**CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE GEMAS NA
MULTIPLICAÇÃO DE *Eucalyptus* SPP. *IN VITRO*
EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO E SÓLIDO**

DIVA CORREIA

Bióloga

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

**Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências - Área de concentração:
Ciências Florestais**

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Outubro/1993

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

Correia, Diva

C824d Crescimento e desenvolvimento de gemas na multioli-
cação de *Eucalyptus* spp. *in vitro* em meio de cultura
líquido e sólido. Piracicaba. 1993.
113p. ilus.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Clone de eucalipto - Desenvolvimento - Avalia-
ção
2. Clone de eucalipto - Propagação *in vitro*
3. Eucalipto - Produção l. Escola Superior de Agricul-
tura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 634.9734

**CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE GEMAS NA
MULTIPLICAÇÃO DE *Eucalyptus* SPP. IN VITRO
EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO E SÓLIDO**

DIVA CORREIA

Aprovada em: 10/11/93

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES	ESALQ/USP
Prof. Dr. HILTON THADEU ZARATE DO COUTO	ESALQ/USP
Prof. Dr. MARIA LÚCIA CARNEIRO VIEIRA	ESALQ/USP

Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

Verdade

Justiça

Utilidade

Beleza

*A Deus pela presença, generosidade e pelo dom da
coragem de sempre recomeçar.*

*Aos meus pais Domingos e Luiza pela dedicação de suas
vidas a minha formação pessoal e pelo respeito e
liberdade a minha vida.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Antonio Natal Gonçalves, pela amizade e orientação em todas as fases desse trabalho;

Ao Professor Hilton Thadeu Zarate do Couto pela amizade, orientação na análise estatística e sugestões apresentadas ao trabalho;

Ao professor Mário Ferreira pelo carinho, atenção e informações oferecidas ao trabalho;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico pela concessão da bolsa de estudos;

A Champion Papel e Celulose Ltda, na pessoa do Diretor de Recursos Naturais Engenheiro Florestal Manuel de Freitas pela confiança e oportunidade da realização do trabalho nessa empresa;

À equipe do laboratório de micropropagação da Chamflora Agrícola Ltda: Antonia Moroni, Fátima Correa, Luzia de Fátima Manzarini, Helena Vicentin, Regeane Gabriel, pela amizade, convivência e aprendizado recíproco, em especial a Lúcia Balbino de Moraes pela eficiência e colaboração na instalação dos experimentos;

Ao Engenheiro Florestal Benedito Vastano Júnior da Champion Papel e Celulose Ltda pelo auxílio na correção e sugestões à dissertação;

Aos pesquisadores e amigos Juan Alfonso Rodrigues Ataíde e Sílvia Cristina Vetorazzo pela colaboração e entusiasmo no estudo preliminar;

Aos responsáveis pelo Setor de Biotecnologia das Empresas - Acesita Florestal S.A., Aracruz Florestal S.A., Cenibra Florestal S.A., Champion Papel e Celulose Ltda, Duraflora, Klabin Fabricadora de Papel e Celulose S.A., Riocell S.A. e Cia Suzano pelas importantes informações gentilmente atendidas e disponíveis nesse trabalho;

Ao técnico de informática Milton Cezar Ribeiro, pela amizade e eficientes serviços de digitação e composição da dissertação;

À amiga Vanda Barbosa dos Reis Toth pelo companheirismo;

Aos amigos do curso: Antonio Sanchez Martinez, Maria Cecília Barbosa de Toledo, Neiva Maria R. Guedes e Luiz Moro pelo respeito, companheirismo e aprendizado;

Para todos, meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xviii
Resumo	xix
Summary	xxii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. <i>Eucalyptus grandis</i> Hill ex Maiden e híbridos desta espécie com <i>Eucalyptus urophylla</i> S.T. Blake.....	5
2.2. Micropropagação	6
2.3. Micropropagação de <i>Eucalyptus grandis</i>	8
2.3.1. Cultura de órgão	8
2.3.1.1. Fonte de material e estabele- cimento <i>in vitro</i>	8
2.3.1.2. Multiplicação de gemas	10
2.3.1.3. Alongamento de brotações	11
2.3.1.4. Enraizamento de brotações e potencialidade para o reju- venescimento <i>in vitro</i>	13
2.3.1.4.1. Fatores que influ- enciam no enraiza- mento de brotações <i>in vitro</i> proveni- entes de material adulto.....	14
2.3.2. Meio de cultura	15
2.4. Produtividade <i>in vitro</i>	16
2.5. Crescimento <i>in vitro</i>	17
2.6. Aplicação de meio de cultura líquido na mi- cropropagação de essências arbóreas	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Árvores matrizes	21

3.1.1. Experimento I	21
3.1.2. Experimento II	21
3.1.3. Experimento III	22
3.1.4. Experimento IV	22
3.1.5. Caracterização das árvores matrizes através dos frutos	22
3.2. Fonte e preparo dos explantes	22
3.3. Estabelecimento das culturas e multiplicação das gemas <i>in vitro</i>	25
3.4. Meio de cultura JADS	26
3.5. Preparo dos meios de cultura JADS sólido e líquido	27
3.6. Desenvolvimento dos experimentos, caracterís- ticas do explante-padrão e condições de cres- cimento das culturas	27
3.7. Experimentos realizados	28
3.7.1. Experimento I - Influência do meio de cultura JADS líquido e sólido no cres- cimento e desenvolvimento de gemas de clones de <i>E.grandis</i> , na 20ª subcultura	28
3.7.2. Experimento II - Influência do meio de cultura JADS líquido e sólido no cres- cimento e desenvolvimento de gemas de clones de híbridos de <i>E.grandis</i> x <i>E.</i> <i>uropylla</i> , na 20ª subcultura	29
3.7.3. Experimento III - Influência do meio de cultura JADS líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de ge- mas de um clone de híbrido de <i>E.</i> <i>urophylla</i> x <i>E.grandis</i> , na 20ª subcultura	29
3.7.4. Experimento IV - Influência do meio de cultura JADS bifásico no crescimento e desenvolvimento de gemas de clones de <i>E.grandis</i> (G2 e G5), na 40ª sub- cultura.....	29

3.8. Taxa de crescimento relativo	31
3.9. Análises estatísticas	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. EXPERIMENTO I: Influência do meio de cultura JADS líquido e sólido no crescimento e desen- volvimento de gemas de clones de <i>E.grandis</i> , na 20ª subcultura	33
4.2. EXPERIMENTO II: Influência do meio de cultura JADS líquido e sólido no crescimento e desen- volvimento de gemas de clones de híbridos de <i>E.grandis</i> x <i>E.urophylla</i> , na 20ª subcultura ...	46
4.3. EXPERIMENTO III: Influência do meio de cultura JADS líquido e sólido no crescimento e desen- volvimento de gemas de um clone de híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.grandis</i> , na 20ª subcultura ..	57
4.4. EXPERIMENTO IV: Influência do meio de cultura JADS bifásico no crescimento e desenvolvimento de gemas de clones de <i>E.grandis</i> (G2 e G5), na 40ª subcultura	63
4.4.1. Número total de brotações dos clones de <i>E. grandis</i> (G2 e G5) na fase de multi- plicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico.....	78
4.4.2. Distribuição em classes de altura do número de brotações de clones de <i>E.</i> <i>grandis</i> (G2 e G5) na fase de multipli- cação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico.....	83
5. CONCLUSÕES	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
7. APÊNDICE	100

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação esquemática do crescimento celular	18
Figura 2. Produção de matéria fresca de clones de <i>E.grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura	40
Figura 3. Produção de matéria seca de clones de <i>E.grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura.....	41
Figura 4. Produção de matéria fresca de clones de <i>E.grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS líquido durante 42 dias de cultura.	43
Figura 5. Produção de matéria seca de clones de <i>E.grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS líquido durante 42 dias de cultura.	44
Figura 6. Produção de matéria fresca de clones de <i>E.grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS sólido durante 42 dias de cultura..	44
Figura 7. Produção de matéria seca de clones de <i>E.grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS sólido durante 42 dias de cultura..	45
Figura 8. Produção de matéria fresca de clones de híbridos de <i>E.grandis</i> x <i>E.urophylla</i> cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura.....	51

- Figura 9. Produção de matéria seca de clones de híbridos de *E.grandis* x *E.urophylla* cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura..... 52
- Figura 10. Produção de matéria fresca de clones de híbridos de *E.grandis* x *E.urophylla* cultivados em meio de cultura JADS sólido durante 42 dias de cultura..... 54
- Figura 11. Produção de matéria seca de clones de híbridos de *E.grandis* x *E.urophylla* cultivados em meio de cultura JADS sólido durante 42 dias de cultura..... 55
- Figura 12. Produção de matéria fresca de clones de híbridos de *E.grandis* x *E.urophylla* cultivados em meio de cultura JADS líquido durante 42 dias de cultura..... 55
- Figura 13. Produção de matéria seca de clones de híbridos de *E.grandis* x *E.urophylla* cultivados em meio de cultura JADS líquido durante 42 dias de cultura..... 56
- Figura 14. Produção de matéria fresca de um clone de híbrido de *E.urophylla* x *E.grandis* cultivado em meio de cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura.. 62
- Figura 15. Produção de matéria seca de um clone de híbrido de *E.urophylla* x *E.grandis* cultivado em meio de cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura..... 62

- Figura 16. Porcentagens da produção de matéria fresca e seca de clones de *E.grandis* (G2 e G5) obtidas em meio de cultura JADS bifásico aos 35 dias de cultura..... 69
- Figura 17. Produção de matéria fresca do clone de *E.grandis* (G2) cultivado em meio de cultura JADS bifásico durante 35 dias de cultura..... 73
- Figura 18. Produção de matéria seca do clone de *E.grandis* (G2) cultivado em meio de cultura JADS bifásico durante 35 dias de cultura..... 74
- Figura 19. Produção de matéria fresca do clone de *E.grandis* (G5) cultivado em meio cultura JADS bifásico durante 35 dias de cultura..... 74
- Figura 20. Produção de matéria seca do clone de *E.grandis* (G5) cultivado em meio de cultura JADS bifásico durante 35 dias de cultura..... 75
- Figura 21. Características da fase de multiplicação de gemas do clone de *E.grandis* (G2) cultivado em meio de cultura JADS bifásico em diferentes tratamentos durante 35 dias de cultura..... 76
- Figura 22. Características da fase de multiplicação de gemas do clone de *E.grandis* (G5) cultivado em meio de cultura JADS bifásico em diferentes tratamentos durante 35 dias de cultura..... 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Número de plantas micropropagadas de <i>Eucalyptus</i> spp. existentes em campo e localizadas em vários Estados do Brasil.	03
Tabela 2.	Caracterização das árvores matrizes através dos frutos.....	23
Tabela 3.	Meio de cultura JADS (1989).....	26
Tabela 4.	Resumo das análises de variância para PMF e PMS de clones de <i>E.grandis</i> na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido e avaliadas a cada 7 dias durante 42 dias de cultura.....	33
Tabela 5.	Valores médios obtidos para PMF e PMS de clones de <i>E.grandis</i> na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura.....	35
Tabela 6.	Valores médios para PMF e PMS de clones de <i>E.grandis</i> na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido.....	36
Tabela 7.	Taxas de crescimento relativo médio para a PMS de clones de <i>E.grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido obtidas a cada 7 dias, durante 42 dias de cultura.....	38

Tabela 8. Resumo das análises de variância para PMF e PMS de clones de híbridos de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido avaliadas a cada 7 dias durante 42 dias de cultura	46
Tabela 9. Valores médios obtidos para PMF e PMS de clones de híbridos de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura.....	48
Tabela 10. Valores médios para PMF e PMS de clones de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido...	49
Tabela 11. Taxas de crescimento relativo médio para PMS de clones de híbridos de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido, obtidas a cada 7 dias durante 42 dias de cultura..	50
Tabela 12. Resumo das análises de variância para PMF e PMS de um clone de híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> na fase de multiplicação de gemas cultivado em meio de cultura JADS líquido e sólido avaliadas a cada 7 dias durante 42 dias de cultura	57

Tabela 13. Valores médios obtidos para PMF e PMS de um clone de híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.grandis</i> na fase de multiplicação cultivado em meio de cultura JADS líquido e sólido.....	59
Tabela 14. Taxas de crescimento relativo médio para PMS de um clone de híbrido de <i>E.urophylla</i> x <i>E.grandis</i> cultivado em meio de cultura JADS líquido e sólido a cada 7 dias durante 42 dias de cultura.....	60
Tabela 15. Resumo da análise de variância para PMF de clones de <i>E.grandis</i> (G2 e G5), na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico avaliadas a cada 7 dias durante 35 dias de cultura.....	63
Tabela 16. Resumo da análise de variância para PMS de clones de <i>E.grandis</i> (G2 e G5), na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico avaliadas a cada 7 dias durante 35 dias de cultura.....	64
Tabela 17. Valores médios da PMF e PMS de clones de <i>E.grandis</i> (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico avaliadas a cada 7 dias durante 35 dias de cultura.....	66

Tabela 18. Valores médios da PMF e PMS de clones de <i>E.grandis</i> (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico avaliadas a cada 7 dias durante 35 dias de cultura.....	67
Tabela 19. Taxas de crescimento relativo médio para PMS de clones de <i>E.grandis</i> (G2 e G5) cultivados em meio de cultura JADS bifásico obtidas a cada 7 dias durante 35 dias de cultura.....	70
Tabela 20. Produções de matéria seca obtidas e estimadas de clone de <i>E.grandis</i> (G2 e G5) cultivados em meio de cultura JADS bifásico	71
Tabela 21. Resumo da análise de variância para o número total de brotações de clones <i>E. grandis</i> (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico avaliados no 14º, 21º, 28º e 35º dia de cultura.....	78
Tabela 22. Valores médios para número total de brotações dos clones de <i>E.grandis</i> (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico avaliados no 14º, 21º, 28º e 35º dia de cultura.....	80

Tabela 23. Valores médios para número total de brotações dos clones <i>E.grandis</i> (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados no meio de cultura JADS bifásico avaliados no 14º, 21º, 28º e 35º dia de cultura.....	81
Tabela 24a. Resumo da análise de variância do número de brotações dos clones <i>E.grandis</i> (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico com altura $\leq 0,5$ cm, $> 0,5$ a 1,0 cm e $> 1,0$ a 1,5 cm avaliados no 14º e 21º dia de cultura.....	84
Tabela 24b. Resumo da análise de variância do número de brotações dos clones de <i>E.grandis</i> (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico com altura $\leq 0,5$ cm, $> 0,5$ a 1,0 cm e $> 1,0$ a 1,5 cm avaliados no 28º e 35º dia de cultura.....	84
Tabela 25a. Valores médios para o número de brotações dos clones <i>E.grandis</i> (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico com altura $\leq 0,5$ cm, $> 0,5$ a 1,0 cm e $> 1,0$ a 1,5 cm avaliados no 14º e 21º dia de cultura.....	86

Tabela 25b.Valores médios para o número de brotações dos clones <i>E.grandis</i> (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico com altura $\leq 0,5$ cm, $>0,5$ a $1,0$ cm e $>1,0$ a $1,5$ cm avaliados no 28º e 35º dia de cultura.....	86
---	----

Tabela 26a.Valores médios para o número de brotações dos clones de <i>E.grandis</i> (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico com altura $\leq 0,5$ cm, $>0,5$ a $1,0$ cm e $>1,0$ a $1,5$ cm avaliados no 14º e 21º dia de cultura.....	88
--	----

Tabela 26b.Valores médios para o número das brotações dos clones de <i>E.grandis</i> (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico com altura $\leq 0,5$ cm, $>0,5$ a $1,0$ cm e $>1,0$ a $1,5$ cm avaliados no 28º e 35º dia de cultura.....	89
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	:	Ácido indol acético
AIB	:	Ácido indol butírico
ANA	:	Ácido naftaleno acético
BAP	:	6-Benzilaminopurina
2-IP	:	6(Γ-Γ-dimetilamino purina)
GA ₃	:	Ácido giberélico
PMF	:	Produção de matéria fresca
PMS	:	Produção de matéria seca
V/V	:	Volume/Volume
P/V	:	Peso/Volume

CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE GEMAS NA
MULTIPLICAÇÃO DE *Eucalyptus* SPP. "IN VITRO"
EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO E SÓLIDO

Autora: DIVA CORREIA

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar semanalmente o crescimento e desenvolvimento de gemas de clones de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, de *E. grandis* x *E. urophylla* e de *E. urophylla* x *E. grandis* em meio de cultura líquido e sólido na fase de multiplicação durante 42 dias de cultura; e 2) avaliar semanalmente o crescimento e desenvolvimento de gemas de dois clones de *E. grandis* em meio de cultura bifásico (sólido + líquido) com acréscimos semanais de meio de cultura líquido, na fase de multiplicação, durante 35 dias de cultura.

