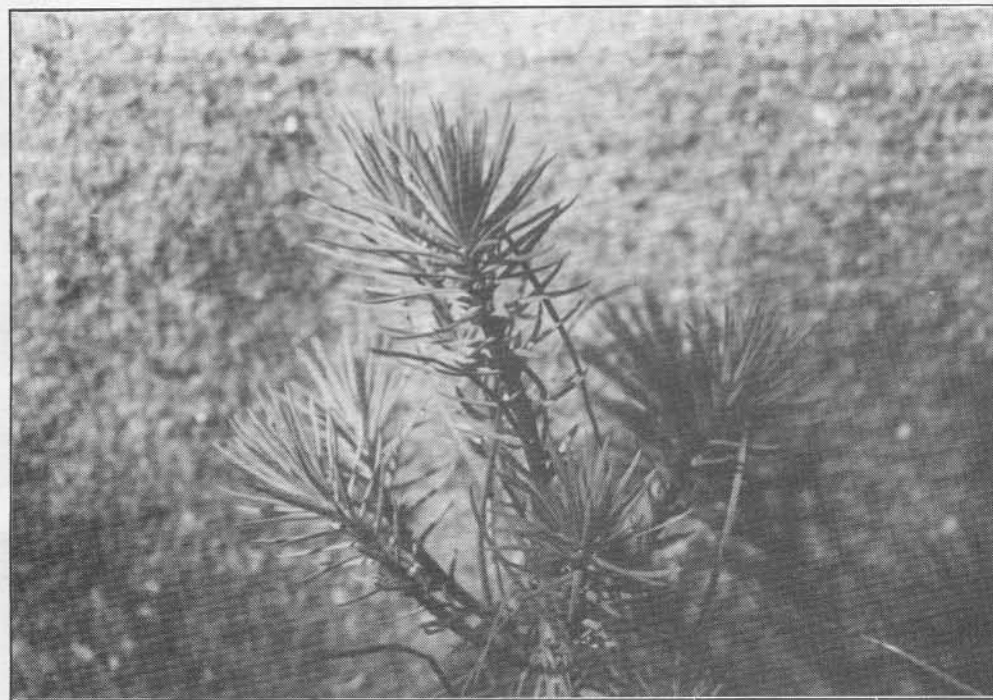


Foto.4: Aspecto juvenil dos rebentos provenientes do desenvolvimento dos gomos interfasciculares que se encontram entre os braquiblastos ou pseudófilos e que se designam impropriamente de "braquiblastos".

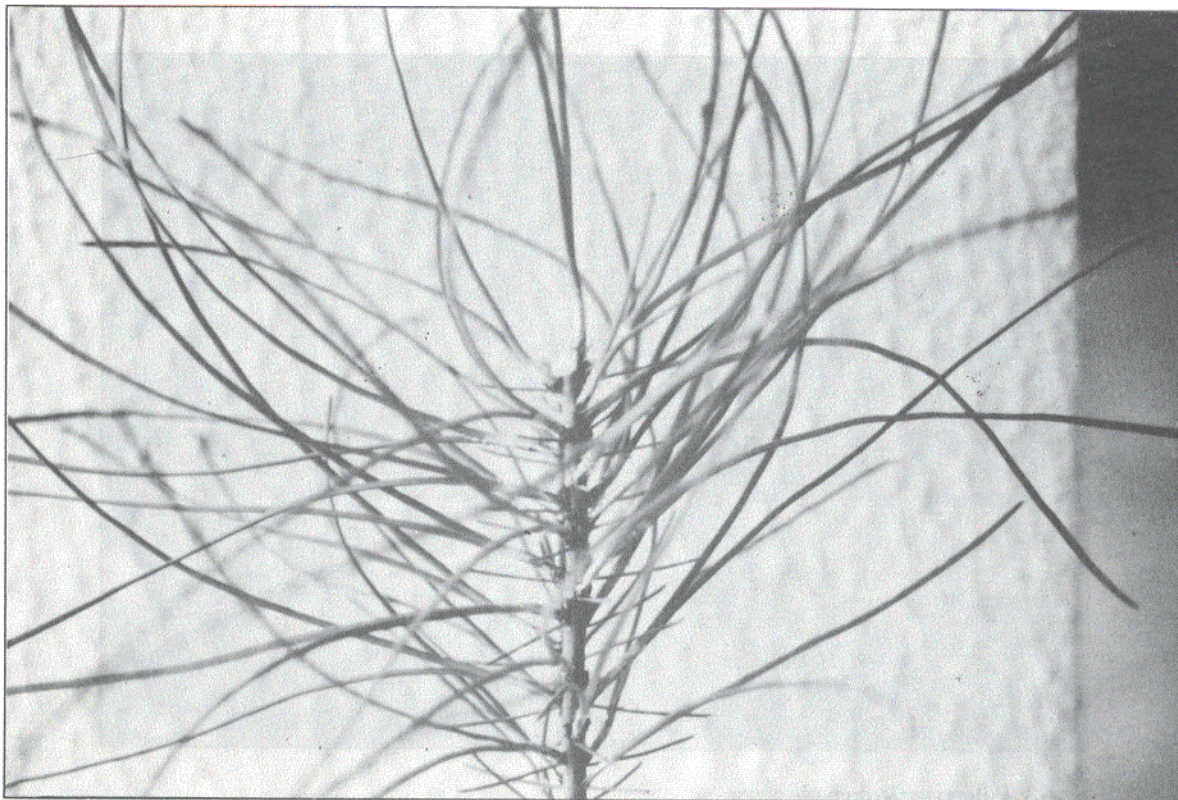


Foto.5: Aspecto de uma planta que foi submetida ao tratamento E, um mês após o fim do ensaio.



Foto.6: Aspecto de uma planta submetida ao tratamento A, ao fim do mesmo tempo.