



ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

Maturação e Propagação Vegetativa em Espécies Florestais

MARGARIDA ATAÍDE RIBEIRO

1993



ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE CASTELO BRANCO

Maturação e Propagação Vegetativa em Espécies Florestais

Maria Margarida Chagas de Atafde Ribeiro

1993

TÍTULO:

Maturação e Propagação Vegetativa em Espécies Florestais

AUTOR:

María Margarida Chagas de Ataíde Ribeiro

EDIÇÃO:

Registo nº 86233/95
Tiragem - 500 exemplares
Instituto Politécnico - Escola Superior Agrária de Castelo Branco
Rua S. João de Deus, 25 - 3º
6000 CASTELO BRANCO

CAPA E ARRANJO GRÁFICO:

Tomás Monteiro

COMPOSIÇÃO E IMPRESSÃO:

Centro de Recursos da Escola Superior Agrária de Castelo Branco
Quinta da Srª de Mércules
6000 CASTELO BRANCO

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. A propagação vegetativa na óptica do melhorador florestal	3
2.1. Importância da propagação vegetativa	3
2.2. Potencialidades e limites da propagação clonal	7
3. A problemática da maturação	13
3.1. Conceitos e teorias relativos à maturação	13
3.1.1. Idade cronológica, ontogénica e fisiológica	13
3.1.2. Teorias sobre o envelhecimento	17
3.1.3. Os processos de <i>ciclofisis</i> e <i>topofisis</i>	20
3.2. A natureza da maturação	24
3.2.1. Maturação e epigenética	24
3.2.2. Metilação do DNA	25
3.2.3. Maturação e metilação	29
4. Processos para a obtenção de um elevado potencial de enraizamento	33
4.1. Manipulação do propágulo	35
4.2. Mobilização da planta dadora	41
5. Nota final	45
6. Bibliografia	47

1. Introdução

Para o melhorador florestal pode ser bastante importante desenvolver técnicas para a propagação vegetativa das espécies florestais, mais importantes do ponto de vista económico.

A superioridade da propagação vegetativa em relação à propagação sexual reside na possibilidade de transferência de todo o potencial genético das árvores seleccionadas, incluindo a variância não aditiva, para a descendência e, por consequência, a obtenção de maiores ganhos genéticos, pelo menos a curto e médio prazo.

A maturação em espécies arborescentes acarreta em geral um aumento da dificuldade de propagação vegetativa de indivíduos seleccionados. Quando as árvores atingem idade suficiente para que o seu potencial possa ser avaliado, a utilização da via clonal em programas de melhoramento, pode ser bastante problemática.

Os meristemas apicais parecem ter um papel bastante importante no envelhecimento ontogénico. No entanto, as variações espaço-temporais das condições fisiológicas da árvore são determinantes no processo de maturação.

2 Maturação e Propagação Vegetativa em Espécies Florestais

Neste trabalho discute-se o fenómeno de maturação das árvores, apresentam-se técnicas que têm sido utilizadas para o reverter e questiona-se se essas técnicas levam ou não a um verdadeiro rejuvenescimento.

2. A propagação vegetativa na óptica do melhoramento florestal

2.1. Importância da propagação vegetativa

No nosso país as espécies mais importantes relativamente à área arborizada e ao aspecto económico são a *Pinus pinaster* Aiton, a *Quercus suber* L. e a *Eucalyptus globulus* Labill. (Tabela 1). Existem outras espécies com uma certa importância, mas a área que ocupam ou a ocupar não justifica provavelmente um investimento tão pesado do ponto de vista económico, como o de um programa de melhoramento.

O sector florestal é bastante importante para a economia do

Tab. 1 - Composição da floresta no país.
(Fonte: DGF, 1993)

Espécie	Área total 10 ³ ha	Área flor. %
Pinheiro bravo	1064,3	34,3
Sobreiro	570,8	18,4
Azinhaira	401,2	12,9
Eucalipto	328,4	10,6
Carvalhos	103,4	3,3
Castanheiros	27,5	1,0
Diversas	612,1	19,7
Área florestal	3107,7	100,0

país, com um peso considerável nas exportações, atingindo cerca de 12% do total (Tabela 2). Se atendermos que a Europa é altamente deficitária em produtos florestais, prevêem-se boas possibilidades de investimento no sector. A área florestal deveria ocupar cerca de 60% do território.

Além disso o desajustamento na utilização do solo no nosso país atinge

Tabela 3 - Utilização actual e potencial do solo. (Fonte: DGF, 1992; DOF, 1993)

	Actual		Potencial	
	10 ³ ha	%	10 ³ ha	%
Área florestal	3108	34,9	5280	59,0
Área agrícola	4146	46,6	2337	26,0
Outra área	1639	18,4	1276	14,0
Área total				
Continente	8893	100	8893	100

tidade e qualidade.

A propagação clonal é praticada há muitos séculos, mas tem incidido fundamentalmente em algumas espécies com fins mais ou menos específicos, sobretudo nos domínios das plantas hortícolas, ornamentais ou de produção de fruto (Thulin e Faulds, 1968; Gomes, 1987).

No domínio florestal, a propagação clonal intensiva tem sido empregue no género *Populus*, mas também é clássico o caso da *Criptoméria japónica* D. Don. (Thulin e Faulds, 1968; Libby, 1983; Rauter, 1983; Zobel e Talbert 1984; Martin e Pratt, 1985). A estacaria de choupo, por exemplo, apresentava vantagens silvícolas tão evidentes (povoamentos homogéneos, altas produtividades, revoluções curtas, etc.) que a investigação florestal começou a pensar em estender esse processo a outras espécies florestais (Martin e Pratt, 1985).

Tabela 2 - Conjunto das indústrias florestais. (Fonte: DGF, 1992)

	Total	Produtos
	(1991)	florestais
	10 ⁶ escudos	%
Exportações	284,291	12
Importações	129,555	3
Saldo	154,736	9

aproximadamente 1/4 nas zonas interiores e pobres (Tabela 3 e Figura 1). A expansão da área florestada e a melhoria da qualidade genética do material usado na arborização podem ser factores significativos para o aumento da produção em quan-

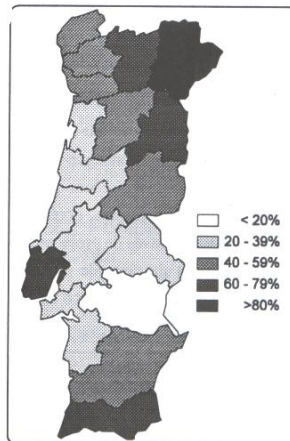


Fig. 1 - Desajustamento do uso do solo por distrito. (Fonte: REOTA, 1987)

Hoje em dia, em muitas partes do mundo, está a utilizar-se intensamente a propagação vegetativa para algumas espécies economicamente interessantes, como é o caso da *Picea abies* (L.) Karsten na Alemanha, com uma produção anual superior a um milhão de estacas por ano, para arborização (Kleinshmit, 1983). No Brasil verificaram-se resultados espectaculares com um programa de melhoramento iniciado em 1975 com híbridos naturais de alguns eucaliptos tropicais (*Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden, *Eucalyptus saligna* Sm., *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, etc.). As plantações iniciais estão agora quase completamente substituídas por estacaria e têm crescimentos médios de cerca 3 cm por dia nos três primeiros anos e com produções de 70 m³/ha/ano (Tabela 4).

Tabela 4 - Eucaliptos tropicais híbridos no Brasil. (Adaptado de Martin e Pratt, 1985).

Material genético	Produção de madeira (m ³ /ha/ano)	Produção de pasta de papel (t/ha/ano)
Povoamentos iniciais (populações híbridas)	33	7,8
Povoamentos novos (melhores clones híbridos)	70	18,4
Ganho genético	+112%	+135%

Do ponto de vista teórico existem vantagens da propagação vegetativa em relação à propagação sexuada. Podemos comparar os ganhos obtidos em ambos os processos analisando a Figura 2.

A curva representa a distribuição das alturas num povoamento equiênio. Existe considerável variação na altura das árvores. Pela selecção das árvores mais altas e respectiva propagação sexuada consegue-se, em princípio, uma distribuição das alturas da descendência, um pouco desviada para a direita em relação à média dos progenitores, obtém-se um determinado ganho e a variabilidade diminui. Através da propagação vegetativa das árvores seleccionadas, a média das alturas pode vir a ser mais desviada para a direita, conseguindo-se um ganho genético maior mas com uma redução considerável da variabilidade.

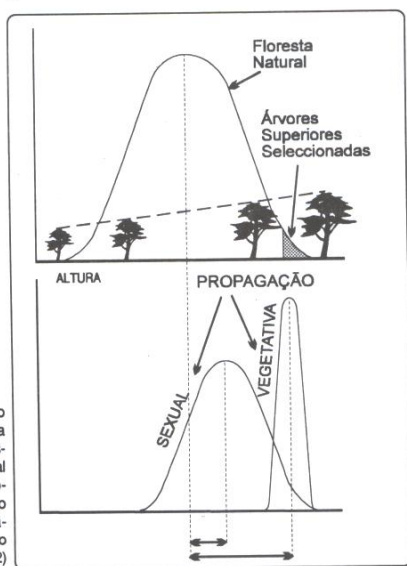


Fig. 2 - A propagação vegetativa permite a transferência integral de todo o potencial genético da árvore dadora. (Adaptado de Bonga, 1982)

A variação genética tem duas componentes, a aditiva e a não aditiva. Quando se utiliza a regeneração por semente, só se pode, em geral, manipular a porção aditiva da variação genética. No entanto, o uso da propagação vegetativa torna possível capturar e transferir para a nova árvore todo o potencial genético da árvore dadora (Zobel e Talbert, 1984).

2.2 Potencialidades e limites da propagação clonal

Potencialidades

Segundo Libby (1983) existem pelo menos 16 motivos que justificam a propagação vegetativa no contexto do melhoramento florestal, dos quais apresentamos alguns que nos parecem extremamente relevantes, confirmados também por vários autores (Burdon e Shelbourne, 1974; Kleinshmit, 1977; Bonga, 1982; Burdon, 1982; Zobel e Talbert, 1984).

A propagação vegetativa:

- Possibilita a obtenção de elevados ganhos genéticos, a curto prazo, explorando a elevada variabilidade genética existente.
- Complementa a utilização de semente melhorada que nem sempre é produzida em quantidade suficiente.
- Origina povoamentos florestais mais homogêneos (em geral as espécies florestais possuem fecundação cruzada e têm por isso uma elevada heterozigocidade).
- Permite a propagação massal de bons genótipos previamente testados e de híbridos interessantes.
- Permite a conservação dos recursos genéticos em bancos clonais. (Esta medida é imprescindível atendendo à redução da

variabilidade que um programa de melhoramento genético normalmente provoca, sobretudo quando se utilizam clones).