O estabelecimento da cultura *in vitro* dos clones foi realizada com segmentos nodais coletados de ramos de árvores no campo e/ou de brotações epicórmicas da copa das árvores obtidas de estacas e mantidas em casa de sombra.

Foram utilizadas 4 árvores de *E. grandis* com 36 meses de idade, e cinco árvores de *E. grandis* x *E. urophylla* e uma árvore de *E. urophylla* x *E. grandis*, com 30 meses de idade.

O meio de cultura GONÇALVES (1980) modificado foi utilizado para estabelecimento e multiplicação de gemas em 19 subculturas sucessivas a cada 30 dias. Para dois clones de *E. grandis*, foram realizadas mais 20

subculturas em meio de cultura JADS sólido, a cada 30 dias.

O crescimento e desenvolvimento de gemas foi avaliado semanalmente através de: peso de matéria fresca (PMF), peso de matéria seca (PMS) e taxa de crescimento relativo médio (R%). Para dois clones de *E. grandis*, em meio de cultura bifásico, foi avaliado o número total de brotações e suas classes de altura, a partir do 14º dia de cultura.

As avaliações do crescimento e desenvolvimento de gemas dos clones cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido mostraram:

- variações entre clones para PMF, PMS em meio líquido e sólido, em 42 dias de cultura;
- maiores taxas de crescimento relativo em meio líquido e sólido aos 7 dias de cultura;
- redução e estabilização das taxas de crescimento relativo a partir do 14º dia de cultura, em meio líquido e sólido;
- em meio líquido, maior PMF e PMS, para clones de *E. grandis*;
- em meio sólido, maior PMF e PMS para clones de *E. grandis* x *E. urophylla*;
- que não houve diferença para PMF e PMS tanto em meio líquido como em meio sólido para o clone de *E. urophylla* x *E. grandis*.

O crescimento e desenvolvimento de gemas de clones de *E. grandis* cultivados em meio de cultura bifásico, na fase de multiplicação, permitiu observar:

- variações entre clones e entre tratamentos para PMF, PMS, taxa de crescimento relativo, número total de brotações e número de brotações em classes de altura, em 35 dias de cultura;
- média da taxa de crescimento relativo de 21,9%, em meio sólido, no 7º dia de cultura;
- que a maior frequência de acréscimos de meio líquido favoreceu a manutenção da taxa de crescimento relativo médio de 10,8% até o 21º dia de cultura e um maior número de brotações por explante com uniformidade em crescimento em altura das brotações;
- redução e estabilização da taxa de crescimento relativo após 21º dia e/ou após o último acréscimo de meio de cultura em todos os tratamentos.

SHOOT GROWTH AND DEVELOPMENT IN THE MULTIPLICATION OF
Eucalyptus SPP. IN VITRO IN LIQUID
AND SOLID TISSUE CULTURE MEDIA

Author: DIVA CORREIA

Adviser: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

SUMMARY

The objectives of this work were: 1) to evaluate weekly the shoot growth and development from clones of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, of *E. grandis* x *E. urophylla* and of *E. urophylla* x *E. grandis* in liquid and solid tissue culture media in the multiplication phase for 42 days; 2) to evaluate weekly the shoot growth and development of two *E. grandis* clones in solid + liquid tissue culture media with weekly additions in the multiplication phase for 35 days.

For the tissue culture establishment, nodal explants were collected from tree branches in the field and/or from epicormic shoots from coppices of trees obtained from cuttings and maintained in shade house.

The four trees of *E. grandis* were 36 months old, while the five trees of *E. grandis* x *E. urophylla* and the one of *E. urophylla* x *E. grandis* were 30 months old.

A modified GONÇALVES (1980) tissue culture media was utilized for the establishment and the shoot multiplication phases. Nineteen successive transfers were made at every 30 days for two clones of *E. grandis*, twenty additional transfers were made in the solid JADS (1989) tissue culture media.

Weekly evaluation of shoot growth and development were made through the measurement of: fresh (FW) and oven dry weight (ODW) and relative growth rate (R%); the total number of shoots and shoot height classes from the 14th to the 35th day of culture were made only for two *E. grandis* clones in solid and liquid tissue culture media.

The evaluation of shoot growth and development of the clones in liquid and solid JADS tissue culture media showed:

- interclonal variation for FW and ODW in liquid and solid tissue culture media for 42 days of culture;
- higher R(%) in liquid and solid tissue culture media at the 7th day of culture;
- reduction and stabilization of R(%) after the 14th day of culture in liquid and solid media;
- in the liquid tissue culture media, there was a higher FW and ODW production for *E. grandis*;
- in the solid tissue culture media, there was a higher FW and ODW production for *E. grandis* x *E. urophylla*;
- there was no difference for FW and ODW production either in the liquid as in the solid tissue culture media for *E. urophylla* x *E. grandis*.

The evaluation of shoot growth and development of two *E. grandis* clones cultivated in solid + liquid culture media with weekly additions showed:

- interclonal and among treatment variations for FW, ODW, R(%) and shoot number and shoot height classes;
- that the mean of R(%) was 21,9 in the solid media at the 7th day of culture;
- that the weekly additions of liquid tissue culture media to the culture favored the maintenance of the R(%) at 10,8 until the 21st days of culture and the largest mean number of shoots/explant with more uniformity at the shoot height at the 35th day of culture;
- reduction and stabilization of R(%) after the 21st day and/or after the last addition of liquid media to all treatments.

1. INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos e seu provável desenvolvimento futuro apresenta um grande potencial para o melhoramento genético florestal.

Inicialmente, sucessos podem ser obtidos pelas alternativas apresentadas na micropropagação de genótipos superiores. Com o avanço das pesquisas, a cultura de tecidos poderá ser uma rotina para manter bancos de germoplasmas selecionados ou favorecer o desenvolvimento de novos sistemas biotecnológicos.

Entretanto, a cultura de tecidos pode apresentar seu potencial para acelerar o melhoramento genético, somente se, integrado ao programa de melhoramento genético em produtividade e em qualidade das florestas.

Neste caso, a micropropagação apresenta vantagens sobre os métodos convencionais de propagação vegetativa por possibilitar a obtenção de um número maior de plantas em período de tempo e espaço reduzidos, sem a perda da fidelidade dos genótipos selecionados, possibilitando a reversão à juvenilidade do material.

Muitos estudos sobre cultivo *in vitro* com *E. grandis* e híbridos com esta espécie têm sido conduzidos devido à importância que a espécie possui, em termos de produtividade e características desejáveis à indústria de

papel e celulose.

Informações obtidas em 1993 mostram que existem mais de 746 mil árvores de *Eucalyptus* spp. originárias de micropropagação e plantadas em diferentes regiões do País (Tabela 1). Plantios monoclonais e testes clonais com plantas micropropagadas de *Eucalyptus* spp. vêm sendo instalados por algumas empresas do setor florestal do Brasil desde 1986⁽¹⁾.

A micropropagação tem sido a técnica de cultura *in vitro* mais aplicada até o momento para o *E. grandis*. Entretanto, tem apresentado limitações relacionadas ao isolamento e estabelecimento de explantes oriundos de material adulto; à otimização da fase de multiplicação de gemas, objetivando a eliminação da fase de alongamento e, ao enraizamento das brotações.

Muitas dessas limitações estão associadas à falta de conhecimento sobre fisiologia do crescimento e desenvolvimento da cultura *in vitro* da espécie, suas exigências nutricionais e de condições ambientais e microambientais.

Desta forma, observa-se que a otimização da micropropagação de *E. grandis* é dependente do potencial do genótipo, de fatores ambientais e da interação entre ambos.

⁽¹⁾ GONÇALVES, A.N. ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Ciências Florestais, Piracicaba. Comunicação pessoal, 1993.

Tabela 1. Número de plantas micropropagadas de *Eucalyptus* spp. existentes em campo e localizadas em vários Estados do Brasil.

Espécie/híbrido	Número de plantas	Localização (Estado)
<i>E.dunnii</i>	170	PR
<i>E.grandis</i>	84.407	RS, PR, SP, ES, MG, MS
<i>E.pellita</i>	576	MG
<i>E.saligna</i>	146.758	RS, PR, SP
<i>E.urophylla</i>	53.522	SP, MG
<i>E.camaldulensis</i> x <i>E.grandis</i>	150.030	ES, MG, BA
<i>E.citriodora</i> x <i>E.torelliana</i>	33.340	ES, MG, BA
<i>E.grandis</i> x <i>E.camaldulensis</i>	33.455	SP
<i>E.grandis</i> x <i>E.urophylla</i>	163.361	SP, ES, MS
<i>E.pellita</i> x <i>E.grandis</i>	6	MG
<i>E.pellita</i> x <i>E.urophylla</i>	16	MG
<i>E.tereticornis</i> x <i>E.grandis</i>	30.352	RS
<i>E.torelliana</i> x <i>E.citriodora</i>	3	MG
<i>E.urophylla</i> x <i>E.alba</i>	17.103	RS
<i>E.urophylla</i> x <i>E.grandis</i>	8.338	MG, ES, BA
<i>E.urophylla</i> x <i>E.pellita</i>	8.429	MG, ES, BA
Outras espécies	16.900	PR, SP

Total	746.766	

BA-Bahia; MG-Minas Gerais; MS-Mato Grosso do Sul; ES-Espírito Santo; SP-São Paulo; PR-Paraná; RS- Rio Grande do Sul.

FONTES: Acesita Energética S.A.; Aracruz Florestal S.A.; Cenibra Florestal S.A.; Champion Papel e Celulose Ltda.; Duraflora; Klabin Fabricadora de Papel e Celulose S.A.; Riocell S.A. e Cia Suzano. (Julho a outubro/1993).

Entre os fatores ambientais de maior importância destaca-se o meio de cultura, sua especificidade com as exigências nutricionais da espécie e/ou clone e a capacidade de difusão para influenciar no crescimento e desenvolvimento, aumentando o desempenho em cada fase da micropropagação. Dentro deste enfoque, elaborou-se para esta questão a seguinte hipótese de trabalho:

"Quanto mais adequado o equilíbrio iônico do meio de cultura e sua capacidade de difusão para com a espécie e/ou clone maior será a taxa de crescimento e desenvolvimento de gemas na fase de multiplicação obtendo maior homogeneidade no crescimento em altura das brotações"

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e híbridos desta espécie com *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake.

O *Eucalyptus grandis*, em sua área de ocorrência natural expressa-se por ser uma espécie de grande porte, com alturas entre 42 m a 55 m e diâmetros máximos variando de 1,2 m a 1,8 m (HALL et alii, 1970).

Esta espécie ocorre naturalmente na Austrália, em povoamentos descontínuos e fragmentados, situados em faixa costeira e estreita que estende-se desde a região norte de New Castle, New South Wales (32°35') até o sudeste de Queensland (26°11'). Estes povoamentos encontram-se desde o nível do mar até 300 m de altitude em New South Wales e 700 m ao norte de Queensland. No planalto de Atherton estão situados em altitudes que variam de 500 m a 1150 m (HALL et alii, 1970 e GOLFARI et alii 1978).

No Brasil, a espécie *E. grandis* tem encontrado condições ideais para o seu desenvolvimento em diferentes ambientes e regiões climáticas (GOLFARI, 1983). Esta espécie quando plantada em condições favoráveis pode crescer anualmente 10 m ou mais em altura. Em locais não propícios, este crescimento varia entre 2 m a 3 m de altura (IKEMORI, 1990). Entretanto, no Brasil, materiais selecionados de *E. grandis* têm apresentado taxas de crescimento elevadas,

próximas a 73 m³/ha/ano (BARROS, 1979)⁽²⁾ citado por IKEMORI (1990).

Aliada ao potencial produtivo do *E. grandis*, a técnica de hibridação tem sido utilizada em programas de melhoramento genético florestal visando à seleção de materiais heteróticos em produtividade para diferentes condições ecológicas.

Muitos trabalhos vêm sendo conduzidos com sucesso utilizando híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* ou *E. urophylla* x *E. grandis*. Os resultados destes estudos demonstraram haver superioridade destes híbridos para a densidade básica (BRIGATTI et alii, 1983); para DAP e altura (ODA & FERREIRA, 1983); viabilidade de produção de sementes (IKEMORI & CAMPINHOS, 1983); resistência ao câncer, homogeneidade para a qualidade da madeira e em plantios clonais em larga escala propagadas vegetativamente por estacas (IKEMORI, 1990).

2.2. Micropropagação

A micropropagação tem sido a técnica de maior impacto entre as técnicas de cultura de tecidos com aplicação no setor florestal. Esta importância relaciona-se à possibilidade de propagar genótipos desejáveis sem a perda da árvore matriz, obtenção de altas taxas de multiplicação com reversão à juvenilidade, redução de tempo para obter estes genótipos e estabelecimento de alternativas disponíveis às estratégias do melhoramento genético (GONÇALVES, 1982).

(2) BARROS, F.F. de 1979. Growth and foliar nutrient concentration of *Eucalyptus grandis* relation to spodosol properties in South Florida. PhD dissertation. University of Florida, USA, 1-10.

Entretanto, como desvantagens, têm existido problemas relacionados aos altos níveis de contaminação na fase de isolamento de materiais originários do campo e de materiais não juvenis (GONÇALVES, 1982 e GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990), à otimização das fases do sistema e ao controle da vitrificação (PAQUES, 1991). Outra desvantagem refere-se às exigências de manipulação contínua do material *in vitro*, o que dificulta as etapas de operacionalização, consequentemente elevando o custo do sistema (AITKEN-CHRISTIE & JONES, 1987).

O esquema padrão para sistemas de micropropagação foi proposto por MURASHIGE (1974). Desta forma, a propagação *in vitro* divide-se em:

- I. seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas;
- II. multiplicação dos propágulos através de sucessivas subculturas em meio adequado;
- III. transferência das brotações para meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas para substrato ou solo.

Todavia, na micropropagação de essências florestais, esta proposta muitas vezes é incompleta. Para obtenção de plantas de algumas culturas há necessidade de anular o efeito residual dos níveis de BAP (6-benzil aminopurina) utilizado na fase de multiplicação. Desta forma pode-se obter o alongamento das gemas e favorecer o aumento das taxas de enraizamento *in vitro* das brotações (GRATTAPAGLIA *et alii*, 1987).

Em especial, para a cultura de *Eucalyptus* spp. utiliza-se o seguinte roteiro:

- I. pré-tratamento, nutricional e fitossanitário, oferecido às plantas matrizes utilizando segmentos de ramos, enxertos ou estacas, dispostos em casa de vegetação ou de sombra;
- II. isolamento do explante em meio de cultura;
- III. estabelecimento de gemas em meio de cultura;
- IV. multiplicação de gemas em meio de cultura;
- V. alongamento de brotações em meio de cultura;
- VI. enraizamento de brotações em meio de cultura;
- VII. transplante para substrato e rustificação em casa de vegetação ou de sombra sob condições adequadas de umidade e de intensidade luminosa.

Os meios de cultura utilizados nos diferentes estágios de cultivo podem sofrer variações nas concentrações de nutrientes inorgânicos, de reguladores de crescimento e/ou de substâncias complementares ao crescimento da cultura. Consequentemente, a necessidade da aplicação desta metodologia eleva o custo do sistema da micropropagação de *Eucalyptus*.

2.3. Micropropagação de *Eucalyptus grandis*

2.3.1. Cultura de órgão

2.3.1.1. Fonte de material e estabelecimento *in vitro*

A cultura de órgão de *Eucalyptus* spp. tem utilizado como fonte de explante: meristemas de raízes e de gemas apicais e segmentos nodais, sendo esta última, a fonte de material mais utilizada para micropropagar *E. grandis*.

Vários trabalhos têm sido realizados utilizando explantes obtidos de segmentos nodais oriundos de material juvenil (CRESSWELL & de FOSSARD, 1974; de FOSSARD et

alii, 1977; HARTNEY & BARKER, 1983; RAO & VENKATESWARA, 1985; FURZE & CRESSWELL, 1985).

A micropropagação de material adulto vem sendo estabelecida por meio de segmentos nodais obtidos de brotações apicais da copa das árvores (CRESSWELL & NITSCH, 1975; CRESSWELL & NITSCH, 1977; SITA & RANI, 1985; RAO & VENKATESWARA, 1985), de segmentos nodais de brotações oriundas de cepas de árvores abatidas (CARVALHO, 1988) e de brotações epicórmicas de ramos (IKEMORI, 1987; IKEMORI, 1990; SILVA, 1990).

O uso de segmentos nodais originários de material juvenil de *E. grandis*, na micropropagação, tem contribuído para maior compreensão dos processos de crescimento e desenvolvimento *in vitro* (CRESSWELL & de FOSSARD, 1974). Esta fonte de material quando proveniente da germinação de sementes *in vitro* elimina as contaminações. Consequentemente, pode-se obter um número maior de explantes, os quais podem ser utilizados para vários estudos simultâneos relacionados às exigências nutricionais e de condições ambientais e microambientais necessárias à cultura nas diferentes fases da micropropagação.

A utilização de material adulto apresenta limitações, tanto para a obtenção de explantes livres de contaminações quanto ao estabelecimento da cultura. Outros fatores limitantes estão relacionados com o estágio fisiológico e nutricional do explante, potencial morfogenético e idade ontogenética (de FOSSARD, *et alii*, 1977; IKEMORI, 1987; CARVALHO, 1988; IKEMORI, 1990; SILVA, 1990; WARRAG *et alii*, 1990).

2.3.1.2. Multiplicação de gemas

Fontes de explantes de material juvenil de *E. grandis* têm apresentado maior proliferação de gemas *in vitro* do que quando obtidas de material adulto (FURZE & CRESSWELL, 1985; SITA & RANI, 1985). Todavia, as taxas de multiplicação estão relacionadas ao potencial genético do material, ao valor nutricional do meio de cultura e sua capacidade de difusão, às condições ambientais e microambientais para o crescimento (RAO & VENKATESWARA, 1985).

Em culturas estabelecidas, fatores como tipo e tamanho do explante, frequência de subculturas e cuidados no procedimento de repicagem, influenciam na multiplicação de gemas *in vitro*.

SITA & RANI (1985) obteve proliferação de gemas de *E. grandis* em segmentos nodais de ramos de árvores com 5 anos de idade em meio de cultura sólido de MURASHIGE & SKOOG (1962) suplementado com 1,0 mg/l de BAP e de ANA (ácido naftaleno acético), respectivamente. Esta metodologia proporcionou, em subculturas sucessivas a multiplicação de gemas e crescimento desuniforme das brotações com alturas máximas de 1,5 cm.

Em explantes oriundos de segmentos nodais de brotações de cepas de árvores abatidas, cultivados na fase de multiplicação em meio de cultura sólido formulado por de FOSSARD (1974), com acréscimo de 0,5 mg/l de BAP em presença ou não de 0,2 mg/l de ANA proporcionou, em média, 16,3 brotações por explantes na 1ª subcultura, aos 30 dias (CARVALHO, 1988).

IKEMORI (1990) trabalhando com segmentos nodais e gemas apicais retirados de ramos de árvores de *E. grandis* com 10 anos de idade e cultivados em meio de cultura sólido definido por QUOIRIN & LEPOIVRE (1977) modificado, verificou que a taxa de multiplicação varia a cada subcultura. O potencial para multiplicação de gemas foi específico para cada clone e tendeu aumentar conforme o número de subculturas realizadas a cada 30 dias. Entretanto, as maiores taxas de multiplicação de gemas foram observadas em explantes oriundos de segmentos nodais, após a 4ª subcultura.

Resultados similares foram obtidos por SILVA (1990) quando utilizou segmentos nodais de brotações epicórmicas de ramos de 3 clones de *E. grandis* com 2 anos de idade. Esses materiais apresentaram, na 4ª subcultura, taxas de multiplicação de 13,2:1, 30:1 e 33:1.

TOTH (1991) estudando o efeito de esteróides (progesterona e estradiol) durante a fase de multiplicação de gemas de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* cultivados, na 18ª subcultura em meio de cultura sólido GONÇALVES (1980) modificado, observou um efeito sinérgico entre esteróides e BAP promovendo em média 62,6 brotações por explante. Enquanto que, somente o efeito do BAP induziu o equivalente a 22,2 brotações por explante, aos 30 dias de cultura.

2.3.1.3. Alongamento de brotações

Poucos estudos tem sido realizados sobre a fase de alongamento de *E. grandis*. Entretanto, esta etapa parece ser necessária para o sucesso do cultivo *in vitro* desta espécie.

Um dos fatores que afeta o alongamento de brotações está relacionado ao efeito residual do BAP utilizado durante a fase de multiplicação de gemas em subculturas sucessivas (GRATTAPAGLIA *et alii*, 1987).

CARVALHO (1988) trabalhando com meio de cultura sólido (FOSSARD, 1974) suplementado com 0,05 mg/l de BAP e 0,01 mg/l de ANA obteve brotações com altura média de 1,0 cm.

O uso de GA₃ (ácido giberélico) em meio de cultura sólido de MURASHIGE & SKOOG (1962) com as concentrações reduzidas à metade, favoreceu o crescimento médio das brotações de *E. grandis* em 0,8 cm de altura (SILVA, 1990). Adicionalmente, verificou que o regulador de crescimento 2ip-6-(Γ , Γ -dimetilalilamino) purina estimula o alongamento das brotações aliado à redução dos níveis de citocinina.

A composição de macronutrientes da formulação de FOSSARD (1974) com acréscimos da composição de micronutrientes de MURASHIGE & SKOOG (1962), reduzida à metade, e da solução de vitaminas de HUANG & MURASHIGE (1976), estimulou o crescimento médio das brotações em 1,4 cm de altura (SILVA, 1990).

Estudos realizados em clones de híbridos de *E. grandis* x *E. camaldulensis*, *E. grandis* x *E. tereticornis* e *E. grandis* x *E. robusta*, cultivados em meio de cultura sólido de MURASHIGE & SKOOG (1962) modificado, suplementado com AIB (ácido indol butírico) e zeatina proporcionou uma média superior a 1,5 cm de altura das brotações, após 30 dias de cultura (WARRAG *et alii*, 1990).

TOTH (1991) estudando o alongamento de brotações em clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*, avaliados aos 30 dias, obteve crescimento em altura de 3,0 cm, cultivados em meio de cultura sólido, GONÇALVES (1980) modificado.

2.3.1.4. Enraizamento de brotações e potencialidade para o rejuvenescimento *in vitro*

A utilização de material juvenil como fonte de explante tem favorecido as taxas de enraizamento *in vitro* de brotações de *E. grandis* em 60%, 70% e 90% como citam RAO & VENKATESWARA (1985); CRESSWELL & de FOSSARD (1974) e FURZE & CRESSWELL (1985), respectivamente.

O enraizamento das brotações de material adulto de *E. grandis* foi conseguido após a transferência da fase de multiplicação para a fase de enraizamento, em meio de cultura sólido de WHITE (1963) (SITA & RANI, 1985) e de KNOP (1965) modificado segundo FRANCKET & BOULAY (1983) (IKEMORI, 1987; IKEMORI, 1990).

As taxas de enraizamento *in vitro* provenientes de material adulto têm variado entre 30% a 70%, nas primeiras subculturas, em vários tipos de meios de cultura, em diferentes concentrações de AIA (ácido indol acético) e AIB (SITA & RANI, 1985; RAO & VENKATESWARA, 1985).

Entretanto, a literatura tem reportado a capacidade de haver rejuvenescimento *in vitro* por meio de subculturas sucessivas (FRANCKET, 1981; GONÇALVES, 1982). IKEMORI (1987) observou que o enraizamento *in vitro* de brotações oriundas da 10ª subcultura da fase de multiplicação

de 2 clones de *E. grandis* foi de 70% e 80%. WARRAG *et alii* (1990), micropropagando clones de híbridos com *E. grandis* obtiveram 97,8% de brotações enraizadas em material proveniente da 7ª subcultura. Híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*, com brotações procedentes da 18ª subcultura apresentaram enraizamento *in vitro* com acréscimos de esteróides ao meio de cultura (TOTH, 1991).

2.3.1.4.1. Fatores que influenciam no enraizamento de brotações *in vitro* provenientes de material adulto.

A presença de reguladores de crescimento (G) em árvores adultas de *E. grandis* tem influenciado na capacidade de enraizamento. Entretanto, em brotações obtidas da base da árvore, os níveis destes reguladores são baixos (PATON *et alii*, 1981). Isto favorece o uso de explantes para o estabelecimento das culturas de materiais oriundos de rebrotas de cepas (CARVALHO, 1988) e de brotações epicórmicas de estacas obtidas de rebrotas das cepas (TOTH, 1991).

Alguns pesquisadores têm mencionado a importância das características morfológicas e de origem dos explantes. CRESSWELL & NITSCH (1975) questionam a posição dos galhos nas árvores de onde são retirados os explantes. IKEMORI (1990) verificou uma correlação estatisticamente significativa para a habilidade de enraizamento *in vitro* entre explantes oriundos de brotações apicais e de segmentos nodais. Ambos retirados de brotações epicórmicas de ramos de material adulto de clones de *E. grandis*. A variabilidade genética e a capacidade de rejuvenescimento destes materiais foram fatores que influenciaram nos índices de enraizamento *in vitro* (IKEMORI, 1987; IKEMORI, 1990; SILVA, 1990; WARRAG *et alii*, 1990; TOTH, 1991).

→ Nas formulações dos meios de cultura, o uso de diferentes tipos e de doses de auxinas, níveis de cálcio (IKEMORI, 1987), de cálcio e de boro (WARRAG *et alii*, 1990) e de vitaminas (SILVA, 1990; TOTH, 1991) favoreceram aumentos dos índices de enraizamento.

2.3.2. Meio de cultura

Os protocolos estabelecidos para micro-propagar *E. grandis* possuem várias formulações de meios de cultura solidificados com ágar.

Muitas vezes, o crescimento desses materiais podem ser inibidos por alta concentração iônica, níveis elevados da concentração de nitrogênio total, deficiência de cálcio, sensibilidade ao cloreto, qualidade e quantidade utilizada do agente solidificante (MACRAE & STADEN, 1990).

Entretanto, meio de cultura como o de MURASHIGE & SKOOG (1962) considerado de alta concentração iônica tem sido utilizado em vários trabalhos com *E. grandis* (SITA & RANI, 1985; RAO & VENKATESWARA, 1985; FURZE & CRESSWELL, 1985; SITA, 1986). Porém, na fase de enraizamento esta formulação, em alguns casos, tem sido diluída (CRESSWELL & NITSCH, 1975; WARRAG *et alii*, 1990).

Outro meio de cultura bastante utilizado no cultivo de *E. grandis* é o de FOSSARD (1974) tido como de composição iônica média (CRESSWELL & de FOSSARD, 1974; CRESSWELL & NITSCH, 1975; BARKER *et alii*, 1977; de FOSSARD, 1977; CARVALHO, 1988; SILVA, 1990). O meio de QUOIRIN & LEPOIVRE (1977) utilizado por IKEMORI (1987) e IKEMORI (1990) na micropropagação de *E. grandis* e o meio de cultura GONÇALVES (1980) modificado utilizado por TOTH (1991) em estudos com

híbridos de *Eucalyptus* também são considerados de composição iônica média.

As formulações definidas por WHITE (1943) e de KNOP (1965) são tidas como de composição iônica baixa e utilizadas durante a fase de enraizamento de *E.grandis* por SITA & RANI (1985) e IKEMORI (1990), respectivamente.

2.4. Produtividade *in vitro*

A produtividade *in vitro* e suas variações, obtidas em diferentes meios de cultura são determinadas pela interação entre o genótipo e os fatores ambientais. Consequentemente, esta interação expressa o fenótipo da cultura, em cada fase do sistema e/ou a cada subcultura, interagindo em um espaço e em um intervalo de tempo, podendo ser representada da seguinte forma:

Vários fatores podem interferir na produtividade *in vitro*. Com o intuito de acelerar os programas de melhoramento genético normalmente utiliza-se genótipos em níveis de melhoramento mais elevados, como por exemplo, progênie e clone. Estes materiais são mais sensíveis às pequenas variações do ambiente, podendo ser observado mais facilmente as interações genótico x ambiente (GONÇALVES,

1990) e seu efeito sobre as características da cultura no decorrer do tempo.

Respostas ao potencial do genótipo também relacionam-se às características morfológicas, fisiológicas, nutricionais (IKEMORI, 1990), origem, idade ontogenética, tipo e tamanho do explante que inicia a cultura (PENCHEL, 1990) e/ou a subcultura.

Um dos fatores ambientais mais importantes que interferem na produtividade relaciona-se ao equilíbrio iônico do meio de cultura, bem como sua capacidade de difusão e de assimilação de nutrientes pelo explante permitindo estabelecer um potencial de crescimento ativo com qualidade e homogeneidade de crescimento em menor período de tempo. (GEORGE & SHERRINGTOM, 1984).

Níveis e qualidade da luz, fotoperíodo e temperatura também são responsáveis por influências ambientais no processo de desenvolvimento e de morfogênese (GEORGE & SHERRINGTOM, 1984).

A interação entre genótipo e fatores ambientais expressam um determinado tipo de cultura *in vitro* com características próprias e níveis de qualidade, de competência e produtividade. Esses resultados podem variar a cada subcultura, decorrente do efeito sobre o grau de rejuvenescimento do material, limitado pelo espaço e tempo.

2.5. Crescimento *in vitro*

O método clássico para avaliar o crescimento de culturas baseia-se em verificar o desenvolvimento celular até o esgotamento do meio de cultura. Este estudo consiste em

seguir, em função do tempo, a evolução da biomassa (gramas de matéria seca/unidade de volume de meio de cultura), conforme está expresso na Figura 1.

O crescimento celular normalmente é caracterizado por duas variáveis abaixo relacionadas:

- I - ao tempo necessário para a duplicação da massa;
- II - à velocidade específica do crescimento celular.

A primeira variável expressa o intervalo de tempo necessário para ocorrer a duplicação da cultura, enquanto que a segunda é dependente da temperatura, pH, concentrações de nutrientes e inibidores, e do estado de agitação da cultura (DIAS, 1982).

Figura 1. Representação esquemática do crescimento celular. I-Fase de indução, II-Fase de transição, III-Fase exponencial, IV-Fase de desaceleração do crescimento, V-Fase estacionária, VI-Fase de declínio. (Fonte: DIAS, 1982).

Entretanto, quando a velocidade específica de crescimento celular é constante, esta representa um crescimento exponencial ou logarítmico que se mantém constante enquanto o meio de cultura for favorável ao desenvolvimento da cultura.

Por outro lado, para o crescimento de árvores no campo, INGESTAD (1991) propõe um modelo baseado em aplicações de doses menores e repetitivas de fertilizantes, em períodos de tempo reduzidos. Desta forma, pode-se proporcionar uma situação de "steady state" onde a taxa adicional relativa de nutrientes é igual à taxa de absorção relativa de nutrientes pela planta. Enquanto houver este equilíbrio, a taxa de crescimento relativa permanece linear. Assim, o controle do crescimento das culturas *in vitro* pode ser alcançado com acréscimos periódicos de meio de cultura.

2.6. Aplicação de meio de cultura líquido na micropropagação de essências arbóreas

O agente solidificante do meio de cultura mais utilizado em cultivo *in vitro* é o ágar. Entretanto, vários trabalhos com diferentes espécies têm mostrado que este produto pode influenciar na morfogênese das diferentes fases da micropropagação (DEBERG, 1983) e na concentração das substâncias constituintes do meio de cultura decorrente das impurezas que o compõem (WILLIAMS & TAJI, 1987).

MACRAE & STADEN (1990) verificaram que o ágar foi o agente solidificante que mais influenciou na redução do número de brotações de *E. grandis*.

O cultivo de *Pinus caribaea* por SKIDMORE et alii (1988), em meio de cultura líquido apresentou maior

crescimento em altura de brotações do que em meio sólido. Entretanto, o uso de meio líquido para micropropagar cultivares de maçã favoreceu a formação de explantes com vitrificação (STANDARDI & MICHELI, 1988).

WANG (1991) utilizou o meio de cultura bifásico (sólido + líquido) para propagar cultivares de pera. Neste sistema observou que houve a formação de um maior número de brotações e, estas apresentaram maiores alturas, quando comparadas com culturas propagadas somente em meio cultura sólido.

A aplicação do meio de cultura líquido na micropropagação tem como intuito reduzir os custos deste sistema (PAQUES, 1991). Foi possível cultivar *Pinus radiata*, durante 18 meses, em meio sólido com suplementação semanal de meio líquido. Entretanto, o uso somente de meio líquido com reposição semanal, sem transferências, promoveu o melhor crescimento de brotações do que em culturas que foram transferidas mensalmente para meio novo (AITKEN-CHRISTIE & JONES, 1987).