- Possibilita a avaliação de vários parâmetros genéticos para investigação florestal, estimativas da heritabilidade (em sentido lato), da interacção genótipo-meio, etc.

Limites

Factores ligados à espécie

Nem todas as espécies têm a mesma facilidade em enraizar (Tabela 5). Algumas contêm a nível do floema, meristemas radiculares prestes a alongarem-se, desde que as condições sejam favoráveis. São as espécies de fácil enraizamento, como é o caso dos géneros *Salix* spp., *Populus* spp., *Criptomeria japonica* D. Don, etc. (Franclet, 1977; Zobel e

Tabela 5 - Enraizamento de estacas em várias espécies de eucaliptos. (Adaptado de Chaperon e Quillet, 1977)

Espécie	% de enraizamento
E. híbrido 12 ABL * Saligna	56
E. híbrido PF1	61
E. cleosiana	0
E. deglupta	95
E. tereticornis	60
E. urophylla	13
E. alba	49
E. torelliana	32
E. excelsa	52
E. pelita	57

Talbert, 1984). Numa segunda categoria colocamos as espécies moderadamente fáceis de propagar, e através de uma manipulação simples e geralmente única do pé-mãe, por exemplo enxertia, podemos obter uma propagação massal adequada. É o caso dos géneros *Chamaecyparis* spp., *Cupressus* spp., *Juniperus* spp., etc.. Podemos ainda considerar uma última categoria de espécies, que são geralmente as mais interessantes do ponto de vista económico e que possuem efeitos de maturação precoces relativamente estáveis. O resultado depressivo da maturação parece transmitir-se ao longo de várias gerações clonais e daí

advém crescimentos menos vigorosos e importantes variações clonais; é o caso dos géneros *Pseudotsuga* spp., *Eucalyptus* spp., *Abies* spp., *Pinus* spp., *Quercus* spp., etc. (Franclet, 1977).

Mas a aptidão para a propagação clonal considerada ao nível da árvore individual, também pode ser bastante restritiva:

Factores ligados ao genótipo

Para além da origem taxonómica referida no parágrafo anterior, podemos verificar que dentro da espécie existem variações individuais muito grandes relativamente à capacidade de enraizamento (Figura 3).

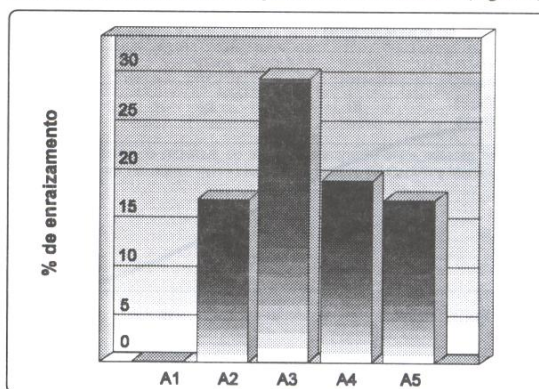


Fig. 3 - Influência do genótipo no enraizamento. Ensaio com estacas de *Pinus pinaster* Aiton provenientes de plantas com 8 anos. (Adaptado de Antunes, 1990)

Factores ligados ao estado fisiológico

Dentro de uma mesma árvore existem variações devidas a aspectos nutricionais e hormonais associadas a factores exógenos, tais como solo,

clima, etc. (Rauter, 1983). O vigor associado à condição fisiológica da estaca reflecte-se na sua capacidade para enraizar.

Factores ligados ao estado de maturação da planta

A capacidade de regeneração vegetativa diminui com a idade cronológica e ontogénica (Thulin e Faulds, 1968; Franclet, 1877; Bonga, 1982; Rauter, 1983; Hackett, 1985). Em relação ao primeiro aspecto, podemos observar na Figura 4, a evolução da capacidade rizogénica de estacas de eucalipto provenientes de plantas de diferentes idades.

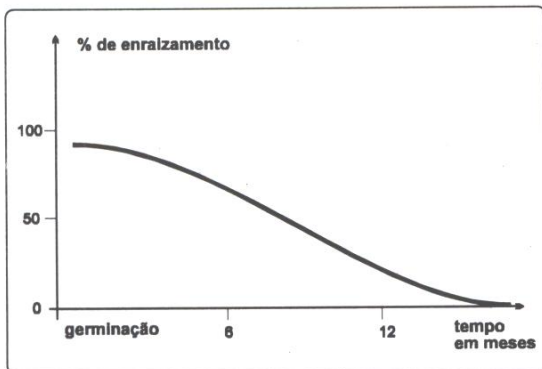


Fig. 4 - Evolução da rizogénese em função da idade na *Eucalyptus gunni* Hook F. (Adaptado de AFOCEL, 1982)

Em relação à idade ontogénica, a diminuição na capacidade de enraizamento está sobretudo relacionada com a proximidade do sistema radicular (Hackett, 1983). Por exemplo, com rebentos tirados de touças de *Eucalyptus gunni* Hook F. foram efectuados ensaios sobre a capacidade de enraizamento de estacas retiradas das partes basais e das partes terminais dos rebentos, enraizando estas significativamente pior e tanto

por quanto mais avançado o estado de maturação do rebento (Figura 5).

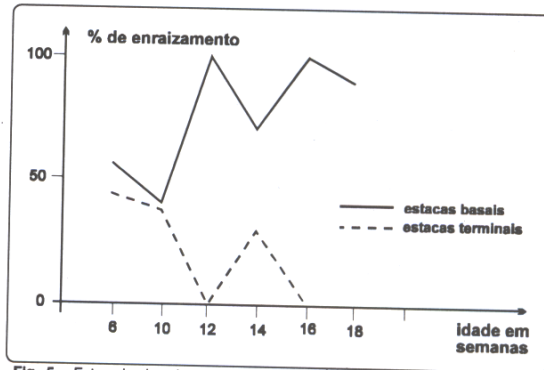


Fig. 5 - Estacaria de rebentos de touça. Comparação entre estacas basais e terminais em *Eucalyptus gunni* Hook F.. (Adaptado de Cauvin e Marien, 1972)

3. A problemática da maturação

3.1. Conceitos e teorias relativos à maturação nas espécies arbóreas

3.1.1. Idade cronológica, ontogénica e fisiológica

Segundo Monteuis (1989), citando Fontainer e Jonkers (1976) o termo envelhecimento usado vulgarmente para referir o fenómeno de maturação, pode ser dividido nas componentes *cronológica*, *ontogénica* e *fisiológica*:

Envelhecimento cronológico

Refere-se à planta como um todo e exprime-se em termos de idade cronológica. Baseia-se na contagem do tempo com a origem temporal na germinação da semente. Como se observa na Figura 6, o processo de maturação é representado como uma progressão a partir do estado jovem. Essa evolução torna-se assintótica próximo de ser atingida a

maturidade, no entanto, também existem descontinuidades, tais como o início do processo reprodutivo (Burdon, 1982).

Se o conceito de envelhecimento cronológico pode servir relativamente bem em relação ao aparecimento da floração (Hackett, 1983), já não parece tão adequado para exprimir as capacidades para multiplicação vegetativa da árvore, devido à heterogeneidade que se instala no seu seio (Franclet, 1980).

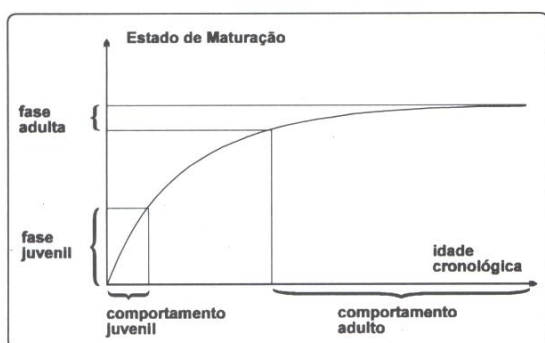


Fig. 6 - A maturação como função assintótica da idade cronológica. (Adaptado de Burdon, 1982).

Envelhecimento ontogénico (*)

É definido em relação às diferentes fases do desenvolvimento da árvore. Este sistema baseia-se nas características morfológicas e ontogénicas (Paton *et al.* 1970; Hackett, 1988) e aplica-se bem, por exemplo, às espécies com marcado dimorfismo foliar. Monteuis (1988) pôs em evidência uma correlação estreita entre o comprimento médio das agulhas (escamas) em *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchholz

(*) Fortin e Jonkers (1976) citados por Oleson (1978) consideram que o envelhecimento ontogénico é geneticamente programado e localizado nos meristemas (sinónimo de *clorofisis*).

e a capacidade de enraizamento do material, através de uma regressão linear de equação: $y = 19x - 33,5$. (Figura 7). Também Franclet (1982) encontrou uma relação do mesmo tipo entre determinados valores da razão $R=L/l$ (L =comprimento, l =largura) de folhas de *Eucalyptus camaldulensis* Dehul e certas características relacionadas com a maturidade, como seja a capacidade de enraizamento e o início da floração.

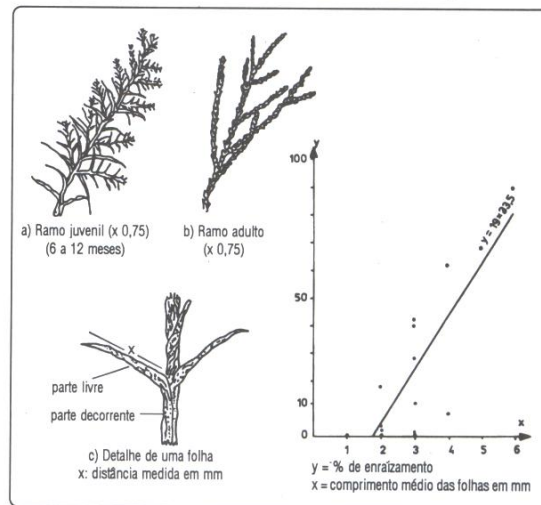


Fig. 7 - Dimorfismo foliar em *Sequoiadendron giganteum* e sua relação com a capacidade rizogénica. (Adaptado de Monteuis, 1988)

Envelhecimento fisiológico (*)

Bochert (1976) citado por Monteuis (1989) introduz o conceito de envelhecimento fisiológico, que varia de acordo com a arquitectura da árvore. Esta é vista como um complexo sistema de interrelações

tridimensionais entre os diferentes órgãos da planta. Assim a idade fisiológica condiciona numerosas manifestações do envelhecimento, tais como a morfologia foliar, o vigor, a diminuição da capacidade de enraizamento, a floração, etc., no tempo (Figura 8) e no espaço (Figura 9).