VANDERSCHAEKHE & DEBERGH (1988) definiram um sistema para propagar *Prunus avium* em meio líquido. As culturas permaneceram em fase de multiplicação durante 6 semanas, seguindo da fase de alongamento por 2 semanas, com adições de meio líquido e, o enraizamento ocorreu em casa de vegetação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado em Mogi Guaçu (Estado de São Paulo) no Laboratório de Micropropagação do Departamento de Melhoramento Genético Florestal da Chamflora Agrícola Ltda.

Os experimentos I, II e III foram realizados no período de novembro de 1990 a janeiro de 1991 e o experimento IV, durante os meses de maio e junho de 1992.

3.1. Árvores matrizes

3.1.1. Experimento I

Utilizou-se 4 árvores de *E. grandis* (G1, G2, G4 e G5) aos 36 meses de idade, propagadas por estacas na região de Mogi Guaçu-SP, obtidas a partir de enraizamento de estacas de brotações basais de árvores com códigos: 01.147.033(G1), 01.149.006(G2), 01.081.025(G4) e 01.081.027 (G5) propagadas por germinação de sementes originárias de Coff's Harbour e abatidas aos 8 anos de idade.

3.1.2. Experimento II

Utilizou-se 5 árvores de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* com códigos: 01.005.004(H3), 01.005.005(H4), 07.148.017(H8), 07.148.018(H9) e

07.148.019(H10) propagadas por germinação de sementes na região de Mogi Guaçu-SP e abatidas aos 30 meses de idade.

3.1.3. Experimento III

Utilizou-se uma árvore de híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* com código 01.141.006 propagada por germinação de sementes na região de Mogi Guaçu-SP e abatida aos 30 meses de idade.

3.1.4. Experimento IV

Utilizou-se os clones G2 e G5, já caracterizados no item 3.1.1.

3.1.5. Caracterização das árvores matrizes através dos frutos

As informações sobre as árvores matrizes citadas nos itens 3.1.1, 3.1.2 e 3.1.3 foram fornecidas pelo Departamento de Melhoramento Genético Florestal da Chamflora Agrícola Ltda e, assim consideradas no estudo. Posteriormente, foi realizada a caracterização de algumas árvores matrizes através dos frutos (tipicidade) segundo FERREIRA⁽³⁾ citadas na Tabela 2 e mostradas no Apêndice 1.

3.2. Fonte e preparo dos explantes

Para os clones G1 e G2 coletou-se ramos apicais com crescimento do ano com aproximadamente 80 cm de comprimento. Utilizou-se o método direto de preparo de

⁽³⁾ FERREIRA, M. ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Ciências Florestais, Piracicaba. Comunicação Pessoal. 1993.

explantes indicado por GONÇALVES (1982), utilizando como fonte de explante segmentos nodais com aproximadamente 1 cm de comprimento. Enquanto para o restante dos clones, após dois meses do abate das árvores, retirou-se brotações das cepas com aproximadamente 40 cm de comprimento.

Tabela 2. Caracterização das árvores matrizes através dos frutos

ÁRVORE	TIPO DO FRUTO
G2	<i>E.grandis</i>
G1 e G4 *	<i>E.botryoides</i>
G5 **	<i>E.tereticornis</i>
H3, H9 e H10 ***	<i>E.grandis</i>
U3 ****	<i>E.urophylla</i>

* prováveis híbridos de *E.grandis* x *E.botryoides*

** provável híbrido de *E.grandis* x *E.tereticornis*

*** prováveis híbridos de *E.grandis* x *E.urophylla*

**** provável híbrido de *E.urophylla* x *E.grandis*

Destas brotações preparou-se as estacas, as quais foram retiradas da região intermediária das brotações, tendo um comprimento de 8,0 cm, diâmetro de haste variando entre 0,2 cm a 0,5 cm e contendo um par de folhas opostas com lâminas foliares cortadas à metade.

Na base das estacas utilizou-se o hormônio AIB na concentração de 6000 ppm para favorecer o enraizamento das mesmas. Posteriormente, as estacas foram plantadas em recipientes (tubetes) contendo substrato composto por 50% de palha de arroz carbonizada, 30% de vermiculita de granulometria média e 20% de terra de subsolo com fertilização contendo 12kg de NPK (8-17-10) e 0,5 kg de FTE

BR9 (Zn-6%; B-2%; Cu-0,8%; Fe-6%; Mn-3%; Mo-0,1%) por m³ de substrato.

O enraizamento das estacas ocorreu em casa de vegetação, durante 30 dias, à temperaturas entre 25°C a 28°C e umidade relativa entre 80% a 90% sob irrigação intermitente. Posteriormente, as mesmas permaneceram durante 20 dias, em casa de sombra com intensidade luminosa reduzida em 50%.

Após, 40 dias de permanência a pleno sol, em viveiro, as estacas foram transferidas para casa de sombra com redução em 50% da intensidade luminosa.

Cada estaca foi transferida para recipiente com capacidade de 20 litros contendo substrato constituído por 60% de terra de subsolo e 40% de substrato composto por 50% de palha de arroz carbonizada, 30% de vermiculita de granulometria média e 20% de terra de subsolo. Acrescentou-se ao substrato, no plantio, 100g de adubo NPK (8:17:6) por recipiente.

Semanalmente, efetuou-se pulverizações com fungicida Benlate (Methyl[1-[(butylamino)carbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl] carbamate) na concentração 1 g/l, sendo realizada, diariamente, irrigação na base das estacas.

Após 2 meses, foram retiradas das estacas, brotações epicórmicas com aproximadamente 5 cm de comprimento. Estas brotações foram submetidas à imersão de soluções de detergente comercial a 3% (v/v) durante 15 minutos. Posteriormente, repetiu-se o processo de imersão em solução de fungicida Benlate (1 g/l), durante 30 minutos.

Em câmara de fluxo laminar, os materiais foram envolvidos em gaze esterilizada, emergidos em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) com acréscimo de 3 gotas de Tween 20 para cada 100 ml da solução desinfestante durante 15 minutos. O material foi lavado 4 vezes, em água destilada e autoclavada durante 30 minutos. Com auxílio de pinças e bisturis autoclavados foram preparados os explantes com 1 cm de comprimento oriundos de segmentos nodais de brotações.

3.3. Estabelecimento das culturas e multiplicação das gemas *in vitro*

Para a indução de gemas dos segmentos nodais foi utilizado o meio de cultura GONÇALVES (1980) modificado utilizando 800 mg/l de NH_4NO_3 (nitrato de amônia) com acréscimos de 1,0 mg/l de AIA e 0,5 mg/l de BAP. Utilizou-se 0,6% (p/v) de ágar ("Difco Bacto-Sigma"), 3% (p/v) de sacarose e o pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$.

Utilizou-se o mesmo meio de cultura suplementado com 0,5 mg/l de BAP para a multiplicação das gemas sendo realizado 19 subculturas até o período da realização dos experimentos I, II e III. O experimento IV foi desenvolvido com explantes oriundos da 39ª subcultura. Após a 19ª subcultura utilizou-se o meio de cultura JADS (1989) sólido com acréscimo de 0,5 mg/l de BAP e 0,6% (p/v) de ágar ("Difco Bacto-Sigma"). O pH foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$. Cada subcultura foi realizada em intervalos de aproximadamente 30 dias.

As culturas permaneceram em condições ambientais para o crescimento à temperatura de $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e iluminância de 1000 lux.

3.4. Meio de Cultura JADS

Informações bibliográficas sobre teores nutricionais da espécie *E. grandis* foram obtidos a partir de vários estudos realizados com materiais jovens. Desta forma estabeleceu-se um intervalo de teor nutricional para cada elemento. Consequentemente, formulou-se um meio de cultura com relações adequadas de níveis nutricionais objetivando a produção de 150 mg de matéria seca em cada 10 ml de meio de cultura (Tabela 3).

Tabela 3. Meio de cultura JADS* (1989).

Substância	mg/l
NH ₄ NO ₃	324,0
KNO ₃	809,0
KH ₂ PO ₄	408,0
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1181,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	739,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	55,6
Na ₂ EDTA	74,5
MnSO ₄ ·4H ₂ O	16,9
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4,32
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,15
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,25
H ₃ BO ₃	3,1
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina HCl	0,5
Tiamina HCl	5,0
mionositol	100,0
L-arginina	7,0
L-glutamina	146,0
L-cisteína	2,50
Pantotenado de Cálcio	2,40
Sacarose	30000,0

* JADS: grupo de pesquisadores que definiram o meio de cultura JADS (1989) (Biólogo Juan Alfonso Rodrigues Ataíde-FLORESTAS RIO DOCE, Açailândia-MA; Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ)-Piracicaba-SP. Bióloga Diva Correia-ESALQ-Piracicaba-SP. Bióloga Silvia Cristina Vettorazzo-ESALQ-Piracicaba-SP).

3.5. Preparo dos meios de cultura JADS sólido e líquido

As soluções-estoques dos macronutrientes e micronutrientes foram preparadas aumentando em 100 vezes a concentração das substâncias indicadas na Tabela 3. Estas soluções foram guardadas em frasco "ambar" e armazenadas em geladeira, a 4° C. O restante das substâncias foram pesadas e acrescentadas ao meio. Em todos os experimentos adicionou-se 0,5 mg/l de BAP, sendo este dissolvido em solução de HCl a 1 N. O pH do meio de cultura foi ajustado para $6,0 \pm 0,1$ utilizando NaOH a 1 N, antes da adição do ágar ("Difco Bacto-Sigma").

O meio de cultura com acréscimo de ágar a 0,6% (p/v) foi homogeneizado em fusão, em banho-maria, tendo como ponto ótimo de homogeneização 90°C. Nesta temperatura o meio de cultura com ágar foi dispensado em recipientes de vidro com capacidade de 250 ml vedado com tampa de polipropileno. Cada recipiente recebeu 20 ml de meio de cultura. O mesmo volume de meio de cultura líquido foi dispensado no mesmo tipo de recipiente acima mencionado. Entretanto, para favorecer a sustentação dos explantes sobre o meio de cultura líquido utilizou-se um suporte confeccionado de fibro-espuma com diâmetro de 4,5 cm e 0,5 cm de espessura. Desta forma os meios foram autoclavados à temperatura de 121°C e à pressão de 1,05 Kg/cm, durante 15 minutos.

3.6. Desenvolvimento dos experimentos, características do explante-padrão e condições de crescimento das culturas

Todos os trabalhos de montagem dos experimentos foram realizados em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, utilizando pinças e bisturis para a

confecção dos explantes-padrão. Estes explantes foram preparados sobre papel toalha descartável, previamente autoclavado à temperatura de 121°C e à pressão de 1,05 Kg/cm, durante 30 minutos.

Nos experimentos I, II e III, foram utilizados explantes-padrão formados por tufos de brotações com parte aérea pouco desenvolvidas e peso médio de matéria seca de 35 mg/explante (aproximadamente 1 cm de diâmetro) e 9 mg/explante (aproximadamente 0,5 cm de diâmetro) no experimento IV.

No experimento IV, utilizou-se pipetas autoclavadas à temperatura de 121°C e pressão de 1,05 kg/cm, durante 30 minutos. Nas pipetas, foi acoplado uma pera de borracha própria para auxiliar a pipetagem no processo de dispensar e/ou retirar alíquotas do meio de cultura líquido.

As condições de crescimento das culturas foram similares às indicadas no item 3.3.

3.7. Experimentos realizados

3.7.1. Experimento I - Influência do meio de cultura JADS líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de clones de *E. grandis*, na 20ª subcultura

Para cada tipo de meio de cultura, sólido e líquido, preparou-se 30 recipientes por clone contendo 2 explantes-padrão por frasco. As culturas permaneceram na sala de crescimento até o 42º dia, em condições ambientais indicadas no item 3.3.

Em intervalos de 7 dias, retirou-se como amostragens 5 frascos considerando duas amostras independentes por frasco, de cada meio de cultura, por clone, para avaliação de produção de matéria fresca (PMF) e produção de matéria seca (PMS). Essas avaliações também foram obtidas de amostragens do explante-padrão no dia do início do experimento.

3.7.2. Experimento II - Influência do meio de cultura JADS líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*, na 20ª subcultura

A condição do experimento foi similar ao item 3.7.1.

3.7.3. Experimento III - Influência do meio de cultura JADS líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de um clone de híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis*, na 20ª subcultura

A condição do experimento foi similar ao item 3.7.1.

3.7.4. Experimento IV - Influência do meio de cultura JADS bifásico no crescimento e desenvolvimento de gemas de clones de *E. grandis* (G2 e G5), na 40ª subcultura

O experimento foi constituído por 5 tratamentos, todos com 20 ml de meio de cultura JADS sólido (0,6% (p/v) de ágar "Difco Bacto-Sigma"/frasco) e

compreenderam:

- T1:** 20 ml de meio de cultura sólido por frasco;
- T2:** idem T1 e no 7º dia de cultura acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco;
- T3:** idem T1 e no 7º dia de cultura acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco, no 14º dia, retirou-se a quantidade de meio de cultura líquido sobrenadante e dispensou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco;
- T4:** idem T3 e no 21º dia de cultura, retirou-se a quantidade de meio de cultura líquido sobrenadante e dispensou-se 10 ml de meio de cultura por frasco;
- T5:** idem T1 e no 14º dia acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco.

As condições de crescimento do experimento foram similares àquelas indicadas no item 3.3.

Foi avaliado o peso fresco e seco de cada explante-padrão constituindo uma amostragem de 10 explantes-padrão no dia do início do experimento. A cada 7 dias, durante 35 dias retirou-se uma amostragem de cinco frascos por tratamento, considerando duas amostras independentes por frasco e verificou-se a PMF e PMS de cada explante.

A partir do 14º dia, das amostragens de 10 explantes obtidas de cada tratamento, após a avaliação da PMF retirou-se 5 amostras aleatórias de cada tratamento e foram contadas todas as brotações por explante distribuindo-as nas seguintes classes de altura:

Classe A - até 0,5 cm de comprimento

Classe B - maior 0,5 cm a 1,0 cm de comprimento

Classe C - maior 1,0 cm a 1,5 cm de comprimento
 Classe D - maior 1,5 cm a 2,0 cm de comprimento
 Classe E - maior 2,0 cm a 2,5 cm de comprimento
 Classe F - maior 2,5 cm a 3,0 cm de comprimento
 Classe G - maior 3,0 cm a 3,5 cm de comprimento
 Classe H - maior 3.5 cm a 4,0 cm de comprimento

3.8. Taxa de crescimento relativo

A avaliação da taxa de crescimento relativo foi definida com as médias de PMS dos experimentos I, II, III e IV por meio da equação segundo HUNT (1982).

$$\text{Taxa de Crescimento Relativo} = \frac{\ln \text{PMS2} - \ln \text{PMS1}}{T2 - T1}$$

onde: $\ln$ = logarítmo neperiano
 PMS2 = Produção de matéria seca no período de
 tempo final
 PMS1 = Produção de matéria seca no período de
 tempo inicial
 T2 = Tempo final
 T1 = Tempo inicial

3.9. Análises estatísticas

Para os Experimento I e II foi utilizado o delineamento estatístico em parcelas subdivididas, e para os experimentos III e IV utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial.

Os efeitos dos tratamentos nas variáveis estudadas foram avaliadas mediante análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As análises estatísticas dos resultados experimentais foram testadas por meio da análise de regressão tendo como variáveis dependentes PMF e PMS e como variável independente, o período de cultura (dias).

A escolha do melhor modelo foi baseado nos coeficientes de determinação ajustados (R^2), na significância do teste de F do modelo, na significância dos coeficientes de regressão pelo teste 't', de "Student", considerando um nível aceitável de significância de 1% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXPERIMENTO I: Influência do meio de cultura JADS líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de clones de *E. grandis*, na 20ª subcultura

Os resultados das análises de variância para produção de matéria fresca (PMF) e produção de matéria seca (PMS) encontram-se indicados na Tabela 4.

Tabela 4. Resumo das análises de variância para PMF e PMS de clones de *E. grandis*, na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido e avaliadas a cada 7 dias durante 42 dias de cultura

Fontes de variação	GL.	Quadrados médios	
		PMF	PMS ⁽¹⁾
Dia	6	16,5915 **	41,6874 **
Clone (Dia)	21	0,2054 (ns)	0,2558 **
Meio	1	4,5791 **	5,6244 **
Meio x Dia	6	0,2790 (ns)	0,2151 (ns)
Resíduo	524	0,1718	0,1157
F		18,8 **	66,7 **
CV (%)		38,1	14,4
Média geral (mg)		1086,6	118,8

(ns) não significativo pelo teste F

(**) significativo pelo teste F, $p < 0,01$

(1) valores transformados em $\ln x + 0,5$

(PMF) produção de matéria fresca

(PMS) produção de matéria seca

A variável PMF apresentou maior amplitude entre os dados do que para PMS. Isto pode ter influenciado na obtenção de um coeficiente de variação experimental mais elevado para o PMF (38,1%) quando comparado ao coeficiente de variação obtido para o PMS (14,4%) que, adicionalmente, teve seus valores transformados (Tabela 4).