Parece justificável o interesse sobre os agentes fisiológicos na determinação das manifestações do envelhecimento. Existem numerosos estudos sobre reguladores de crescimento (com especial referência às auxinas) e de compostos do tipo peroxidases e fenólicos. Desses trabalhos parece poder concluir-se que estas substâncias não podem ser bons marcadores pois as variações no interior da mesma classe de idade mascaram as diferenças entre materiais juvenis e adultos (Hackett, 1988).

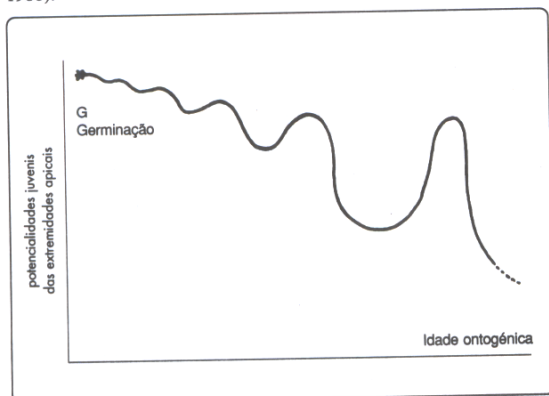


Fig. 8 - Interpretação esquemática da evolução no tempo das potencialidades juvenis dos meristemas apicais. As variações podem ser imputáveis às flutuações fisiológicas particularmente favoráveis no abrolhamento. (Adaptado de Monteulis, 1988)

(*) Os termos **envelhecimento fisiológico** e **ontogénico** correspondem aos termos **envelhecimento** e **maturação** respectivamente, segundo Wareing (1959) citado por Hackett (1985). O envelhecimento significa a perda de vigor associada aumento da complexidade da planta (mudança facilmente reversível) e a maturação quer dizer transição entre a fase juvenil e adulta (mudança dificilmente reversível).

Torna-se então necessário escolher criteriosamente os compostos de forma a poderem testemunhar a verdadeira idade fisiológica. A propósito referam-se os trabalhos de Paton *et al.* (1970) com determinação de um inibidor do enraizamento em *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden e mais recentemente (Bon,1991) a revelação da existência de um polipéptido de membrana, apelidado de J16, cuja concentração está estreitamente relacionada com a capacidade de regeneração vegetativa em *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchholz qualquer que seja o genótipo analisado e o seu estado fisiológico.

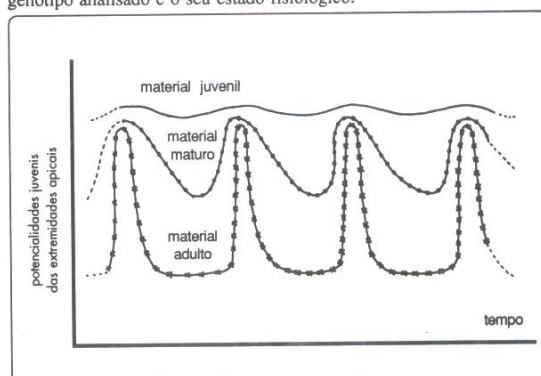


Fig. 9 - Interpretação esquemática do perfil evolutivo das potencialidades juvenis dos meristemas apicais em função da idade ontogénica. (Adaptado de Monteuis, 1988)

3.1.2. Teorias sobre o envelhecimento

Tem sido dada particular ênfase ao aparecimento da floração como sinal do fim do período juvenil (Hackett *et al.*,1990), período esse favorável ao enraizamento de estacas. Mas isso pode ser uma coincidência, pois eucaliptos em viveiro, ainda com capacidade para serem enraizados por estaca, podem apresentar flores (Francllet,1983).

A distinção entre estado juvenil e adulto tem obedecido a critérios demasiado estanques como se pode ver na Tabela 6. Segundo os autores da referida tabela, esta foi elaborada com base em poucas espécies e não é completamente generalizável. Além disso, existe um gradiente ao longo da árvore e ciclos durante os quais existem meristemas juvenis e meristemas maduros.

Tabela 6 - Características juvenis e maduras. (Adaptado de : Bonga, 1982; Franclet, 1983 e Gomes, 1987)

Característica	Juvenil	Matura
Núcleo	pequeno, envolvido por membrana fina	reticulado e alongado envolvido por membranas do retículo endoplasmático
Cromatina	pouco densa	densa
Ribossomas	ausência	associados à membrana
Meristemas apicais	arredondados células grandes	abobadado células pequenas
Folhas	células epidérmicas compridas retenção durante o Inverno	venação densa, espessas coloração azulada
Ramos	dirigidos para o tronco	afastados do tronco
Espinhos	frequentes	raros ou ausentes
Tronco	sem bifurcação traqueídeos curtos casca lisa	tronco bifurcado casca rugosa
Estacas	emissão fácil de raízes adventícias	difícil emissão de raízes adventícias
Células e tecidos "in vitro"	capaz de organogénese	incapaz de organogénese
Bioquímica	ausência ou pouco ABA (ácido abscísico) e outros inibidores, alta quantidade de auxinas elevada razão K/Ca	elevada quantidade de ABA e outros inibidores baixa quantidade de auxinas baixa razão K/Ca

A existência de zonas menos maduras que outras foi reconhecido por Passecker (1947), citado por Monteuis (1989), que demonstrou que a parte da árvore mais próxima das raízes se mantém mais jovem, enquanto que as partes distais são mais maduras (Figura 10-a).

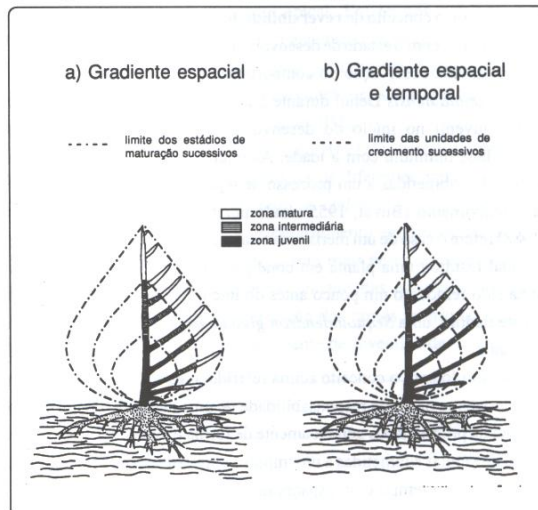


Fig. 10 - Conceito de Passecker (1947), ligado à irreversibilidade do processo de maturação (a) e conceito de Krenke (1940), que associa a maturação a um fenómeno reiterativo (b). (Adaptado de Francllet, 1983 e Monteuis, 1988)

De acordo com esta teoria, a perda da capacidade de enraizamento e o aparecimento da floração estariam geneticamente programados nos meristemas de forma irreversível. Com base nesta teoria surgiu mais tarde o conceito de **irreversibilidade da maturação** (Fortainer e Jonkers, 1976 citados por Oleson, 1978). Mas, esta teoria foi contestada pelo facto de aparecerem rebentos juvenis em plantas tratadas com citocininas ou inibidores do transporte polar da auxina.

Uma teoria contrastante com a anterior foi estabelecida por Krenke (1940), que, depois de observações com azevinho, propôs que a duração do período juvenil do meristema apical em cada surto de crescimento ia diminuindo, à medida que as raízes estavam mais longe (Figura 10-b). Assim surgiu o conceito de **reversibilidade da maturação** que relaciona os meristemas com o estado de desenvolvimento das plantas. Por exemplo, uma detalhada observação do comportamento da morfologia de *Eucalyptus camaldulensis* Dehul durante 5 anos mostrou uma reiteração do estado juvenil no início do desenvolvimento dos ramos, mas cuja intensidade diminuiu com a idade. As iniciais dos primórdios foliares terão sido submetidas a um processo de rejuvenescimento antes do seu desenvolvimento (Buvat, 1955 citado por Francllet, 1983). Monteuis (1988) refere o caso de um meristema estabelecido *in vitro*, rejuvenescido, do qual resultou uma planta em condições de campo. Esse meristema tinha sido removido um pouco antes do início do crescimento anual da árvore dadora, uma *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchholz com 100 anos.

De acordo com o conceito acima referido, o estado de maturação de um meristema não é da responsabilidade de uma célula ou de um grupo de iniciais programadas geneticamente de forma irreversível, mas de um grupo de células submetidas a um impulso correlativo como resultado da sua posição no tempo e no espaço, na árvore (Francllet, 1983).

3.1.3. Os fenômenos de *ciclofisis* e *topofisis*

De acordo com o conceito da reversibilidade da maturação (Krenke, 1940), as potencialidades juvenis iniciais da planta tornam-se ao longo do seu desenvolvimento ontogénico e ao longo do tempo cada vez mais fugazes no espaço, apresentando um máximo de intensidade no início do desenvolvimento anual das extremidades apicais (Monteuis, 1989).

Esta concepção de envelhecimento sequencial assemelha-se à noção de *ciclofisis* que corresponde à existência de núcleos virtuais de

juvenilidade circunscritos ao início do desenvolvimento do meristema primário (Figura 9).

Segundo Fortainer e Jonkers (1976) citados por Oleson (1978), a noção de *ciclofisis* equivale à noção de envelhecimento ontogénico devida à maturação do meristema apical. Em termos práticos, este fenómeno reflecte a capacidade de regeneração vegetativa das estacas, pois esta varia de acordo com a sua posição na árvore. Normalmente, as partes basais dos ramos e da copa e mais interiores são as mais adequadas para o enraizamento (Figura 3 e Figura 10-b).

Analisemos a Figura 11, em que Roulund (1975) ensaiou a capacidade de enraizamento de estacas provenientes de diferentes andares da copa de *Picea abies* (L.) Karsten. O efeito de *ciclofisis* pode ser observado como a variação na capacidade de enraizamento em função da posição da estaca na planta dadora assim, quanto mais perto da base estiver o andar, maior a capacidade de enraizamento das estacas aí retiradas (declive da recta). O grau de maturação dos ramos inferiores é menor pois, como já vimos, existe um gradiente de juvenilidade na árvore.

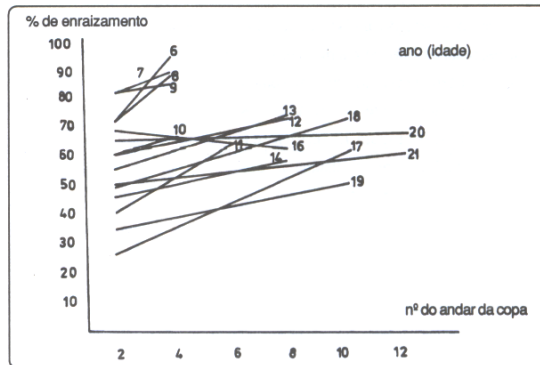


Fig. 11 - O declive indica a capacidade de enraizamento em função da posição da estaca na árvore. (Adaptado de Roulund,1975)

O efeito da idade cronológica no enraizamento, no mesmo trabalho, pode ser observada na Figura 12 como a evolução da percentagem média de todos os andares. Evidentemente que a % de enraizamento diminui à medida que aumenta a idade cronológica.

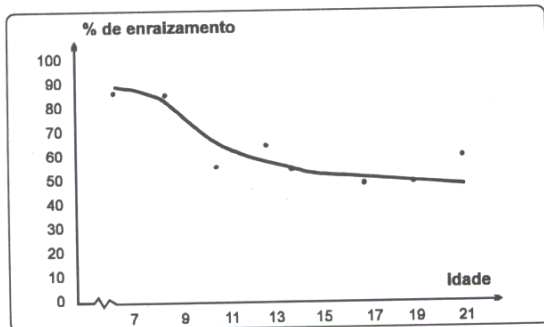


Fig. 12 - Efeito da idade no enraizamento, média de todos os andares. (Adaptado de Roulund, 1975)

Os meristemas do andar abaixo do meristema terminal são menos maduros, pois, embora com a mesma idade cronológica, têm menos um ano ontogénico e assim sucessivamente em relação aos outros andares. Na Figura 13 verifica-se a seguinte relação entre as distâncias dos meristemas assinalados relativamente à raiz: $AB > AC > AD > AE > AF$, então o meristema F será o mais juvenil pois é o que está mais perto da raiz e portanto aquele que é ontogenicamente mais jovem.

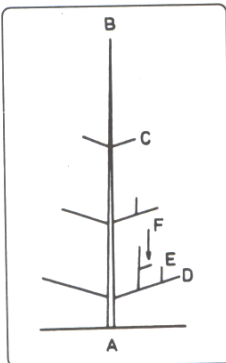


Fig. 13 - O grau de juvenildade de um meristema é inversamente proporcional à distância entre ele e a junção colo-raiz. (Adaptado de Bonga, 1982)

O coceito de *topofisis* refere-se aos hábitos de crescimento das estacas de acordo com o local da árvore de onde foram retirados (ramos terminais ou laterais). Este fenómeno não corresponde a uma alteração no processo de maturação mas sim a uma "influência" que decide qual a posição que o ramo deve ter em relação ao conjunto dos outros ramos na árvore. Parece existir uma "memória" da posição do ramo na árvore).

O termo foi introduzido por Molish (1915) citado por Oleson (1978), em relação a trabalhos de enraizamento de estacas com *Araucaria heterophylla* (Salisb.) Fr. Estacas provenientes de ramos laterais mantinham um crescimento plagiotrópico (oposto a ortotrópico-direito) que poderia durar durante bastante tempo.

Bonga (1982) cita trabalhos com *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco em que esse fenómeno se verifica bastante cedo nesta espécie (5 a 7 meses). Normalmente a recuperação é tanto mais rápida quanto mais jovem for a planta.

Em termos práticos este fenómeno afecta a produção industrial, já que diminui a rapidez de crescimento das estacas. Num ensaio realizado com estacas de *Picea sitchensis* (Bong.) Carrière, cujo crescimento, foi seguido durante alguns anos, concluiu-se que o crescimento plagiotrópico afecta tanto mais quanto maior for a idade cronológica da planta dadora (Tabela 7). Isto significa que a partir de uma certa idade, em muitas espécies, a utilização da propagação vegetativa deixa de ser economicamente viável.

Tabela 7 - Estacas enraizadas de *Picea sitchensis* 4 anos após a plantação. (Adaptado de Mason e Gill, 1986)

Idade planta dadora	Enr. (%)	Altura (cm)	Forma (*)	Sobrevivência (%)	Plagiotropismo (%)
2	86e	84.2a	1.7c	99	2
3	81e	77.2a	2.0c	99	3
4	61f	83.2a	2.0c	99	5
5	34g	80.2a	2.4d	100	6
6	42g	69.9b	2.6d	98	20

(*) Escala de 1 a 4, com 1 vertical.

Valores com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes para $P < 0.05$

3.2 A NATUREZA DA MATURAÇÃO

3.2.1. Maturação e epigenética

A fase juvenil difere da adulta em muitas características tais como a morfologia foliar, filotaxia, pigmentação, pubescência, etc., e normalmente estacas extraídas das formas juvenis e adultas mantêm durante muitos anos essas características como acontece com *Hedera helix* L. (Wareing,1987). Por outro lado, existem variações espaço-temporais na juvenilidade e possibilidade de reversão pelo menos parcial da fase adulta, como por exemplo, tratamentos com ácido giberélico em altas doses em *Hedera helix* L. (Wareing,1987).

Qual é então a base molecular da maturação ?

Sabendo que a transição entre condição adulta e juvenil é gradual, então esta não deve corresponder a uma alteração permanente do genoma. Os meristemas têm, como vimos, picos de juvenilidade mesmo quando a planta já é matura, produzindo zonas mais jovens. Uma das possíveis explicações é a de que, não se trata de uma verdadeira alteração no genoma, mas de alterações na expressão dos genes, estando provavelmente envolvido um mecanismo epigenético.

Mas como é que essas diferenças na expressão dos genes podem ser mantidas durante a mitose ?

Tem sido sugerido que a diferenciação celular pode envolver modificações em secções do DNA através da metilação de bases específicas (Holliday e Pugh,1975).

Essas modificações uma vez efectuadas, poderiam passar de geração em geração de células. Talvez as bases, susceptíveis de serem metiladas,

estejam localizadas em sítios críticos, tais como promotores ou operadores e que a afinidade destes para ligação com as proteínas seja alterada. Existem evidências que nos eucariotas as regiões fortemente metiladas do DNA sejam muito pouco transcritas. Assim, essas diferenças epigenéticas poderão ser devidas à metilação ou outras modificações do DNA. Vários autores, que se dedicam ao problema da maturação das espécies arborescentes, (Bonga,1982 ; Franclet,1982 ; Wareing,1987) referem que um dos mecanismos envolvidos possa ser a inativação génica pela metilação de regiões particulares do DNA cromossómico.

3.2.2. Metilação do DNA

O facto de um grupo metil se ligar ao carbono 5 (Figura 14) da citosina parece não ser aleatório: Existem evidências de que os grupos CG (citosina seguida de guanina) são preferencialmente metilados, embora nas plantas o grupo CXG (X= qualquer base) também o possa ser.

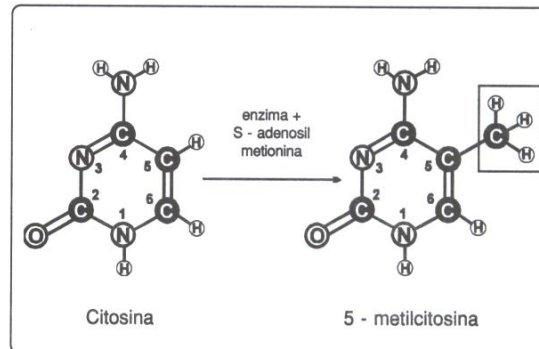


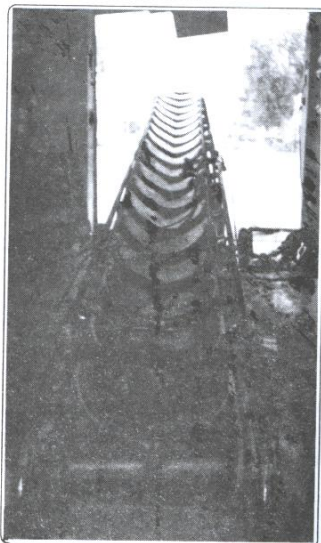
Fig. 14 - A citosina pode ser metilada por uma enzima que substitui o átomo de hidrogénio do carbono 5 por um grupo metil (CH₃). (Adaptado de Holliday, 1989)

quer de produtos acabados, ensacados ou a granel.

O rendimento destes "tapetes" é variável, dependendo da alimentação e da mão-de-obra auxiliar; em média apresentam rendimentos entre 30 a 40 ton./hora.

Um problema de utilização destes transportadores, pode ser a avaria dos motores, devido a cargas excessivas. Quando a transmissão é feita por correias, a sobrecarga obriga-as a patinar, podendo proteger assim os motores.

Figura 8 - Exemplo de transportador tipo tapete rolante



5.2.2. Tipo sem-fim

O sem-fim é um sistema mecânico helicoidal de trabalho contínuo, para pequenas e grandes distâncias. É constituído por um veio, ao qual está agregada uma hélice contínua (fig. 9), que através de movimento circular faz o transporte dos produtos.

Podem considerar-se dois tipos de sem-fins:

- que actua preferencialmente em cadeias hemimetiladas (Gruenbaum *et al.*, 1982) e que metilaria as citosinas não metiladas na cadeia oposta logo após a replicação. Como existe simetria no padrão do DNA, CG emparelha com GC a enzima "sabe" sempre onde deve metilar (Doerfler, 1983; Holliday, 1989).

É claro que existem muitos dupletos CG no DNA. Pressupõe-se assim que os que estão envolvidos na inactivação génica serão aqueles localizados na região regulatória dos genes.

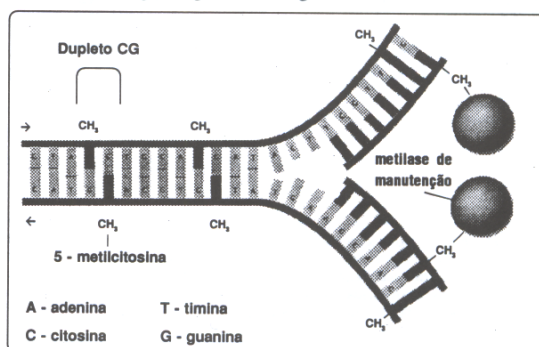


Fig. 16 - A transmissão do padrão de metilação de uma célula às células filhas é efectuada por uma enzima, a metilase de manutenção. (Adaptado de Holliday, 1989).

Pode haver também alterações no padrão de metilação do DNA. Então, o grupo metil pode ser retirado ou adicionado e os novos padrões serão a partir daí, reproduzidos (Figura 17).