As médias gerais para PMF e PMS foram 1086,6 mg e 118,8 mg por explante, respectivamente. Isto corresponde a 10,9% de matéria seca por explante (Tabela 4).

Pode-se observar na Tabela 4 que a PMF e a PMS apresentaram variações durante os períodos de cultura (0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias) que diferiram estatisticamente pelo teste F ($p < 0,01$). Os meios de cultura testados, líquido e sólido, indicaram diferenças estatísticas pelo teste F ($p < 0,01$) para as duas variáveis, PMF e PMS.

Entretanto, a interação entre meios de cultura com períodos de cultura (dias) não apresentou diferença estatística tanto para a PMF quando para PMS pelo teste F ($p < 0,05$) (Tabela 4).

O efeito dos clones G1, G2, G4 e G5, dentro dos períodos de cultura (dias) não foi significativo para a variável PMF pelo teste F ($p < 0,05$), embora para a PMS tenha sido altamente significativo pelo teste F ($p < 0,01$) (Tabela 4).

O cultivo dos materiais genéticos em meio de cultura líquido apresentou maiores médias para a PMF e PMS do que quando cultivados em meio sólido diferenciando estatisticamente pelo teste de Tukey ($p = 0,05$) conforme indicação na Tabela 5.

Tabela 5. Valores médios obtidos para PMF e PMS de clones de *E. grandis* na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura

Meio de cultura	PMF (mg)	PMS (1) (mg)
Líquido	1177,3 A	132,5 A
Sólido	995,6 B	105,0 B
F	18,8 **	66,7 **
CV (%)	38,1	14,4
Média geral (mg)	1086,6	118,8

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, $p = 0,05$

(1) valores transformados em $\ln x + 0,5$

(PMF) produção de matéria fresca

(PMS) produção de matéria seca

** significativo pelo teste F, $p < 0,01$

Os resultados indicados na Tabela 5 sugerem que clones de *E. grandis* podem apresentar maiores taxas de crescimento quando cultivados em meio líquido do que em meio de sólido. Isto representa que a velocidade de difusão e absorção de nutrientes foi maior em meio de cultura líquido, estimulando o crescimento da cultura.

Estudos realizados com meio de cultura líquido para propagar *Pinus radiata* (AITKEN-CHRISTIE & JONES, 1988) e *Pinus caribaea* (SKIDMORE et alii, 1988) demonstraram maior efeito no crescimento de gemas destas espécies.

Contudo, o uso do ágar como agente solidificante do meio de cultura sólido pode estar favorecendo a existência de uma barreira junto aos processos de difusão e absorção, proporcionando uma redução no

crescimento das culturas. Outrossim, esse produto, dependendo da quantidade utilizada, da qualidade e origem, pode apresentar na sua composição substâncias inibidoras que interferem no crescimento e desenvolvimento das gemas conforme observou DEBERGH (1983) em culturas de *Cynara scolymus* e MACRAE & STADEN (1990) nas fases de multiplicação de gemas e alongamento de brotações de *E. grandis*.

Os clones mostraram variações no crescimento ao longo do período experimental. Os dados médios de PMF e PMS obtidos a cada 7 dias encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Valores médios para PMF e PMS de clones de *E. grandis* na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido.

Dias	PMF	PMS (1)
0	276,7 D	24,5 E
7	634,2 C	60,4 D
14	1280,3 B	124,7 C
21	1214,9 B	136,1 BC
28	1272,0 B	150,2 AB
35	1398,3 AB	169,8 A
42	1532,3 A	165,9 A
F	18,8 **	66,7 **
CV (%)	38,1	14,4
Média geral (mg)	1086,6	118,8

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, $p = 0,05$

(1) valores transformados em $\ln x + 0,5$

(PMF) produção de matéria fresca

(PMS) produção de matéria seca

** significativo pelo teste F, $p < 0,01$

Os ganhos crescentes para a PMF que diferenciaram estatisticamente pelo teste de Tukey ($p = 0,05$)

foram observados até o 14º dia de cultura. Uma estabilização na PMF ocorreu até o 35º dia de cultura, quando houve um aumento aos 42 dias que não diferenciou estatisticamente da PMF obtida no 35º dia de cultura. A PMS apresentou aumento em crescimento até o 28º dia de cultura (Tabela 6).

Provavelmente, a diminuição do ritmo de crescimento após o 14º dia de cultura tanto para a PMF quanto para a PMS deve-se ao esgotamento nutricional do meio de cultura de uma ou mais substâncias necessárias para manter as taxas de crescimento, ao próprio crescimento do explante e/ou ao acúmulo de produtos inibidores resultantes do próprio metabolismo celular.

Na Tabela 7, pode-se observar os resultados das taxas de crescimento relativo médio da PMS das culturas cultivadas em meio líquido e sólido ao longo de intervalos de tempo. Os resultados mostraram que nos primeiros 7 dias, as culturas mantidas em meio líquido superaram em 3,5% na taxa de crescimento relativo médio para PMS com relação à taxa de crescimento relativo médio obtida em meio sólido. Neste período ocorreu a fase exponencial.

A estabilização das taxas de crescimento relativo médio para PMS após o 14º dia de cultura pode estar relacionada aos desequilíbrios fisiológicos que influenciaram no vigor da cultura (Tabela 7). Após 21º dia de cultura, alguns explantes, mantidos em meio de cultura líquido apresentaram crescimento em altura não uniforme das brotações, tendo folhas largas, vítreas e translúcidas. Estes aspectos caracterizam-se pela ocorrência de vitrificação, observados frequentemente em cultivo de plantas *in vitro*, conforme citação feita por PAQUES (1991).

Tabela 7. Taxas de crescimento relativo médio para a PMS de clones de *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido, obtidas a cada 7 dias, durante 42 dias de cultura

Intervalo de tempo (dias)	Taxa de Crescimento Relativo Médio da PMS(%)	
	Meio de cultura	
	líquido	sólido
0 - 7	14,6	11,1
7 - 14	10,5	10,3
14 - 21	1,3	1,1
21 - 28	1,6	1,2
28 - 35	1,3	2,4
35 - 42	0,8	0,3

(PMS) = produção de matéria seca

Esses desequilíbrios podem estar relacionados principalmente aos níveis endógenos de BAP e/ou, adicionados ao meio de cultura (DEBERGH, 1983). Segundo SODI & TOGNONI (1990), o aumento do nível de BAP ocasionou elevação da concentração de etileno na cultura.

Desta forma, o crescimento inicial mais acelerado em culturas cultivadas no meio líquido poderia estar absorvendo BAP com maior rapidez. Tendo em vista que o BAP estimula o metabolismo do nitrogênio, conseqüentemente, favorece o alongamento das brotações influenciando na produção endógena de AIA e etileno, que estão diretamente envolvidos na taxa de crescimento (SALISBURY & ROSS, 1985).

A taxa de crescimento relativo médio inicial de culturas cultivadas em meio sólido foi menor do que aquela obtida em meio líquido e estabilizou após o 14º dia

(Tabela 7). Isto pode estar relacionado à disponibilidade de nutrientes, visto que, a velocidade de difusão e absorção dos mesmos deve ter sido menor que em meio líquido decorrente da concentração e qualidade do ágar.

Conforme DEBERGH (1983), o aumento da concentração do ágar no meio de cultura reduz a PMF e PMS da cultura. Ainda, sintomas de deficiências nutricionais foram observados a partir do 28º dia de cultura. Neste período, alguns explantes apresentaram características de senescência. Entretanto, o crescimento das brotações foi uniforme.

A aplicação da análise de variância da regressão para as variáveis dependentes, PMF e PMS, obtidas em meio de cultura líquido e sólido, em função do período de cultura (dias) como variável independente demonstrou que o modelo logarítmico foi altamente significativo pelo teste F ($p < 0,01$).

Nesta análise, os valores de F para PMF (573,6) e PMS (887,6) obtidos em materiais cultivados em meio líquido foram superiores aos valores de F para PMF (437,9) e PMS (815,0) para materiais cultivados em meio sólido. Entretanto, os valores de F foram altamente significativos para todas as variáveis, nos 2 tipos de meios de cultura.

Nas Figuras 2 e 3, verifica-se a superioridade para a PMF e PMS em materiais cultivados em meio líquido. A produção de 150 mg de matéria seca obtida em 10 ml de meio de cultura pode ser alcançada no 26º dia de cultura, o que corresponde em média, 1305,1 mg de matéria fresca por explante.

Esses resultados indicam que o meio líquido não apresenta equilíbrio nutricional para aumentar a taxa de crescimento dos clones de *E. grandis*, após o 26º dia de cultura. Isto também pode explicar a perda de vigor da cultura após o 21º dia de cultura.

Figura 2. Produção de matéria fresca de clones de *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura

Entretanto, materiais em meio sólido não atingem o índice de PMS (150 mg de matéria seca/explante) durante o período da experimentação. Este fato, reforça a influência do ágar e de outros fatores na limitação do crescimento em cultura *in vitro*, como, desidratação do meio de cultura e acúmulo de etileno nos tecidos e no recipiente (BROOME & ZIMMERMAN, 1984) (Figura 2 e 3).

Figura 3. Produção de matéria seca de clones de *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura

O modelo logarítmico foi altamente significativo, pelo teste de F ($p < 0,01$) para a PMF e PMS em clones de *E. grandis* (Figuras 4, 5, 6 e 7).

Cada clone apresenta um potencial genético para a PMF e PMS, sendo estas variáveis influenciadas pelo tipo de meio de cultura. Todos os clones foram mais produtivos em meio de cultura líquido (Figuras 4 e 5).

O clone G4 apresentou as maiores PMF tanto cultivado em meio de cultura líquido quanto em meio sólido (Figuras 4 e 5). Este clone mostrou crescimento de parte aérea mais acelerado em meio líquido onde atingiu 150 mg de matéria seca por explante no 28º dia. No meio sólido isto foi possível somente no 40º dia de cultura (Figuras 5 e 7). Pela caracterização dos frutos da árvore matriz, este clone é um

provável híbrido de *E. grandis* x *E. botryoides* (Tabela 2 e Apêndice 1) o que pode estar influenciando no crescimento das brotações.

Porém, as maiores PMS foram alcançadas pelos clones G2 e G5, cultivados em meio líquido, podendo atingir 150 mg de matéria seca por explante no 23º e 24º dia de cultura, respectivamente (Figura 5). Entretanto, a eficiência destes clones para PMS em meio líquido não foi a mesma para PMF neste mesmo meio de cultura (Figura 4 e 5) e em meio sólido para a PMF e PMS (Figuras 6 e 7). Isto pode estar ligado às próprias características de crescimento das brotações destes clones: forma compacta com alta taxa de multiplicação para o clone G2, caracterizado através dos frutos da árvore matriz como *E. grandis* e, forma compacta com menor taxa de multiplicação para o clone G5, caracterizado através dos frutos da árvore matriz como um provável híbrido de *E. grandis* x *E. tereticornis* (Tabela 2 e Apêndice 1).

O clone G1, classificado através dos frutos da árvores matriz como um provável híbrido de *E. grandis* x *E. botryoides* (Tabela 2 e Apêndice 1), foi o menos produtivo tanto para PMF quanto para PMS quando cultivado em meio de cultura líquido (Figura 4 e 5). Este, foi o clone de menor PMS quando cultivado em meio sólido (Figura 7).

Essas especificidades para a PMF e PMS entre clones cultivados em meio sólido e líquido, podem expressar a complexidade do trabalho de cultura *in vitro* quando se deseja o crescimento e desenvolvimento de gemas, com uniformidade em altura e vigor das brotações. Isto, além de estar ligado ao potencial genético de cada clone, parece ser dependente de uma relação adequada entre nutrientes e clone,

e sua capacidade de absorção pelo explante. Adicionalmente, fatores ambientais como temperatura, intensidade e qualidade de luz, fotoperíodo e níveis de aeração no meio de cultura, chegam a ser variáveis imponderáveis que frequentemente restringem na repetição dos resultados, dificultando a definição de uma metodologia comercial à micropropagação.

Figura 4. Produção de matéria fresca de clones de *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS líquido durante 42 dias de cultura

Figura 5. Produção de matéria seca de clones de *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS líquido durante 42 dias de cultura

Figura 6. Produção de matéria fresca de clones de *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS sólido durante 42 dias de cultura

Figura 7. Produção de matéria seca de clones de *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS sólido durante 42 dias de cultura

4.2. EXPERIMENTO II: Influência do meio de cultura JADS líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* na 20ª subcultura

Na Tabela 8 estão expressos os resultados da análise de variância para PMF e PMS de clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*.

Tabela 8. Resumo das análises de variância para PMF e PMS de clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido avaliadas a cada 7 dias durante 42 dias de cultura

Fonte de variação	GL.	Quadrados médios	
		PMF	PMS ⁽¹⁾
Dia	6	18,0212 **	36,6971 **
Clone (dia)	28	0,3850 **	0,3501 **
Meio	1	4,8495 **	1,2182 **
Meio*Dia	6	0,3419 *	0,2232 ns
Resíduo	658	0,1428	0,1201
F		21,4 **	47,1 **
CV (%)		34,3	14,9
Média geral (mg)		1099,2	118,9

(ns) não significativo pelo teste F

(*) significativo pelo teste F, $p < 0,05$

(**) significativo pelo teste F, $p < 0,01$

(1) valores transformados em $\ln x + 0,5$

(PMF) produção de matéria fresca

(PMS) produção de matéria seca

Maior amplitude entre os dados foi observado para valores de PMF. O coeficiente de variação experimental para esta variável foi 34,3%, enquanto que para a PMS foi 14,9%, tendo seus valores transformados (Tabela 8).

As médias gerais para PMF e PMS foram 1099,2 mg e 118,9 mg por explante, respectivamente, o que corresponde a 10,8% de matéria seca por explante (Tabela 8).

Pode-se observar na Tabela 8 que a PMF e PMS apresentaram variações que diferenciaram estatisticamente pelo teste F ($p < 0,01$) durante os períodos de cultura (0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias). Os meios de cultura testados, líquido e sólido, e o efeito dos clones H3, H4, H8, H9 e H10, dentro dos períodos de cultura (dias) apresentaram diferenças estatísticas pelo teste F ($p < 0,01$) para as variáveis PMF e PMS, respectivamente. Entretanto, a interação entre os meios de cultura com períodos de cultura (dias) somente foi significativo pelo teste F ($p < 0,05$) para a variável PMF.

Os clones de híbridos de *Eucalyptus* avaliados apresentaram maiores PMF e PMS quando cultivados em meio de cultura sólido do que em meio de cultura líquido. Estes resultados diferenciaram estatisticamente pelo teste de Tukey ($p = 0,05$) conforme indicação na Tabela 9.

As culturas desenvolvidas em meio sólido mostraram bom vigor para o crescimento das brotações. Início de senescência na parte aérea foi observado após o 30º dia de cultura. Desta forma, o ágar pode ter sido uma barreira menos limitante aos processos de difusão e absorção de nutrientes.

Tabela 9. Valores médios obtidos para PMF e PMS de clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura

Meio de cultura	PMF (mg)	PMS (1) (mg)
Sólido	1182,4 A	121,3 A
Líquido	1016,0 B	116,1 B
F	21,4 **	47,1 **
CV (%)	34,3	14,9
Média geral (mg)	1099,2	118,9

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, $p = 0,05$

(1) valores transformados em $\ln x + 0,5$

(PMF) produção de matéria fresca

(PMS) produção de matéria seca

** significativo pelo teste F, $p < 0,01$

Entretanto, para culturas desenvolvidas em meio de cultura líquido pode-se observar alguns explantes com crescimento da parte aérea apresentando vitrificação após o 28º dia de cultura.

Desta forma, deve-se considerar a sensibilidade destes clones ao meio líquido. Considerando que a velocidade de difusão e absorção de nutrientes pela cultura é maior em meio líquido do que em meio sólido, este resultado sugere a possibilidade de haver uma diluição da concentração iônica deste meio de cultura quando utiliza-se o meio líquido para cultivar estes clones.

O crescimento de clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* diferenciou ao longo do período experimental. Os dados obtidos para PMF e PMS encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10. Valores médios para PMF e PMS de clones de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido

Dias	PMF (mg)		PMS ⁽¹⁾ (mg)	
0	448,1	E	35,3	F
7	733,0	D	64,0	E
14	860,4	D	95,0	D
21	1206,1	C	132,7	C
28	1578,4	A	178,8	A
35	1453,3	AB	160,4	B
42	1415,0	B	166,3	AB
F	21,4	**	47,1	**
CV (%)	34,3		14,9	
Média geral (mg)	1099,2		118,9	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, $p \leq 0,05$

(1) valores transformados em $\ln x + 0,5$

(PMF) produção de matéria fresca

(PMS) produção de matéria seca

** significativo pelo teste F, $p < 0,01$

Ganhos crescentes no crescimento de gemas que diferenciaram estatisticamente pelo teste de Tukey ($p = 0,05$) foram obtidos até o 28º dia de cultura, onde observou-se as maiores PMF e PMS (Tabela 10).

Posteriormente, houve reduções nas PMF e PMS do material vegetativo. Este fato provavelmente esteja relacionado: ao esgotamento do meio de cultura de uma ou mais substâncias envolvidas na manutenção das taxas de crescimento; ao próprio crescimento do explante e/ou a formação de produtos inibidores resultantes do próprio metabolismo celular.

As taxas de crescimento relativo médio da PMS indicadas na Tabela 11 mostram que ocorreu maior crescimento

dos explantes nos primeiros 7 dias, tanto para culturas mantidas em meio sólido quanto em meio líquido. Parece ocorrer neste período de crescimento exponencial maior absorção de BAP. Este influencia no metabolismo do nitrogênio favorecendo o crescimento das brotações por influência do aumento endógeno de AIA (SALISBURY & ROSS, 1985).

Decréscimos nas taxas de crescimento relativo médio, após o 7º dia, foram menos acentuados em culturas cultivadas em meio sólido até o 21º dia de cultura. Isso expressa o melhor desempenho do meio de cultura sólido para cultivar híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* (Tabela 11).

Tabela 11. Taxas de crescimento relativo médio para PMS de clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido, obtidas a cada 7 dias, durante 42 dias de cultura

Intervalo de tempo (dias)	Taxa de Crescimento Relativo Médio da PMS (%)	
	Meio de Cultura	
	Líquido	Sólido
0 - 7	8,0	9,0
7 - 14	6,3	5,0
14 - 21	3,4	6,0
21 - 28	5,9	2,7
28 - 35	-2,6	-0,5
35 - 42	0,7	0,4

(PMS) = produção de matéria seca

O material cultivado em meio líquido apresentou variações mais acentuadas nas taxas de crescimento relativo médio, após o 14º dia de cultura. Isto reflete um desequilíbrio no processo de cultivo que pode ser explicado

pela ocorrência de explantes com presença de vitrificação.

A aplicação de análise de variância da regressão para as variáveis dependentes PMF e PMS, similar ao experimento I, demonstrou que o modelo logarítmico foi altamente significativo pelo teste F ($P < 0,01$).

Os valores de F para PMF (606,9) e PMS (1017,7) obtidos para materiais cultivados em meio de cultura sólido foram superiores aos valores de F para PMF (237,3) e PMS (435,2) para materiais cultivados em meio líquido. Entretanto, todos os valores de F foram altamente significativos para todas as variáveis nos 2 tipos de meios de cultura.

Nas Figuras 8 e 9 estão expressas as PMF e PMS para culturas propagadas em meio líquido e em meio sólido.

Figura 8. Produção de matéria fresca de clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura

Figura 9. Produção de matéria seca de clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura

Na Figura 9, pode-se observar as curvas de PMS dos materiais cultivados em meio líquido e meio sólido. A produção estimada como potencial oferecido pelo meio de cultura básico de 150 mg de matéria seca por explante somente pode ser alcançada no 34º dia pelos materiais cultivados em meio sólido. Isto corresponde ao peso médio de matéria fresca de 1409,6 mg por explante. Materiais cultivados em meio líquido não atingem esta produção durante 42 dias.

Igualmente aos resultados do experimento I, as produtividades obtidas para híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* foram específicas para cada clone quando cultivados em meio líquido e em meio sólido (Figuras 10, 11, 12 e 13).

O modelo logarítmico foi altamente significativo, pelo teste F ($p < 0,01$) para a PMF e PMS de híbri-

dos de *E.grandis* x *E.urophylla* durante 42 dias de cultura.

Porém, o modelo linear foi mais adequado para expressar a PMF e PMS do clone H4 quando cultivado em meio líquido. Neste caso, a produção de 150 mg por explante de matéria seca pode ser alcançada no 28º dia de cultura, podendo atingir 200 mg de matéria seca por explante no 42º dia de cultura (Figura 13).

Esta resposta significa que o meio de cultura líquido e as condições de cultura tenham proporcionado uma condição de "staedy state". Assim, atingindo o equilíbrio entre a absorção de nutriente e conversão em matéria seca. Havendo, desta forma, a otimização do sistema de produção *in vitro* para o clone H4 nas condições do experimento.

O clone H4 cultivado em meio de cultura sólido atinge o potencial de produção estimada, no 41º dia de cultura. Isto representa que o ágar foi um obstáculo para o crescimento das gemas.

O clone H8 quando cultivado em meio de cultura sólido apresentou maior produtividade tanto para PMF quanto para PMS (Figuras 10 e 11). A produção de 150 mg de matéria seca foi alcançada no 26º dia de cultura. Enquanto em meio líquido esta produção somente pode ser alcançada no 40º dia de cultura (Figura 13).

Os clones H3 e H10 podem alcançar a produção de 150 mg de matéria seca no 32º dia de cultura quando cultivados em meio sólido (Figura 11). Em meio líquido o clone H3 não alcançou a produção estimada em 42 dias de cultura e o clone H10 pode alcançá-la no 37º dia de cultura.

Entretanto, o clone H9 parece ter menos afinidade ao meio de cultura básico. Em meio sólido, o clone H9 foi o menos produtivo. No meio líquido, este clone foi menos produtivo até o 20º dia de cultura. Posteriormente, superou a produção do clone H3 tanto para PMF quanto para PMS (Figuras 10, 11, 12 e 13).

Figura 10. Produção de matéria fresca de clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* cultivados em meio de cultura JADS sólido durante 42 dias de cultura

Figura 11. Produção de matéria seca de clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* cultivados em meio de cultura JADS sólido durante 42 dias de cultura

Figura 12. Produção de matéria fresca de clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* cultivados em meio de cultura líquido durante 42 dias de cultura

Figura 13. Produção de matéria seca de clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* cultivados em meio de cultura líquido durante 42 dias de cultura

A heterogeneidade na PMF e PMS pode ser explicada pela variabilidade genética dos clones. A caracterização das árvores matrizes (H3, H9 e H10) através dos frutos indicam que estes clones possam ser híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* (Tabela 2 e Apêndice 1). A necessidade nutricional específica para cada clone e fatores ambientais, como: a aeração no meio de cultura e controle do seu fluxo, o termoperíodo, a qualidade e a intensidade de luz e fotoperíodo, podem estar influenciando nas taxas de crescimento.

4.3. EXPERIMENTO III: Influência do meio de cultura JADS líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de um clone de híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* na 20ª subcultura

Os resultados das análises de variância para PMF e PMS de um clone de híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* estão indicados na Tabela 12.

Tabela 12. Resumo das análises de variância para PMF e PMS de um clone de híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* na fase de multiplicação de gemas cultivado em meio de cultura JADS líquido e sólido avaliadas a cada 7 dias durante 42 dias de cultura

Fontes de variação	GL.	Quadrados médios	
		PMF	PMS ⁽¹⁾
Dia	6	2,9321 **	4,7332 **
Meio	1	0,2627 (ns)	0,0621 (ns)
Meio x Dia	6	0,0243 (ns)	0,3750 **
Resíduo	126	0,0867	0,1249
F		15,9 **	18,9 **
CV (%)		27,1	15,3
Média geral (mg)		1088,7	114,4

(ns) não significativo pelo teste F

(**) significativo pelo teste F, $p < 0,01$

(1) valores transformados em $\ln x + 0,5$

(PMF) produção de matéria fresca

(PMS) produção de matéria seca

Os valores obtidos para PMF apresentaram maior amplitude do que aqueles obtidos para PMS. Os coeficientes de variação experimental para as variáveis PMF e PMS foram 27,0% e 15,3%, respectivamente, tendo os valores de PMS

transformados. Enquanto as médias gerais de PMF e PMS foram 1088,7 mg e 114,4 mg, respectivamente o que corresponde a 10,5% de matéria seca por explante (Tabela 12).

As variações de PMF e PMS para o clone U3 obtidas durante os períodos de cultura (0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias) foram altamente significativas quando avaliadas pelo teste F ($p < 0,01$). Entretanto, o tipo de meio de cultura, sólido e líquido, não foi significativo pelo teste F ($p < 0,05$) para as variáveis analisadas (Tabela 12).

Porém, a interação dos períodos de cultura (dias) com tipo de meio de cultura sólido e líquido foi altamente significativa quando avaliada pelo teste F ($p < 0,01$) para a PMS e não apresentou diferenças estatísticas para a PMF (Tabela 12).

As PMF e PMS avaliadas a cada 7 dias, durante 42 dias, encontram-se na Tabela 13. Observou-se que para o variável PMF, os ganhos em peso que apresentam diferenças estatísticas ocorreram até o 28º dia, enquanto que para a PMS, o mesmo aconteceu até o 21º dia de cultura.

A estabilização do crescimento do material a partir do 21º de cultura pode estar relacionado ao esgotamento nutricional do meio de cultura e outros fatores já discutidos no experimento I e II relacionados ao agente solidificante e distúrbios fisiológicos, desequilíbrios nutricionais e níveis inadequados de etileno.

A taxa de crescimento relativo médio obtida nos primeiros 7 dias em culturas cultivadas em meio líquido superou em aproximadamente em 50% a taxa de crescimento relativo médio alcançada em meio sólido (Tabela 14). Isto

representa que o fluxo de entrada de nutrientes, durante este período, foi maior em culturas cultivadas em meio líquido.

Tabela 13. Valores médios obtidos para PMF e PMS para um clone de híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* na fase de multiplicação cultivado em meio de cultura JADS líquido e sólido

Dias	PMF	PMS (1)
0	560,5 D	43,3 D
7	654,4 D	67,5 C
14	941,7 C	100,6 B
21	1136,0 BC	124,6 AB
28	1365,9 AB	153,7 A
35	1520,2 A	144,0 AB
42	1442,6 A	167,6 A
F	15,9 **	18,9 **
CV (%)	27,1	15,3
Média geral (mg)	1088,7	114,4

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, $p = 0,05$

(1) valores transformados em $\ln x + 0,5$

(PMF) produção de matéria fresca

(PMS) produção de matéria seca

(**) significativo pelo teste F, $p < 0,01$

Em meio líquido, após o 7º dia de cultura houve maiores oscilações nas taxas de crescimento relativo médio (Tabela 14). Isto talvez possa ser explicado devido ao vigor do material que após o 14º dia apresentou explantes com presença de vitrificação. Esta disfunção fisiológica pode estar relacionada ao desequilíbrio nutricional do meio de cultura e maior absorção de BAP. Consequentemente, a ocorrência do aumento do metabolismo de nitrogênio e este, estimula o alongamento celular e atividades das auxinas com formação de etileno (SALISBURY & ROSS, 1985).

Tabela 14. Taxas de crescimento relativo médio para PMS de um clone de híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* cultivado em meio de cultura JADS líquido e sólido, obtidas a cada 7 dias, durante 42 dias de cultura

Intervalo de tempo (dias)	Taxa de Crescimento Relativo da PMS (%)	
	Meio de cultura	
	líquido	sólido
0 - 7	8,1	4,4
7 - 14	5,0	6,6
14 - 21	0,2	6,1
21 - 28	5,6	0,6
28 - 35	-3,3	1,2
35 - 42	4,5	0,1

(PMS) = produção de matéria seca

Outrossim, o clone U3 cultivado em meio sólido apresenta taxas de crescimento relativo médio crescente até o 14º dia de cultura e praticamente constante até o 21º dia de cultura (Tabela 14). Posteriormente, houve uma redução decorrente de fatores relacionados à disponibilidade de nutrientes devido a presença de ágar e/ou de condições ambientais e microambientais para o crescimento da cultura.

A aplicação de análise de variância de regressão para as variáveis dependentes PMF e PMS obtidas em meio de cultura líquido e sólido, em função dos períodos de cultura (dias) como variável independente, demonstrou que o modelo linear foi altamente significativo pelo teste F ($p < 0,01$), para PMF e PMS obtida em meio líquido e PMF obtida em meio sólido. Enquanto que o modelo logarítmico foi altamente significativo pelo teste F ($p < 0,01$) para a PMS obtida em meio de cultura sólido.

Nesta análise de variância da regressão os valores de F para o PMF (136,0) e PMS (157,7) obtidos por materiais cultivados em meio sólido foram superiores aos valores F para PMF (65,70) e PMS (59,96) para culturas cultivadas em meio líquido. Todavia, os valores de F foram altamente significativos para todas as variáveis, nos 2 tipos de meio de cultura.

Na Figura 14 pode-se verificar os ganhos de PMF ao longo do período experimental. As médias obtidas para PMF foram maiores em meio sólido do que em meio líquido.

O comportamento linear da curva de crescimento para PMF do clone U3 pode representar a otimização dos meios de cultura, sólido e líquido (Figura 14). Entretanto, em condições de propagação em meio líquido parece atingir a condição de "steady state" decorrente do comportamento linear para a PMS (Figura 15), onde a produção máxima de 150 mg de matéria seca por explante pode ser alcançada no 35º dia de cultura. Em meio sólido, esta produção pode ser atingida no 42º dia de cultura.

Figura 14. Produção de matéria fresca de um clone de híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* cultivado em meio de cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura

Figura 15. Produção de matéria seca de um clone de híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* cultivado em meio de cultura JADS líquido e sólido durante 42 dias de cultura

4.4. EXPERIMENTO IV: Influência do meio de cultura JADS bifásico no crescimento e desenvolvimento de gemas de clones de *E. grandis* (G2 e G5), na 40ª subcultura

O acréscimo periódico de meio de cultura JADS líquido sob volume fixo de meio de cultura JADS sólido ou meio de cultura bifásico proporcionou variações no crescimento e desenvolvimento de gemas de *E. grandis* estatisticamente significativas.

Os resultados da análise de variância para a PMF e PMS em clones de *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS bifásico encontram-se nas Tabelas 15 e 16, respectivamente.

Tabela 15. Resumo da análise de variância para PMF de clones de *E. grandis* (G2 e G5), na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico avaliadas a cada 7 dias durante 35 dias de cultura

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios ⁽¹⁾					
		0	7	14	21	28	35
		(dias)					
Clone	1	0,9925**	0,8797**	1,8385**	2,7266**	0,0414(ns)	0,0893(ns)
Trat	4	0,0172(ns)	0,1635(ns)	2,2341**	3,2930**	5,8916**	4,8492**
ClonexTrat	4	0,0668(ns)	0,1066(ns)	0,1191(ns)	0,4094**	0,2166*	0,2838*
Resíduo	90	0,0663	0,0867	0,1027	0,0982	0,0781	0,0775
F		2,2*	2,5*	12,1**	19,8**	34,8**	29,5**
CV(%)		5,9	5,2	4,8	4,3	3,6	3,7
Média geral (mg)		77,6	295,4	842,7	1615,0	2232,0	2061,0

(ns) não significativo pelo teste F

* significativo pelo teste F, $p < 0,05$

** significativo pelo teste F, $p < 0,01$

(1) valores transformados em $\ln x + 0,5$

(PMF) produção de matéria fresca

Tabela 16. Resumo da análise de variância para PMS de clones de *E. grandis* (G2 e G5), na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico avaliadas a cada 7 dias durante 35 dias de cultura

Fonte de	GL	Quadrados médios ⁽¹⁾					
Variação		0	7	14	21	28	35
(dias)							
Clone	1	0,0565(ns)	2,3944**	3,0342**	2,1711**	0,4349*	0,0234(ns)
Tratamento	4	0,0209(ns)	0,1011(ns)	1,1079**	2,9068**	2,8851**	2,8000**
ClonexTrat	4	0,0921(ns)	0,1349(ns)	0,0517(ns)	0,3572**	0,0688(ns)	0,0605(ns)
Resíduo	90	0,0668	0,0798	0,0661	0,0844	0,0722	0,0614
F		0,8(ns)	4,6**	12,8**	20,0**	18,8**	20,7**
CV(%)		11,8	7,9	5,8	5,8	5,0	4,6
Média geral (mg)		9,1	36,1	89,9	157,5	224,6	228,9

(ns) não significativo pelo teste F

* significativo, pelo teste F, $p < 0,05$

** significativo, pelo teste F, $p < 0,01$

(1) valores transformados em $\ln x + 0,5$

(PMS) produção de matéria seca

A análise de variância dos dados de PMF coletados em intervalos de 7 dias, incluindo as médias do peso de matéria fresca obtidas no dia do início do experimento mostrou diferenças significativas pelo teste F ($p < 0,01$) entre os clones G2 e G5 até o 21º dia de cultura. Para o fator tratamento, o mesmo aconteceu a partir do 14º dia de cultura. Houve também interação significativa entre clone e tratamento a partir do 21º dia de cultura (Tabela 15). Isto significa que tanto os tratamentos aplicados quanto os clones influenciaram na PMF de *E. grandis*

A análise de variância dos dados de PMS indicou diferenças significativas pelo teste F ($p < 0,01$) entre os clones G2 e G5 a partir do 7º ao 21º dia de cultura e pelo teste F ($p < 0,05$) no 28º dia de cultura. Entretanto, o efeito de clone não apresentou diferenças estatísticas aos 35 dias de culturas. Para o fator tratamento, houve efeito significativo da PMS a partir do 14º dia de cultura.