Existem fortes razões para pensar que a metilação de regiões regulatórias dos genes os inactivam. Uma evidência bastante forte de que isso acontece foi observada através do uso de uma substância, a azacitidina, um análogo da citosina, que tem um átomo de azoto no lugar do carbono 5, o que provavelmente bloqueia a acção das metiltransferases. Como resultado do tratamento com esta substância, locais usualmente metilados

deixam de o ser e, por consequência, em muitos sistemas dá-se a activação de genes silenciosos, pois a azacitidina é incorporada no DNA em vez da citosina e inibe a acção da metilase de manutenção (Doerfler, 1983; Holliday, 1989).

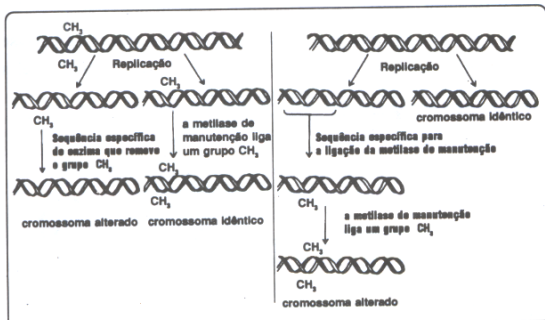


Fig. 17 - A alteração dos padrões de metilação de uma célula para a célula filha podem ser feito de várias maneiras. Por exemplo uma enzima pode remover o grupo metil de uma cadeia recém formada ou uma proteína pode ligar-se ao DNA e impedir a metilação da nova cadeia (a). O grupo CH₃ pode ser adicionado por uma enzima - metilase "de novo". (Adaptado de Holliday, 1989)

Existe no entanto um argumento de peso, que demonstra o papel da metilação do DNA na diferenciação, que é a inactivação de um dos cromossomas X em todas as células de uma fêmea.

Verificou-se, em particular, que todas as regiões regulatórias responsáveis pela ausência de expressão do cromossoma X estavam fortemente metiladas. Observou-se que tratamentos com azacitidina podem reactivar os genes "silenciosos" no cromossoma X desactivado (Holliday, 1989).

Põe-se a hipótese, de que a reprogramação genética que existe durante a meiose, corresponda a uma alteração no padrão de metilação e que o envelhecimento seja consequência de falhas no sistema de manutenção dos padrões de metilação. Então, a gradual perda de grupos metil

poderia contribuir para a activação de genes indesejáveis e com isso provocar o aparecimento de sintomas de envelhecimento (Holliday, 1989).

No seu trabalho experimental, Hayflick citado por Holliday (1989) chegou à conclusão de que o tempo de vida das células em cultura era função do número de mitoses sofridas e não da sua idade cronológica. Demonstrou que o número de locais metilados diminuía com o aumento do número de divisões celulares e que as células perdiam, eventualmente, a capacidade de proliferar, pois tratamentos com azacitidina provocam uma *morte* precoce das células.

Mas a metilação do DNA parece não ser universal, por exemplo, a 5mC não foi detectada na *Drosophyla melanogaster* L., pelo menos com os meios técnicos de que se dispõe. Além disso, este mecanismo não explica tudo o que se passa a nível do comportamento celular, pois existem outros níveis de regulação e controlo (interacção entre proteínas e DNA, comunicação entre células, etc.).

3.2.3. Maturação e metilação

Greenwood *et al.* (1989) recolheram garfos tanto em árvores com idades, dos 13 aos 25 anos, como de plantas com um ano, de *Larix laricina* (Du Roi) K. Koch. Efectuaram as enxertias em cavalos com 2 anos e seguiram o desenvolvimento dos garfos durante algumas épocas vegetativas. Na Tabela 8 estão os resultados da avaliação de vários parâmetros, entre os quais o teor de metilação do DNA, verificando-se não haver diferenças significativas entre plantas jovens e adultas. No entanto, essas diferenças já são significativas, relativamente a outros indicadores de maturidade, como sejam o crescimento plagiotrópico, a capacidade de enraizamento, etc. Os autores concluíram que embora a maturação das árvores possa estar associada a diferentes padrões de metilação, (um aumento nos níveis de metilação pode estar associado a um decréscimo na

expressão genética a nível transcricional) os métodos que foram usados para determinar a % de 5mC do DNA foliar não detectam diferenças num ou em poucos genes, por serem muito grosseiros.

Tabela 8 - Crescimento e características foliares de garfos juvenis e maduros após duas estações de crescimento. (Adaptado de Greenwood *et al.*, 1989)

Família Nº	Altura garfo (cm) (a)		Capacidade enraizamento (%) (a)		Plagiotropia garfos (a)		Clorofila foliar (a)		Metilcitosina (DNA) foliar (%)	
	Juv	Mat	Juv	Mat	Juv	Mat	Juv	Mat	Juv	Mat
1	178	164	100	82	0	64	4.0	8.3	21	21
2	160	153	100	70	8	80	4.7	7.4	18	17
3	164	172	100	18	20	75	5.3	6.5	25	23
4	161	158	100	50	0	91	6.0	6.9	16	20
\bar{X}	166	162	100	55	7	78	5.0	7.3	20	20
DP	+4	+4	+0	+0.5	+10	+11	+0.5	+0.8	+1.8	+1.3

(a) Existem diferenças significativas entre a fase juvenil e adulta $P < 0.05$ (x = média; DP = desvio padrão)

Gorn Palmgren e a sua equipa (1991), utilizando tecidos de cenoura, concluíram que o nível de metilação é específico de cada tecido, mas não encontraram uma correlação simples entre o estado de desenvolvimento e a idade do tecido e o nível de metilação. Mas a figura 18 sugere que as alterações no padrão de metilação devem ser consideráveis durante o desenvolvimento. Por exemplo, os embriões somáticos são 45% mais metilados que as raízes.

Tabela 9 - Conteúdo em 5mC e desoxiribonucleósidos do DNA da região basal, média e de topo das folhas 3, 5 e 7 em *callus* embriogénico (E) e não embriogénico (NE). (Adaptado de Morrish e Vasil, 1989)

Nº Folhas e Região	m5C %	dG + dC(*) mol %	dA + dT mol %
3 Basal	38.5	48.0	52.0
3 Média	38.5	47.7	52.3
3 Topo	38.9	47.6	52.4
5 Basal	39.1	47.5	52.5
5 Média	39.1	47.5	52.5
5 Topo	39.8	47.3	52.7
7 Basal	40.0	48.1	51.9
7 Média	39.7	47.4	52.6
7 Topo	39.8	47.4	52.6
NE	34.0	47.6	52.4
E	34.6	47.8	52.2

(*) Inclui citosina metilada e não metilada

Trabalhos de Morish e Vasil (1989) com uma gramínea, a *Penisetum purpureum* Schum, mostraram que a diminuição da competência embriogénica em cultura de tecidos parece não estar ligada a uma alteração na metilação do DNA. A concentração por mole de desoxiribonucleotidos não varia de amostra para amostra. É possível que a competência das células seja controlada por mudanças no padrão de metilação, que não são detectáveis pelas técnicas usadas (Tabela 9).

Talvez o uso de sondas de DNA, nestes e noutros casos, possa levar a resultados mais conclusivos. No entanto, para mais pormenores, consultar o artigo de revisão bibliográfica de Schwartz (1991)

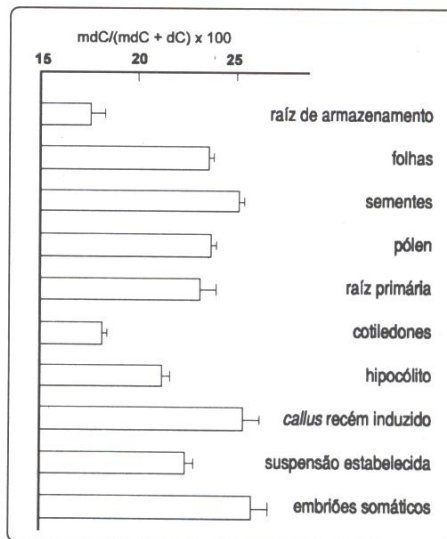


Fig. 18 - Níveis de metilação em vários tecidos de cenoura. A raiz de armazenamento e as folhas são de uma planta adulta com 5 meses; o pólen é comercial; os outros tecidos foram estabelecidos com sementes de uma determinada variedade. (Adaptado de Palmgren *et al.*, 1991)

4. Processos para a manutenção de um elevado potencial de enraizamento

Segundo Franclet (1983) podem-se obter verdadeiras réplicas vegetativas de árvores adultas quer usando células ou meristemas que se tenham mantido jovens na base da árvore quer suprimindo os determinantes da maturação dos tecidos meristemáticos ou das células.

Existem técnicas que podem ser empregues isolados ou em conjunto, o que possibilita a utilização de material adulto como base para a propagação vegetativa de material melhorado (Figura 19 e Tabela 10).

Consideram-se técnicas que permitem a mobilização da árvore dadora e a manipulação dos propágulos. Não serão considerados as técnicas que normalmente se empregam para melhorar qualidade do enraizamento (fertilização dos pés-mãe, regas, etc.).

Estas técnicas pretendem:

- i) Rejuvenescer (*) o material a propagar;
- ii) Desenvolver meristemas pré-formados, inibidos pelos meristemas apicais;
- iii) Suprimir os efeitos depressivos de eventuais inibidores endógenos.

Manipulação do Propágulo		Enxertia em série (Microenxertia)
		Enraizamento de estacas em série
		Cultura de tecidos

Mobilização da Planta dadora		Pulverização com Citocininas (e/ou inibidores do transporte polar da auxina)	
			Podas
			 Severas Suaves
		Corte da árvore etc.	

(*) O termo **rejuvenescer** é aqui empregue no sentido de reverter as características adultas para juvenis, o que não parece ser completamente conseguido por essas técnicas. Por isso o termo mais correcto será **revigorar**. Segundo Hackett (1985) o que distingue o revigoramento do rejuvenescimento é a estabilidade da característica readquirida, que no primeiro caso se não mantém.