Interação significativa entre clone e tratamento somente foi observada para dados obtidos no 21º dia de cultura, evidenciando a influência dos tratamentos e de clones sobre a PMS dos clones G2 e G5 (Tabela 16).

A uniformidade para os dados de PMF e PMS pode ser avaliada pelos respectivos coeficientes de variação que se mantiveram baixos e diminuindo seus valores ao longo dos períodos de avaliação (Tabela 15 e 16). Isto representa que o crescimento e desenvolvimento das gemas foi uniforme e, que o valor nutritivo do meio de cultura utilizado aliado aos acréscimos periódicos de meio de cultura líquido foi importante para o crescimento das gemas.

Pode-se observar na Tabela 15 que a PMF teve aumento máximo de 28,7 vezes aos 28 dias de cultura, enquanto que, a PMS aumentou 25,1 vezes aos 35 dias de cultura (Tabela 16).

As comparações entre médias de PMF e PMS dos clones G2 e G5 a cada 7 dias com acréscimo periódicos de meio de cultura JADS líquido, analisadas pelo teste de Tukey ($p = 0,05$), demonstraram que ocorreu variações entre o crescimento de gemas para cada clone ao longo do período (Tabela 17).

O clone G2 apresentou maiores PMF e PMS ao longo do período a partir do 7º dia de cultura diferenciando estatisticamente das médias das produções obtidas pelo clone G5 até o 21º dia cultura. Aos 28 dias de cultura, as médias não apresentaram diferenças estatística para PMF embora para PMS tenha ocorrido diferença estatística. Os resultados para as médias de PMF e PMS, aos 35 dias de cultura, não diferenciaram estatisticamente entre os clones

G2 e G5 representando igualdades para o crescimento de gemas (Tabela 17).

Tabela 17. Valores médios da PMF e PMS de clones de *E. grandis* (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico avaliadas a cada 7 dias durante 35 dias de cultura

Clone	DIA											
	0		7		14		21		28		35	
	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS
	-----mg-----											
G2	70,5 B	8,9A	321,7A	41,7A	965,4A	105,6A	1917,8A	182,3A	2269,9A	239,5A	1991,7A	231,9A
G5	84,8A	9,3A	269,1 B	30,5 B	720,2 B	74,3 B	1312,3 B	132,7 B	2194,5A	209,9 B	2130,4A	225,9A
F	2,2 *	0,8ns	2,5*	4,6**	2,1*	12,8**	19,8**	20,0**	34,8**	18,8**	29,5**	20,7**
CV(%)	5,9	11,8	5,2	7,9	4,8	5,8	4,3	5,8	3,6	5,0	3,7	4,6
Média	77,6	9,1	295,4	36,1	842,7	89,9	1615,0	157,5	2232,0	224,6	2061,0	288,9

Médias seguidas pelo mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, $p = 0,05$

Valores transformados para $\ln x + 0,5$.

ns não significativo pelo teste F

* significativo pelo teste F, $P < 0,05$

** significativo pelo teste F, $P < 0,01$

Adicionalmente, na Tabela 17 pode-se observar reduções das médias de PMF dos clones G2 e G5 e PMS do clone G5 aos 35 dias de cultura. Estas reduções nas taxas de crescimento podem estar relacionadas a um esgotamento nutricional do meio de cultura e/ou de uma ou mais substâncias necessárias à manutenção do crescimento. Outro fator importante para esta redução pode relacionar-se ao próprio crescimento do explante que estaria favorecendo limitações ao transporte de nutrientes no próprio explante.

Por outro lado, a possível formação de substâncias inibidoras ao crescimento originárias do metabolismo do explante e liberadas ao meio de cultura sólido e/ou líquido sobrenadante possa explicar as reduções de ganhos nas médias de produções no último período de avaliação (Tabela 17).

As comparações entre as médias dos tratamentos para PMF e PMS dos clones G2 e G5, analisadas pelo teste Tukey ($p = 0,05$), indicam que a aplicação de 5 ml de meio de cultura líquido por explante, no 7º, 14º e 21º dia de cultura (T4) apresentou as maiores PMF e PMS nas avaliações realizadas no 21º, 28º e 35º dia de cultura. Entretanto, o tratamento T4 somente diferenciou estatisticamente do tratamento T3, que recebeu aplicação de 5 ml de meio de cultura líquido por explante no 7º e 14º dia de cultura para a PMF obtida no 35º dia de cultura (Tabela 18).

Tabela 18. Valores médios da PMF e PMS de clones de *E. grandis* (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico avaliadas a cada 7 dias durante 35 dias de cultura

Tratamento	DIA											
	0		7		14		21		28		35	
	PMF (mg)	PMS	PMF (mg)	PMS	PMF (mg)	PMS	PMF (mg)	PMS	PMF (mg)	PMS	PMF (mg)	PMS
T1	79,3A	9,3A	332,4A	36,0A	609,6 B	71,6 B	822,9 D	86,1 B	903,7D	118,4 D	947,6 D	123,4C
T2	75,3A	8,8A	302,9A	38,4A	904,4A	97,3A	1594,1 B	170,3A	2017,5 B	227,8BC	1637,2 C	207,2B
T3	76,5A	9,4A	264,5A	33,4A	1075,2A	108,7A	2072,9AB	195,3A	2964,2A	271,5AB	2445,4B	273,8A
T4	81,0A	9,3A	296,5A	37,2A	1076,2A	105,5A	2401,5A	224,1A	3708,5A	320,3A	3422,6A	330,8A
T5	76,1A	8,7A	280,7A	35,4A	548,5 B	66,8 B	1183,9 C	111,8 B	1566,3C	185,3 C	1852,4BC	209,6B
F	2,2 *	0,8ns	2,5*	4,6**	2,1*	12,8**	19,8**	20,0**	34,8**	18,8**	29,5**	20,7**
CV(%)	5,9	11,8	5,2	7,9	4,8	5,8	4,3	5,8	3,6	5,0	3,7	4,6
Média	77,6	9,1	295,4	36,1	842,7	89,9	1615,0	157,5	2232,0	224,6	2061,0	288,9

Médias seguidas pelo mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, $p = 0,05$

Valores transformados para $\ln x + 0,5$

T1: 20 ml de meio de cultura sólido por frasco;

T2: idem T1 e no 7º dia de cultura acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco;

T3: idem T1 e no 7º dia de cultura acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco, no 14º dia, retirou-se a quantidade de meio de cultura líquido sobrenadante e dispensou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco;

T4: idem T3 e no 21º dia de cultura, retirou-se a quantidade de meio de cultura líquido sobrenadante e dispensou-se 10 ml de meio de cultura por frasco;

T5: idem T1 e no 14º dia acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco.

Pode-se observar na Tabela 18 que o cultivo *in vitro* somente em meio sólido (T1) apresentou o menor crescimento de gemas de *E. grandis* do que em outros tratamentos durante o período experimental. O acréscimo de 5

ml de meio líquido por explante no 7º dia de cultura (T2) proporcionou aumento em PMF e PMS que diferenciaram estatisticamente pelo teste Tukey ($p = 0,05$) das PMF e PMS obtidas no 14º e 21º dia de cultura e para PMF no 28º dia de cultura, atingidas pelo tratamento T5 que também recebeu 5 ml de meio líquido por explante no 14º dia de culturas. Entretanto, para as avaliações obtidas no 28º dia de cultura para PMS e 35º dia de culutra para PMF e PMS não houveram diferenças estatísticas entre os tratamentos T2 e T5.

Isto representa que as maiores taxas de crescimento ocorreram nos primeiros 7 dias de cultura e que um acréscimo de meio de cultura no 7º dia favoreceu a manutenção do ritmo de crescimento que foi superior em 39,3% e 31,3% no 14º dia de cultura, 25,7% e 34,3% no 21º dia de cultura, 22,3% e 18,6% no 28º dia de cultura para a PMF e PMS respectivamente, quando comparadas com as produções obtidas pelo tratamento T5. Estes resultados reforçam as respostas superiores para PMF e PMS obtidas nos tratamentos T3 e T4 discutidas anteriormente.

As porcentagens totais para PMF e PMS obtidas em cada tratamento, expressos na Figura 16, indicam as superioridades de produções conforme ocorreu maior disponibilidade de nutrientes às culturas.

Resultados obtidos sobre as taxas de crescimento relativo médio para PMS dos clones G2 e G5 indicaram potenciais diferentes entre eles para o crescimento de gemas. O clone G2 parece ser o mais produtivo para a formação de gemas apresentando as maiores taxas de crescimento relativo médio nos primeiros 14 dias de cultura com exceção para a taxa de crescimento relativo médio entre o 7º e o 14º de cultura, que foi superior para o clone G5

somente para o tratamento T3 (Tabela 19).

Figura 16. Porcentagens de produções de matéria fresca e seca de clones de *E. grandis* (G2 e G5) obtidas em meio de cultura JADS bifásico aos 35 dias de cultura

As taxas de crescimento relativo médio para os tratamentos T3 e T4 mostraram que os acréscimos periódicos de meio de cultura líquido favoreceram a manutenção de taxas de crescimento mais elevadas até o 21º dia de cultura como pode ser observado na Tabela 19.

Entretanto, as taxas de crescimento relativo médio do tratamento T4, obtidas entre o 21º dia e o 28º dia de cultura, foram de 3,73% para o clone G2 e 6,97% para o clone G5 (Tabela 19). Essas reduções podem ser explicadas pela alta taxa de multiplicação atingida por este tratamento e o acréscimo de 5 ml do meio de cultura por explante possivelmente tenha sido insuficiente para manter o potencial de crescimento da cultura.

Tabela 19. Taxa de crescimento relativo médio para PMS de clones de *E. grandis* (G2 e G5) cultivados em meio de cultura JADS bifásico, obtidas a cada 7 dias, durante 35 dias de cultura

Tratamento	Intervalo de Tempo (dias)	Taxa de crescimento relativo médio da PMS(%)	
		G2	G5
T1	0 - 7	21,15	17,32
	7 -14	10,90	8,32
	14 -21	2,08	3,39
	21 -28	4,27	4,94
	28 -35	0,02	1,27
T2	0 - 7	21,76	19,98
	7 -14	13,57	12,87
	14 -21	5,05	11,24
	21 -28	6,07	2,22
	28 -35	-3,27	0,58
T3	0 - 7	23,33	11,64
	7 -14	14,91	19,74
	14 -21	10,42	5,18
	21 -28	0,82	9,98
	28 -35	0,97	-0,77
T4	0 - 7	21,95	17,26
	7 -14	15,66	13,64
	14 -21	10,38	11,40
	21 -28	3,73	6,97
	28 -35	-0,84	1,90
T5	0 - 7	21,58	18,23
	7 -14	9,80	8,07
	14 -21	7,18	7,61
	21 -28	6,31	8,33
	28 -35	0,94	2,65

(PMS) produção de matéria seca

T1: 20 ml de meio de cultura sólido por frasco;

T2: idem T1 e no 7^a dia de cultura acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco;

T3: idem T1 e no 7^a dia de cultura acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco, no 14^a dia, retirou-se a quantidade de meio de cultura líquido sobrenadante e dispensou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco;

T4: idem T3 e no 21^a dia de cultura, retirou-se a quantidade de meio de cultura líquido sobrenadante e dispensou-se 10 ml de meio de cultura por frasco;

T5: idem T1 e no 14^a dia acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco.

A potencialidade nutricional do meio de cultura JADS foi estabelecida para produzir 150 mg de matéria seca por explante. Na Tabela 20 pode ser verificado que somente o tratamento T2 (clone G2) utilizando 15 ml de meio de cultura JADS, sendo 10 ml de meio sólido e 5 ml de meio líquido, superou a estimativa de PMS por explante.

Tabela 20. Produções de matéria seca obtida e estimada de clone de *E. grandis* (G2 e G5) cultivados em meio de cultura JADS bifásico

Tratamento	Clone	PMS (mg) por explante	
		Estimada	Obtida (média)*
T1	G2	150	132,0
	G5	150	114,8
T2	G2	225	245,5
	G5	225	219,0
T3	G2	300	288,6
	G5	300	273,3
T4	G2	375	352,2
	G5	375	329,6
T5	G2	225	211,6
	G5	225	207,5

(PMS) produção de matéria seca

* média máxima da produção de matéria seca no 28º ou 35º dia de cultura

T1: 20 ml de meio de cultura sólido por frasco;

T2: idem T1 e no 7º dia de cultura acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco;

T3: idem T1 e no 7º dia de cultura acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco, no 14º dia, retirou-se a quantidade de meio de cultura líquido sobrenadante e dispensou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco;

T4: idem T3 e no 21º dia de cultura, retirou-se a quantidade de meio de cultura líquido sobrenadante e dispensou-se 10 ml de meio de cultura por frasco;

T5: idem T1 e no 14º dia acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco.

O clone G5 apresentou as maiores diferenças entre a produção estimada e a produção obtida em todos os tratamentos. Isto representa que este clone possui menor capacidade de crescimento e desenvolvimento de gemas nessas condições de cultura.

Os resultados da análise de variância da regressão de PMF e PMS dos clones G2 e G5 contribuíram para avaliar a importância do acréscimo de meio de cultura líquido em intervalos de tempo para aumentar a taxa de multiplicação. O modelo logarítmico foi altamente significativo quando avaliado pelo teste F ($p < 0,01$) para PMF e PMS em diferentes acréscimos de meio de cultura líquido (Figuras 17, 18, 19 e 20).

As Figuras 17 e 18 mostram que o tratamento T4 foi o mais produtivo em matéria fresca e seca seguido dos tratamentos T3, T2, T5 e T1 quando avaliou-se o clone G2.

O clone G2 atingiu a produção de 150 mg de matéria seca por explante no 14º dia de cultura no tratamento T4, entre o 14º e 21º dia no tratamento T3, entre o 21º e 28º dia nos tratamentos T2 e T5 enquanto que o tratamento T1 não conseguiu alcançar a produção estimada de matéria seca durante o período de experimentação (Figura 18).

As PMF (Figura 19) obtidas pelo clone G5 foram menores do que aquelas alcançadas pelo clone G2 para todos os tratamentos. A sequência de tratamentos mais produtivos para PMF foram iguais àsquelas apresentadas pelo clone G2 (Figura 17). Entretanto, para a PMS (Figura 20) observou-se produções semelhantes para os tratamentos T2 e T3, o que possivelmente possa ser explicado pela superioridade de PMF alcançada pelo tratamento T2.

As Figuras 21 e 22 mostram as diferenças de PMF dos clones G2 e G5 nos diferentes tratamentos no 35º dia de cultura. Pode-se observar as características do explante-padrão e o vigor do material que em nenhum tratamento apresentou explantes com presença de vitrificação.

As diferenças no crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação dos clones G2 e G5 demonstraram a variação genética entre os clones. A caracterização dos frutos das árvores matrizes (Tabela 2 e Apêndice 1) indicando o clone G2 como *E.grandis* e o clone G5 como um provável híbrido de *E.grandis* x *E.tereticornis* podem justificar as diferenças de produtividades. O meio de cultura JADS definido para a cultura de *E.grandis* deve ter sido mais específico ao clone G2 do que ao clone G5.