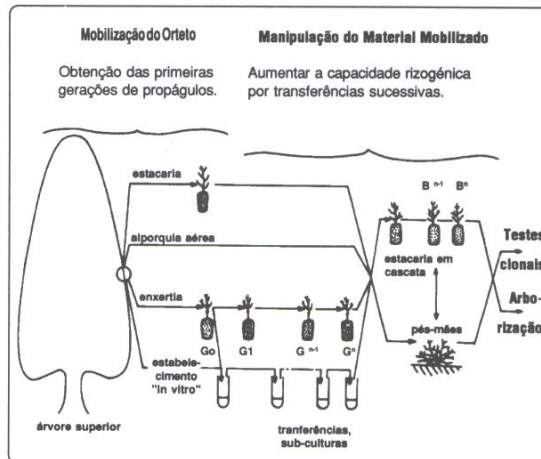


Fig. 19 - Técnicas de clonagem aplicáveis à *Sequoiadendron giganteum*. (Adaptado de Monteuis, 1984)

4.1. Manipulação do propágulo

Enxertia em série (microenxertia)

Esta técnica é efectuada em cavalos jovens, mantidos em estufa, sendo os garfos provenientes de árvores adultas, de preferência em repouso vegetativo; por isso, realiza-se no Inverno. Utiliza-se a técnica de fenda cheia terminal (Figura 20). Para evitar problemas de incompatibilidade, pode usar-se semente da própria árvore para obtenção dos cavalos.



Fig. 20 - Microenxertia - enxertia de fenda cheia terminal. (Adaptado de Cauvin e Marien, 1978)

Após o enxerto realizado, as plantas são mantidas em estufa e espera-se o início de desenvolvimento do garfo. Os sintomas de rejuvenescimento, que podem ser mais ou menos fugazes, são notados com muita facilidade, em espécies com marcado dimorfismo foliar (Figura 21). Mas, pode haver necessidade de se realizar esta enxertia, sucessivamente, mais do que uma vez (enxertia em série) até se conseguir esse objectivo. Franclet (1979) refere ter efectuado três microenxertias sucessivas, com dois meses de intervalo, antes de ter conseguido o efeito desejado em *Eucalyptus camaldulensis* Deuhl.

Depois de se conseguir um rejuvenescimento suficiente, com ou sem a utilização de outras técnicas, estabelece-se a planta como pé-mãe. A grande desvantagem deste método é ser bastante moroso, além de que podem surgir problemas de incompatibilidade entre o cavalo e o garfo.

Por isso, só é utilizado, quando não se possam usar outras técnicas de rejuvenescimento ou quando não se pode abater a árvore, nas espécies que rebentam de touça. Este processo foi aplicado a numerosas espécies, com sucesso: *Eucalyptus gunni* Hook. F. e *Eucalyptus dalrympleana* Maiden (Cauvin, 1981), *Eucalyptus camaldulensis* Dehul (Franclet, 1983), *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchholz (Monteuuis, 1984), etc.

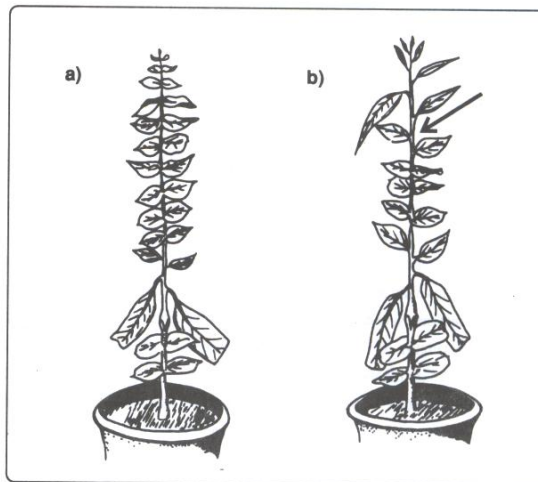


Fig. 21 - O garfo pode atingir formas juvenis duráveis, caso da *E. gunni* (a). Ou a duração da forma juvenil pode ser lábil (acima da seta pode observar-se o aparecimento de folhas adultas), caso da *E. dalrympleana* (b). (Adaptado de Cauvin, 1981)

Esta técnica foi inspirada nas experiências de Doorenbos (1953) com *Hedera helix* L., descritas por Franclet (1983). O investigador conseguiu obter um completo rejuvenescimento enxertando garfos adultos sem folhas, em cavalos jovens.

Paton *et al.* (1981) citado por Francllet (1983) tentou explicar o que aconteceu durante a indução do rejuvenescimento do garfo, proveniente de uma árvore adulta de *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden, pelo cavalo jovem. Para isso, usou como marcador bioquímico, o inibidor G (Paton *et al.*, 1970). Chegou à conclusão de que a influência que o cavalo exercia no garfo dependia da distância entre eles. Daí, a importância da miniaturização do cavalo e o nome desta enxertia (microenxertia). Este autor também demonstrou a importância do papel das folhas adultas na síntese de inibidores que induzem ou mantêm os meristemas maduros.

Enraizamento de estacas em série

Nesta técnica, não se distingue a planta-mãe das estacas destinadas à plantação. É uma técnica simples e econômica, perfeitamente adaptada a uma produção massal comercial. Após a primeira mobilização da planta dadora, obtém-se uma estaca enraizada que, por sua vez, irá dar origem a mais estacas enraizadas, aproveitando os seus ramos laterais. A estaca inicial segue para o seu destino (plantações ou testes clonais) o mesmo acontecendo às estacas originadas a partir dela (Figura 21). Desta maneira consegue-se obter rapidamente um elevado número de plantas do mesmo clone.

Por vezes, têm que ser aplicadas outras técnicas à planta dadora, como sejam a estimulação de rebentos de touça, podas severas, aplicação de citocininas, etc., pois nem sempre se consegue facilmente o enraizamento inicial. No entanto, o enraizamento de estacas em série é mais usado para propagação em massa do que propriamente para rejuvenescimento do material, que muitas vezes não é evidente (Chaperon, 1979).

Esta técnica tem sido usada por Kleinshmit na Alemanha para a *Picea abies* (L.) Karsten, com base em plantas com 4 anos. Embora se pense que não provoca um verdadeiro rejuvenescimento, atrasa o processo de maturação, conseguindo-se melhores percentagens de enraizamento e menos plantas com hábitos de crescimento plagiotrópicos. (Kleinshmit, 1985)

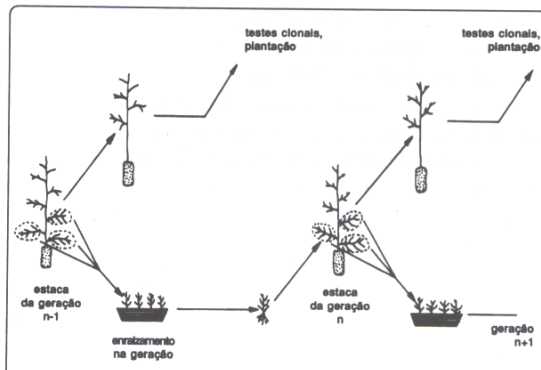


Fig. 22 - As estacas da geração n são retiradas das homólogas plantáveis, da geração n-1 e assim sucessivamente. (Adaptado de Monteuis *et al.*, 1986)

Cultura de tecidos (*)

Segundo Franclet (1982) as potencialidades da cultura de tecidos são muito interessantes, por um lado devido à miniaturização do *explant*, o que permite escolher e isolar os locais mais jovens da planta dadora e por outro lado pela possibilidade de manipular o ambiente exógeno (o fotoperíodo, a temperatura, a humidade, a composição do meio nutritivo, os reguladores de crescimento, etc.).

Esta técnica, antecedida ou não de outras, pode ser bastante bem sucedida na obtenção de plantas rejuvenescidas. Tem sido conseguido esse objectivo, mesmo em espécies muito recalcitrantes, como é o caso da *Pseudotsuga menziesii* (Mir.) Franco (Chalupa, 1977 citado por David, 1982), *Sequoia*

(*) Deveria dizer-se cultura de tecidos, células ou órgãos, mas na literatura este termo está consignado para designar isto tudo.

sempervirens (Lamb.) Endl. (Boulay, 1979), *Quercus suber* L. (Manzanera e Pardos, 1990; Romano e Loução, 1992), *Castanea* spp. (Sánchez e Vieitez, 1991), etc.

Devido ao decréscimo da capacidade morfogénica, não é geralmente possível aplicar ao material adulto os mesmos procedimentos desenvolvidos para o material juvenil; o primeiro tem, muitas vezes, problemas relacionados com contaminações e/ou libertação de fenóis. Por isso, pode ser necessário a aplicação de outras técnicas de rejuvenescimento à planta dadora e também o uso de *explants* específicos, a manipulação do ambiente exógeno e a utilização de subculturas sucessivas.

Boulay (1979) concluiu com base em estudos com rebentamento axilar de *Sequoia sempervirens* (Lamb.) Endl., que a origem do material tinha uma importância considerável. *Explants* retirados de árvores com mais de 20 anos não formavam gomos mas, se eram retirados de rebentos de touça a sua reactividade aumentava. Este estudo confirma a relação entre a capacidade organogénica e a idade fisiológica do *explant*. Também Sánchez e Vieitez (1991) referem o mesmo tipo de resultado, ou seja, que a posição do *explant* em árvores adultas de castanheiro, influencia a sua capacidade para formar órgãos.

David *et al.* (1980) retiraram gomos interfasciculares de estacas de árvores adultas de *Pinus pinaster* Aiton, que tinham sido pulverizadas com uma solução de citocinina. Houve formação de gomos adventícios em 32% dos *explants*. Foi confirmado, histologicamente, que ocorreu morfogénese.

Francllet (1979) conseguiu induzir um rejuvenescimento parcial em plantas com 15 e 75 anos de *Pseudotsuga menziesii* (Mir.) Franco, através de microenxertias em cascata, antes de estabelecer o material em cultura *in vitro*. O mesmo autor, juntamente com outros investigadores referencia, numa publicação de 1980, a regeneração *in vitro* de *Pinus pinaster* Aiton de 11 anos, com a utilização de ramos interfasciculares obtidos a partir de estacas enraizadas.

Segundo David (1982) a intensidade da resposta morfogénica que se obtém com a cultura *in vitro* depende do estado fisiológico e da idade da

planta dadora e da altura em que se retira o *explant*. Presumivelmente todo o material tem a mesma capacidade, independentemente da idade, mas nos *explants* retirados de árvores adultas, esse potencial permanece suprimido.

O mesmo autor refere que qualquer que seja o estado fisiológico ou idade da planta dadora é o grau de diferenciação de certas células que determina a sua capacidade morfogénica. A evolução de gomos para órgãos mais ou menos diferenciados sugere que tenham que se dar importantes modificações no comportamento das células.

Segundo Hackett (1985), embora existam evidências de que os meristemas maduros sejam bastante estáveis quer *in vivo* quer *in vitro*, as suas características podem ser modificadas como resultado da cultura de tecidos; tanto a duração como o número de subculturas parecem estar relacionadas com a intensidade das alterações que se pretendem realizar.

Talvez a cultura *in vitro* remova a maior parte das correlações internas, o que parece não ser no entanto suficiente para rejuvenescer completamente as células de *explants* provenientes de árvores adultas (David, 1982).

4.2. Mobilização da planta dadora

Poda (e abate da árvore)

É uma técnica utilizada em horticultura clássica, mas que pode ser efectuada com vários cambiantes. As podas, em árvores adultas, baseiam-se na reactivação de meristemas pré-formados e inibidos pelo crescimento dos meristemas apicais. A intensidade das podas é variável e pode ser levada ao extremo do abate da árvore, no caso das árvores que rebentam de touça.

Para a *Pinus radiata* D. Don. usa-se uma poda extremamente severa e repetida, por forma a que a árvore fique com porte arbustivo (*hedged tree*); o objectivo é manter a planta o mais perto possível do sistema radicular. Este método revela-se muito eficiente para obtenção de um elevado número de estacas de aspecto juvenil e com uma boa percentagem de enraizamento (Libby *et al.*, 1972).

O mesmo método está a ser testado em *Pinus caribaea* Mor. var *hondurensis* por Haines *et al.* (1989).

Francllet (1979) efectuou podas não tão severas em *Pinus* spp. adultos para a obtenção de ramos provenientes do desenvolvimento de gomos interfasciculares que se situam entre os pseudófilos (agulhas) dos braquiblastos (ramos curtos) designados, por isso, impropriamente de *braquiblastos*. O aspecto das agulhas dos *braquiblastos* é juvenil e a percentagem de enraizamento e plagiotropia é nitidamente melhorada, relativamente aos auxiblastos (ramos longos).

A poda não destrutiva de pés-mães como é o caso dos *Eucalyptus* spp. está vulgarizada, havendo a preocupação de manter toda a planta com aspecto inteiramente juvenil (Cauvin e Marien, 1978).

Hackett (1985) refere que, da análise de alguns estudos onde estes métodos foram aplicados não é possível a maior parte das vezes, distinguir entre rejuvenescimento parcial ou revigoração. Seria crucial a observação da estabilidade das características em causa, o que normalmente não é feito.

Francllet (1979) observa que esta técnica pode ser muito boa, se se usar posteriormente a enxertia ou cultura de tecidos, para reforçar o rejuvenescimento ontogénico.

O abate da árvore é muito utilizado nas espécies que rebentam de touça. Por isso, é frequente no género *Eucalyptus* (Cauvin e Marien, 1978 ; Hartney, 1980; Zobel e Ikemori, 1983) podendo ser aplicado aos géneros *Quercus* e *Platanus* e também à espécie *Sequoia sempervirens* (Francllet, 1983). Tem a desvantagem de destruir a planta dadora.

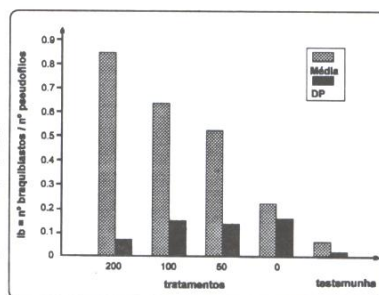
Aplicação de citocininas

A aplicação de citocininas também estimula o desenvolvimento de gomos axilares, pré-formados e inibidos pelo crescimento da árvore. Em coníferas a aplicação de citocinina, usualmente BAP (benzilaminopurina), em material adulto com ou sem remoção do gomo apical, estimula o desenvolvimento de gomos interfasciculares com características juvenis (Whitehill e Schwabe, 1975; Bouriquet *et al.*, 1984).

Na espécie *Pinus pinaster* Aiton Franclet (1983) estimulou o aparecimento de *braquiblastos* numa árvore com 80 anos para posterior enxertia. O autor, com uma colaboradora, pulverizando com uma solução de 200 mg/l de BAP, plantas de um ano e meio de idade, conseguiram, em média, o aparecimento de *braquiblastos* em 85% dos pseudófilos (Figura 23).

Noutras espécies, tais como a *Quercus suber* L. usou-se BAP para induzir a brotação axilar (Toribio, 1986). Mazalewski e Hackett (1979) pulverizaram com citocininas a base de árvores adultas de *Eucalyptus ficifolia* F. Mull., e conseguiram obter rebentos epicórnicos de aspecto juvenil. Pereira *et al.* (1984) estimularam dessa forma a rebentação de touça em árvores, também adultas, de *Eucalyptus globulus labill.*, quando decapitadas na Primavera.

Fig. 23 - Efeito da concentração de BAP (mg/l) no nº de gomos interfasciculares formados por pseudófilo, em *Pinus pinaster* Ait. (Adaptado de Ribeiro e Antunes, 1991).



Tem sido referido, como grande desvantagem, um efeito fitotóxico, que parece estar relacionado com o solvente utilizado (Mazalewsky e Hackett, 1979; Evers *et al.*, 1986) mas esse efeito, não foi verificado por Ribeiro e Antunes (1991).

De qualquer maneira, este método parece ser bastante interessante, para a obtenção de material em boas condições para ser propagado, desde que a seguir se utilize outro: estacaria, enxertia, cultura de tecidos, etc..

Tabela 10 - Alguns exemplos da utilização da propagação vegetativa em espécies florestais.

Espécie	Método usado	País
<i>Pinus radiata</i>	Podas intensas de árvores adultas, seguido de estacaria	E.U.A. Austrália (Libby <i>et al.</i> , 1972) Nova Zelândia (Thulin e Faulds, 1968)
<i>Picea abies</i>	Estacaria em série de plantas com 4 anos	Alemanha (Kleinschmit, 1985)
<i>Picea sitckensis</i>	Estacaria em série de plantas com 2 anos	Grã-Bretanha (Mason e Gill, 1986)
<i>Pinus pinaster</i>	Poda de árvores adultas - estacaria de "braquiblastos" - enxertia - cultura de tecidos	França (Franclet, 1977 e 1980a) (David, 1980)
<i>Eucalyptus globulus</i>	Abate de árvores adultas e enraizamento de estacas a partir dos rebentos de touça	Portugal PORTUCEL (*) CELBI
<i>Eucalyptus grandis</i>	Abate de árvores adultas e enraizamento de estacas a partir dos rebentos de touça	Brasil (Zobel e Ikemori, 1983)

(*) Comunicações pessoais

5. Nota final

A perda da capacidade para formar raízes adventícias com a idade ontogénica limita profundamente o sucesso da propagação vegetativa de árvores adultas.

As razões para a diminuição do potencial de enraizamento são pouco compreendidas. Existem grandes variações na capacidade de enraizamento intra e interespecífica.

Vários procedimentos são usados, para possibilitar a propagação vegetativa de árvores recalcitrantes: podas severas, enxertia de garfos adultos em cavalos jovens, utilização de subculturas em série de *explants* provenientes de árvores adultas, estacaria em série, etc. (Tabela 10).

Supõe-se que as podas severas retardam o avanço da maturação, ao nível dos nós onde se formam os ramos e pensa-se que os outros métodos revertem, parcialmente, a maturação tendo como resultado um aumento no potencial de enraizamento. Não quer isso dizer, contudo, que o estado mais juvenil que se atingiu seja verdadeiro para outras características, como por exemplo a floração (Hackett, 1988).

Segundo Greenwood (1986), deveria comparar-se a evolução da maturação em plantas provenientes de semente e plantas rejuvenescidas

e, se possível, caracterizar o processo a nível fisiológico e molecular.

Existem já algumas indicações de que se está a avançar no caminho certo. Um bom exemplo foi a recente determinação de uma proteína - J16 - marcadora da juvenilidade em *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchholz (Bon, 1991) ou então a já mais antiga descoberta de um composto G em *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden inibidor do enraizamento e ocorrendo em altas concentrações em tecidos adultos (Paton *et al.*, 1970).

6. Bibliografia

- AFOCEL (ed.) (1982). **Culture de Biomasse Ligneuse: Taillis à Courte Rotation**. Nangis, France.
- Antunes, M.A. (1990). **Ensaio de Propagação Vegetativa em *Pinus pinaster* Aiton**. Relatório de Fim de Curso de Produção Florestal, Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Castelo Branco.
- Bon, M.C. (1991). Rejuvenation of a 100-year-old *Sequoiadendron giganteum* through in vitro Meristem Culture. II. Biochemical arguments. **Physiol. Plant.**, 88:116-120.
- Bonga, J.M. (1982). Vegetative Propagation in Relation to Juvenility, Maturity and Rejuvenation. In J.M. Bonga, D.J. Durzan, Eds., **Tissue Culture in Forestry**, pp. 387-412. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht.
- Boulay M. (1979). Multiplication et Clonage Rapide du *Sequoia Sempervirens* par la Culture *in vitro*. **Études et Recherches**, 12:49-55.
- Bouriquet, R.; Tsogas, M.; Blaselle, A. (1984). Essai de Rajeunissement de l'Épicea par les Cytocinines. **Annales des Recherches Sylvicoles**, pp.173-185.

- Burdon, R.D.; Shelbourne, C.J. (1974). The Use of Vegetative Propagules for Obtaining Genetic Information. *N. Z. J. For. Sci.*, 4(2):418-425.
- (1982). The Roles and Optimal Place of Vegetative Propagation in Tree Breeding Strategies. *In Proc. of the IUFRO Joint Meet. of Work. Part. on Gen. about Bree. Strat. Incl. Multiclonal Var.. Sensenstein, 6-10 September*, pp.66-83, Lower Saxony For. Res. Inst., Esherde.
- Cauvin, B.; Marien, J.N. (1978). La multiplication Vegetative des Eucalyptus en France. *Annales des Recherches Sylvicoles*, pp.141-175.
- (1981). Réjuvénalisation, Multiplication d'Ortets Séniles-Eucalyptus-. *Annales des Recherches Sylvicoles*, pp.73-105.
- Chaperon, H.; Quillet, G. (1977). Results des Travaux sur le Bouturage des Eucalyptus au Congo-Brazzaville. *In: Third World Consultation on Forest Tree Breeding, Canberra, 21-26 March*, 2:835-855, FAO/IUFRO, Canberra.
- David, A.; David H.; Mateille T.; Jarlet, E. (1980). Bourgeoisement Adventif *In Vitro* sur des Cotilédon et Aiguilles de Pin Maritime (*Pinus pinaster* Sol.). *Annales des Recherches Sylvicoles*, pp.43-55.
- (1982). *In Vitro* Propagation of Angiosperms. *In J.M. Bonga, D.J. Durzan, Eds., Tissue Culture in Forestry*, pp.72-108. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht.
- Direcção Geral das Florestas (ed.) (1992). *Le Portugal Pays des Forêts*. Lisboa.
- Direcção Geral das Florestas (ed.) (1993). Distribuição da Floresta em Portugal Continental-Áreas Florestais por Distrito. *Estudos e Informação*, 303.
- Doerfler, W. (1983). DNA Methylation and Gene Activity. *Ann. Rev. Biochem.*, 52:93-124.
- Evers, P.; Donkers, J.; Pratt, A.; Veermer, E. (1986). *Micropropagation of Forest Trees Through Tissue Culture*. Dorschkamp Res. Inst. for For. and Land. Plan., Wageningen.
- Francllet, A. (1977). Manipulation des Pieds-Mères et Amélioration de la Qualité des Boutures. *Études et Recherches*, 8.

- Francllet, A. (1979). Rajeunissement des Arbres Adultes en Vue de leur Propagation Vegetative. *Études et Recherches*, 12:3-18.
- (1980a). Rajeunissement et Propagation Vegetative des Ligneux. *Annales des Recherches Sylvicoles*, pp.11-41.
- ; David A.; David H.; Boulay M. (1980b). Première Mise en Évidence Morphologique d'un Rajeunissement de Méristèmes Primaires Caulinaires de Pin Maritime Âgé (*Pinus pinaster* Sol.). *C. R. Acad. Sc. Paris*, 290:927-930.
- (1982). Rajeunissement et Micropropagation des Ligneux. In *Proc. IUFRO Int. Workshop In Vitro Cultivation For. Tree Species*, pp.55-64. Fointanebleau.
- (1983). Rejuvenation: Theory and Pratical Experiences in Clonal Silviculture. In *Proc. 19th Meet. Can. Tree Impro. Asso., Toronto, 22-26 August*, pp.96-134. Toronto.
- Gomes A. L. (1987). *Propagação Clonal: Princípios e Particularidades*. Univ.Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Greenwood, M.S. (1986). Rejuvenation in Forest Trees. In S.V. Kossuth, S.D. Ross, Eds., *Homonal Control of Tree Growth*, pp. 1-12, Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht
- ; Hopper C.A.; Hutchinson K.W. (1989). Maturation in Larch. I. Effect of Age on Shoot Growth, foliar Characteristics, and DNA Methylation. *Plant. Physiol.*, 90:406-412.
- Grueunbaum, Y.; Cedar, H.; Razin, A. (1982). Substrate and Sequence Specificity of EuKariotic DNA Methylase. *Nature*, 295:620-622.
- Hackett, W.P. (1983). Phase Change and Intra-Clonal Variability. *Hortscience*, 18(6):840- 844.
- (1985). Juvenelity, Maturation and Rejuvenation in Woody Plants. *Hortic. Revue*, 7:109-155.
- (1988). Donor Plant Maturation and Adventitious Root Formation. In T. D. Davis, B.E. Haissig, N. Sankhla, Eds., *Adventitious Root Formation in Cuttings*, 2:11-28, Dioscorides Press, Portland.

- Haines, R.J.; Walker, S.M.; Copley, T.R. (1989). The Effect of Decapitation and Heavy Pruning of Ortets on the Subsequent Rooting of Cuttings of *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. In **Proc. Breed. Trop. Trees: Pop. Strut. and Gen. Impro. Strat. in Clon. and Seedl. For., Pattaya, November 1988**, pp.437-438, Pattaya.
- Hartney, V. J. (1980). Vegetative Propagation of Eucalyptus. **Aust. For. Res.**, 10:191-211.
- Holliday, R.; Pugh, J.E. (1975). DNA Modification Mecanisms and Gene Activity During Development. **Science**, 187:226-232.
- (1987). X-Cromossome Reactivation. **Nature**, 36:661-662.
- (1989). A Different Kind of Inheritance. **Scientific American**, Junho, pp.40-48.
- Instituto dos Produtos Florestais (ed.) (1988). **Perfil Florestal**, Lisboa.
- Kleinshmit, J. (1977). Problems of Vegetative Reproduction. In **Third World Consultation on Forest Tree Breeding, Canberra, 21-26 March**, pp.1-10, FAO/IUFRO, Canberra.
- (1983). Concepts and Experiences in Clonal Plantation of Conifers. In: **Proc. 19th Meet. Can.Tree Impro. Asso., Toronto, 22-26 August**, pp.26-56, Toronto.
- (1985). Juvenility and Serial Vegetative Propagation of Norway Spruce Clones (*Picea abies* Karst.). **Silvae Genetica**, 34(1):42-48.
- Krenke, N.P. (1940). The Theory of the Cycle of Senescence and Rejuvenation of Plants and its Pratical Application. **Plant. Breed. Abstr.**, 15:1-135 (181).
- Libby, W.J.; Brown, A.G.; Fielding, J.M. (1972). Effects of Hedging Radiata Pine on Production, Rooting, and Early Growth of Cuttings. **N. Z. J. For. Sci.**, 2(2):263-283.
- (1983). Potencial of Clonal Forestry. In **Proc. 19th Meet. Can.Tree Impro. Asso., Toronto, 22-26 August**, pp.1-11, Toronto.
- Manzanera, J.A.; Pardos, J.A. (1990). Micropropagation of Juvenile and Adult *Quercus suber* L. **Pant Cell, Tiss. and Org. Cul.**, 21:1-8.

- Martin, B.; Pratt, D. (1985). Biotechnologie et Forêt: Quelle Place pour la Foresterie Clonale ?. **Biofutur**, pp.1-9.
- Mason, W.S.; Gill, J.G.S. (1986). Vegetative Propagation of Conifers as a Means of Intensifying Wood Production in Britain **Forestry**, 59(2):155-172.
- Mazalewski, R.L.; Hackett, W.P. (1979). Cutting Propagation of *Eucalyptus ficifolia* Using Cytokinin-induced Basal Trunk Shoots. **Int. Plant. Prop. Soc.**, 29:118-125.
- Monteuuis, O. (1984). La Multiplication Végétative du Sequoia Geant en Vue du Clonage. **Annales des Recherches Sylvicoles**, pp.140-171.
- ; Pages, C.; Sarran, P. (1986). De L'Amélioration des Conditions de Bouturage en Cascade du Sequoia Sempervirens. **Annales des Recherches Sylvicoles**, pp.113-131.
- (1988). Méristèmes, Vieillessement et Clonage d'Arbres Forestiers. **Annales des Recherches Sylvicoles**, pp.6-39.
- (1989). Maturation Concept and Possible Rejuvenation of Arborescent Species. Limits and Promises of Shoot Apical Meristems to Ensure Successful Cloning. In **Proc. Breed. Trop. Trees: Popula. Strut. and Gen. Impro. Strat. in Clon. and Seedl. For.**, Pattaya, November 1988, pp.106-118, Pattaya.
- Morish, F.M.; Vasil, I.K. (1989). DNA Methylation and Embryogenic Competence in Leaves and Callus of Napiergrass (*Penisetum purpureum* Schum.). **Plant Physiol.**, 90:37-40.
- Oleson, P.O. (1978). On Cyclophysis and Topophysis. **Silvae Genetica**, 27(5):173-178.
- Palmgren, G.; Mattsson, O.; Okkels, F.T. (1991). Specific Levels of DNA Methylation in Various Tissues, Cell Lines, and Cell Types of *Daucus carota*. **Plant. Physiol.**, 95:174-178.
- Paton, D.M.; Willing, R.R.; Nicholls, W.; Pryor, L.D. (1970). Rooting of Stem Cuttings of *Eucalyptus*: a Rooting Inhibitor in Adult Tissues. **Aust. J. Bot.**, 18:175-183.

- Pereira, J.S.; Almeida I.; Esquivel, M.G.; Novais, M.C.; Santos R.M. (1984). Annual Variation in Sprouting Capacity of Stumps of Coppiced *Eucalyptus globulus*. In H. Ågneus, A. Ellegard, Eds., **Bioenergy 84, Biomass Resources**, 2:127-131, Elsevier Appl. Sci. Publ., London.
- Rauter, R.M. (1983). Current Status of Macropropagation. In **Proc. 19th Meet. Can. Tree Impro. Asso., Toronto, 22-26 August**, pp.58-74, Toronto.
- REOTA ed. (1987). **Relatório do Estado do Ambiente e Ordenamento do Território**, Ministério do Planeamento e da Administração do Território, Lisboa.
- Ribeiro, M.M.; Antunes, M.A. (1991). Estimulação do Desenvolvimento de Gomos Interfasciculares na *Pinus pinaster* Aiton com Aplicação de Benziladenina. In **Encontro sobre Pinheiro Bravo, Material Lenhoso e Resina, Coimbra, 5-6 Dezembro**, pp. 89-100, Soc. Port. Ciências Flor., Coimbra.
- Romano A.; Loução M.A. (1992). Micropropagation of Mature Cork Oak (*Quercus suber* L.): Establishment Problems. **Scientia gerundensis**, 18:17-27.
- Roulund, H. (1975). The Effect of the Cyclophysis and Thopophysis on the Rooting and Behaviour of Norway Spruce Cuttings. **Acta Horticulturae**, 54:39-50.
- Sánchez, M.C.; Vieitez, A.M. (1991). *In vitro* Morphogenic Competence of Basal Sprouts and Crown Branches of Mature Chestnut. **Tree Physiology**, 8:59-70.
- Schwartz, H.D. (1991). Post Culture Behavior: Genetic and Epigenetic Effects and Related Problems. In P.C. Debergh, R.H. Zimmerman Eds., **Micropropagation, Technology and Application**, pp. 95-121, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.
- Thulin, I.J.; Faulds, T. (1968). The Use of Cuttings in the Breeding and Afforestation of *Pinus radiata*. **N. Z. Journal of Forestry**, 13(1):66-77.

- Torbio, M. (1986). Rejuvenescimiento de Tejidos de Especies Leñosas. Induction de la Brotation en *Quercus suber* L. In **1º Congresso Florestal Nacional, Lisboa, 2-6 Dezembro**, pp.124-127, Soc. Port. Ciências Flor., Lisboa.
- Wareing, P.F. (1987). Phase Change and Vegetative Propagation. In A.J. Abbott, R.K. Atkin, Eds., **Improving Vegetatively Propagated Crops**, pp.263-270, Academic Press, New York.
- Whitehill, S.J.; Schwabe, W.W. (1975). Vegetative Propagation of *Pinus sylvestris*. **Physiol.Plant.**, 35:66-71.
- Zobel, B.; Ikemori Y. K. (1983) vegetative propagation of Eucalyptus. In **Proc 19th Int. Conf. Tree Improv. Asso., Toronto, 22-26 August**, pp 136-144, Toronto.
- Zobel, B.; Talbert, J. (1984). **Applied Forest Tree Improvement**, John Wiley & Sons, New York.