Figura 17. Produção de matéria fresca do clone de *E. grandis* (G2) cultivado em meio de cultura JADS bifásico durante 35 dias de cultura

Figura 18. Produção de matéria seca do clone de *E. grandis* (G2) cultivado em meio de cultura JADS bifásico durante 35 dias de cultura

Figura 19. Produção de matéria fresca do clone de *E. grandis* (G5) cultivado em meio cultura JADS bifásico durante 35 dias de cultura

Figura 20. Produção de matéria seca do clone de *E. grandis* (G5) cultivado em meio de cultura JADS bifásico durante 35 dias de cultura

Figura 21. Características da fase de multiplicação de gemas do clone de *E. grandis* (G2) cultivado em meio de cultura JADS bifásico em diferentes tratamentos durante 35 dias de cultura

Figura 22. Características da fase de multiplicação de gemas do clone de *E. grandis* (G5) cultivado em meio de cultura JADS bifásico em diferentes tratamentos durante 35 dias de cultura

4.4.1. Número total de brotações dos clones de *E. grandis* (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico

Os resultados da análise de variância para o número total de brotações avaliados no 14º, 21º, 28º e 35º dia de cultura para os clones de *E. grandis* (G2 e G5) encontram-se na Tabela 21.

Tabela 21: Resumo da análise de variância para o número total de brotações de clones *E. grandis* (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico avaliados no 14º, 21º, 28º e 35º dia de cultura

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios ⁽¹⁾			
		Dia	14	21	28
Clone	1	5,4305**	0,1239 ^{ns}	2,8211**	3,7036**
Tratamento	4	2,8291**	2,6570**	5,2495**	4,1715**
Clone x Trat	4	0,7759**	0,7347**	0,1184 ^{ns}	0,2869*
Resíduo	90	0,1675	0,0964	0,0921	0,1021
F		13,1 **	15,7 **	29,3 **	23,4 **
CV (%)		11,8	7,8	6,4	6,6
Média Geral		38,0	60,2	143,8	153,9

ns - não significativo pelo teste F

* - significativo pelo teste F, $p < 0,05$

** - significativo pelo teste F, $p < 0,01$

(1) - todos os valores foram transformados em $\ln x + 0,5$

Os valores de F foram altamente significativos para o número total de brotações obtidas no 14º, 21º, 28º e 35º dia de cultura. Os coeficientes de variação apresentaram reduções de 11,8% (14º dia) para 6,6% (35º dia), conforme

aumentou o número médio de brotações por explante (Tabela 21).

O efeito do clone foi altamente significativo pelo teste F ($p < 0,01$) no 14º, 28º e 35º dia de cultura. Enquanto que o efeito dos tratamentos foi altamente significativo para todos os períodos de avaliação. Contudo, não houve interação significativa entre os efeitos do clone e do tratamento somente para a avaliação no 28º dia de cultura (Tabela 21). Isto significa que no 14º, 21º e 35º dia de cultura houve influências dos tratamentos aplicados e dos clones no crescimento e desenvolvimento de gemas.

Os clones G2 e G5 apresentaram variações genéticas para a capacidade de indução de gemas diferenciando estatisticamente pelo teste de Tukey ($p = 0,05$) sendo o clone G5 aquele que apresentou o maior número de brotações contáveis a partir do 14º dia de cultura. Entretanto, na avaliação realizada no 21º dia de cultura não houve diferença estatística entre as médias dos clones G2 e G5 (Tabela 22). Isto talvez possa ser explicado pelo fato do clone G2 apresentar, no 14º dia de cultura uma quantidade de brotações com crescimento em tufo compacto e incontáveis.

Na Tabela 23 pode-se observar que os tratamentos que tiveram acréscimos periódicos de meio líquido, em quantidade pequena e repetitiva, a cada 7 dias de cultura, proporcionaram aumentos do número de brotações em clones de *E. grandis*.

Tabela 22: Valores médios para número total de brotações dos clones de *E. grandis* (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico avaliados no 14º, 21º, 28º e 35º dia de cultura

Clones	Número de brotações ⁽¹⁾				
	Dia	14	21	28	35
G2		28,7 A	62,2 A	108,6 A	111,1 A
G5		47,4 B	58,2 A	178,9 B	196,6 B
F		13,1 **	15,7 **	29,3 **	23,4 **
CV (%)		11,8	7,8	6,4	6,6
Média Geral		38,0	60,2	143,8	153,9

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, $p = 0,05$

** significativo pelo teste F, $p < 0,01$

(1) todos os valores foram transformados em $\ln x + 0,5$

As médias para o número de brotações obtidas para o tratamento T2 durante os períodos de avaliação, com exceção para o 35º dia, foram superiores àsquelas obtidas pelo tratamento T5 diferenciando estatisticamente pelo teste Tukey ($p = 0,05$) até o 21º dia de cultura (Tabela 23).

Na avaliação realizada no 14º dia de cultura, onde os tratamentos T2, T3 e T4 haviam recebido, no 7º dia de cultura, acréscimos de 5 ml de meio de cultura líquido por explante houve um aumento médio de 112,7% para o número de brotações por explante quando comparando com a média dos tratamentos T1 e T5 que não haviam recebido acréscimos de meio de cultura líquido.

Tabela 23: Valores médios para número total de brotações dos clones *E. grandis* (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados no meio de cultura JADS bifásico avaliados no 14º, 21º, 28º e 35º dia de cultura

Tratamento	Número de Brotações (1)								
	Dia	14		21		28		35	
T1		23,9	B	27,0	C	43,4	C	51,2	D
T2		43,2	A	65,9	A	101,1	B	111,8	C
T3		53,4	A	79,6	A	218,0	A	192,0	AB
T4		48,3	A	86,9	A	265,3	A	291,5	A
T5		21,6	B	41,7	B	91,2	B	123,0	BC
F		13,1	**	15,7	**	29,3	**	23,4	**
CV (%)		11,8		7,8		6,4		6,6	
Média Geral		38,0		60,2		143,8		153,9	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, $p = 0,05$

(1) Todos os valores foram transformados em $\ln x + 0,5$

T1: 20 ml de meio de cultura sólido por frasco;

T2: idem T1 e no 7º dia de cultura acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco;

T3: idem T1 e no 7º dia de cultura acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco, no 14º dia, retirou-se a quantidade de meio de cultura líquido sobrenadante e dispensou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco;

T4: idem T3 e no 21º dia de cultura, retirou-se a quantidade de meio de cultura líquido sobrenadante e dispensou-se 10 ml de meio de cultura por frasco;

T5: idem T1 e no 14º dia acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco.

Observa-se na Tabela 23 que a média obtida entre os tratamentos T3 e T4 proporcionou um aumento de 208,3% para o número de brotações quando comparada com a testemunha (T1) e avaliados no 21º dia de cultura.

Por outro lado, as médias para o número de brotações obtidas no 28º dia de cultura não apresentaram diferenças estatísticas entre tratamentos T3 e T4 pelo teste de Tukey ($p = 0,05$). Entretanto, o tratamento T4, que recebeu acréscimo de 5 ml de meio de cultura líquido por explante no 7º, 14º e 21º dia de cultura, proporcionou um aumento de

número de brotações de 21,7% quando comparado com a média do tratamento T3 que não recebeu acréscimo de meio líquido após o 14º dia de cultura (Tabela 23).

Todavia o número de brotações obtido pelo tratamento T4, no 28º dia de cultura, foi superior em 511,3% ao resultado alcançado pela testemunha (T1) conforme indicação da Tabela 23.

Na avaliação realizada no 35º dia de cultura, pode-se observar que o melhor tratamento para elevar o número de brotações foi o T4. Neste tratamento foi possível obter 469,3% a mais do número de brotações com relação à testemunha, seguido do tratamento T3 (275,0%), T5 (140,2%) e T2 (118,3%) (Tabela 23).

Esses resultados demonstraram que o aumento do número de brotações foi dependente da disponibilidade de meio de cultura ao longo do período experimental. Pode-se observar que em todos os tratamentos os quais adicionou-se meio de cultura líquido houve aumentos mais acentuados do número de brotações durante os 14 dias subsequentes após o último acréscimo do meio de cultura. Entretanto, para o tratamento T4 isto somente foi observado após 7 dias do último acréscimo de meio de cultura líquido onde o aumento para o número de brotações neste tratamento foi de 205,3% entre o 21º e 28º dia de cultura e 9,8% entre o dia 28º e 35º dia de cultura. Isto representa que o aumento do número de brotações foi limitado pelo próprio crescimento do explante.

4.4.2. Distribuição em classes de altura do número de brotações de clones de *E. grandis* (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico

Os resultados da análise de variância para a distribuição em classes de altura do número de brotações de clones de *E. grandis* (G2 e G5) na fase de multiplicação avaliados no 14º, 21º, 28º e 35º dia de cultura cultivados em meio de cultura JADS bifásico encontram-se nas Tabelas 24a e 24b.

Os valores de F foram altamente significativos para o número de brotações que apresentaram altura de até 1,5cm em diferentes períodos de avaliação. Os coeficientes de variação foram mais elevados na avaliação realizada no 14º dia de cultura onde observou-se as menores médias para o número de brotações nas diferentes classes de altura das mesmas. Posteriormente, conforme houve aumento das médias do número de brotações nos intervalos de altura, os coeficientes de variação diminuíram. Isto representa que o acréscimo de meio de cultura líquido favoreceu não somente o aumento do número de brotações como também proporcionou a uniformidade e padronização do tamanho das brotações (Tabelas 24a e 24b e Figuras 21 e 22).

Tabela 24a. Resumo da análise de variância do número de brotações dos clones *E. grandis* (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico com altura $\leq 0,5$ cm, $> 0,5$ a $1,0$ cm e $> 1,0$ a $1,5$ cm, avaliados no 14º e 21º dia de cultura

Fonte de variação		QUADRADOS MÉDIOS						
		GL	DIA	14			21	
		Classe de Altura (cm)	A(2)	B(1)	C(1)	A(1)	B(1)	C(1)
Clone	1		49,4867**	3,7935**	0,3187ns	0,0814ns	0.8150*	0.0505ns
Trat	4		2,2286*	2,3619**	15,6911**	3,0836**	1.3182**	6.5810**
Clone x Trat	4		2,2613*	1,1270*	1,7457*	0,7063ns	0.4221ns	3.3173**
Resíduo	90		0,8269	0,3295	0,6443	0,3680	0.1642	0.2593
F			9,0**	5,9**	12,0**	4,6**	5,2**	16,9**
CV (%)			24,2	24,0	55,2	22,3	13,2	22,6
Média geral			15,6	13,0	7,5	19,2	23,8	13,0
(ns) não significativo pelo teste F					A altura ≤ 0,5 cm			
(*) significativo pelo teste F, p < 0,05					B altura > 0,5 a 1,0 cm			
(**) significativo pelo teste F, p < 0,01					C altura > 1,0 a 1,5 cm			
(1) valores transformados em ln x + 0,5								
(2) valores transformados em √ x + 0,5								

Tabela 24b. Resumo da análise de variância do número de brotações dos clones de *E. grandis* (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico com altura $\leq 0,5$ cm, $> 0,5$ a $1,0$ cm e $> 1,0$ a $1,5$ cm, avaliados no 28º e 35º dia de cultura

Fonte de variação		QUADRADOS MÉDIOS						
		GL	DIA	28			35	
		Classe de Altura (cm)	A(1)	B(1)	C(1)	A(1)	B(1)	C(1)
Clone	1		8,0463**	1,2371**	0,4701*	4,4232**	4,1302**	2,8689**
Trat	4		7,3806**	4,4738**	3,8548**	5,1296**	3,2681**	3,215**
Clone x Trat	4		1,2934**	0,0350ns	0,3559*	1,0478**	0,4846ns	1,0431**
Resíduo	90		0,3045	0,1515	0,1015	0,2182	0,1950	0,1860
F			15,8**	14,1**	18,9**	14,8**	10,9**	11,8**
CV (%)			14,8	11,0	10,5	11,8	12,2	14,2
Média geral			67,2	43,6	24,7	76,2	46,6	25,7

(ns) não significativo pelo teste F
(*) significativo pelo teste F, p < 0,05
(**) significativo pelo teste F, p < 0,01
(1) valores transformados em ln x + 0,5
(2) valores transformados em √ x + 0,5

A altura ≤ 0,5 cm
B altura > 0,5 a 1,0 cm
C altura > 1,0 a 1,5 cm

Os clones G2 e G5 apresentam diferenças relacionadas à capacidade de indução de gemas (Tabelas 25a e 25b). O clone G2 apresentou menor número de brotações dentro das classes de altura estipuladas do que o clone G5. Houve exceção somente para a avaliação realizada no 21º dia de cultura para o número de brotações com altura de até 0,5cm e >1,0 a 1,5cm. Entretanto, as médias destas classes de altura das brotações não diferenciaram estatisticamente pelo teste Tukey ($p = 0,05$) das médias obtidas para o clone G5 (Tabela 25a).

O clone G5 caracterizou-se por apresentar crescimento de brotações uniformes e possíveis de serem contadas a partir do 14º dia de cultura. Enquanto que para o clone G2 isto somente foi possível em avaliação realizada no 21º dia de cultura. A partir deste período todas as brotações do clone G2 puderam ser contadas dentro dos critérios definidos para altura de brotações (Tabelas 25a e 25b).

Um número reduzido de brotações dos clones G2 e G5 apresentou crescimento em altura superior a 1,5 cm até 4,0cm. Estas brotações foram contadas e esse procedimento justifica as diferenças das médias do número total de brotações (Tabela 22) e da somatória das médias do número de brotações em cada intervalo de altura (Tabelas 25a e 25b).

Tabela 25a. Valores médios para o número de brotações dos clones *E. grandis* (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico com altura $\leq 0,5$ cm, $> 0,5$ a $1,0$ cm e $> 1,0$ a $1,5$ cm avaliados nos dias 14º e 21º dia de cultura

CLONE	DIA	14			21		
	Classe de Altura (cm)	A(2)	B(1)	C(1)	A(1)	B(1)	C(1)
G5		23,4 A	15,6 A	7,6 A	8,7 A	25,7 A	11,2 A
G2		7,8 B	10,4 B	7,4 A	19,6 A	22,0 B	14,8 A
F		9,0**	5,9**	12,0**	4,6**	5,2**	16,9**
CV (%)		24,2	24,0	55,2	22,3	13,2	22,6
Média geral		15,6	13,0	7,5	19,2	23,8	13,0

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, $p = 0,05$

(ns) não significativo pelo teste F

A altura $\leq 0,5$ cm

(*) significativo pelo teste F, $p < 0,05$

B altura $> 0,5$ a $1,0$ cm

(**) significativo pelo teste F, $p < 0,01$

C altura $> 1,0$ a $1,5$ cm

(1) valores transformados em $\ln x + 0,5$

(2) valores transformados em $\sqrt{x} + 0,5$

Tabela 25b. Valores médios para o número de brotações dos clones *E. grandis* (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico com altura $\leq 0,5$ cm, $> 0,5$ a $1,0$ cm e $> 1,0$ a $1,5$ cm avaliados no 28º e 35º dia de cultura

CLONE	DIA	28			35		
	Classe de Altura (cm)	A(1)	B(1)	C(1)	A(1)	B(1)	C(1)
G5		96,0 A	50,2 A	26,1 A	102,8 A	61,0 A	28,8 A
G2		38,4 B	36,9 B	23,3 B	49,4 B	32,2 B	22,5 B
F		15,8**	14,1**	18,9**	14,8**	10,9**	11,8**
CV (%)		14,8	11,0	10,5	11,8	12,2	14,2
Média geral		67,2	43,6	24,7	76,2	46,6	25,7

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, $p = 0,05$

(ns) não significativo pelo teste F

A altura $\leq 0,5$ cm

(*) significativo pelo teste F, $p < 0,05$

B altura $> 0,5$ a $1,0$ cm

(**) significativo pelo teste F, $p < 0,01$

C altura $> 1,0$ a $1,5$ cm

(1) valores transformados em $\ln x + 0,5$

(2) valores transformados em $\sqrt{x} + 0,5$

Nas Tabelas 26a e 26b pode-se observar a distribuição em classes de altura das médias do número de brotações obtidas no 14º, 21º, 28º e 35º dia de cultura.

O tratamento T4 apresentou maior número de brotações nos diferentes classes de altura das brotações a partir do 21º dia de cultura. Todavia, este tratamento não diferenciou estatisticamente pelo teste Tukey ($p = 0,05$) do tratamento T3 até o 35º dia de cultura (Tabelas 26a e 26b).

Contudo, todos os tratamentos favoreceram o aumento do número de brotações em cada classe de altura durante os períodos de avaliações até o 35º dia de cultura (Tabelas 26a e 26b). Isto representa que o meio de cultura promoveu o crescimento e desenvolvimento das gemas. Conforme ocorreu o acréscimo de meio líquido, aumentou o número de brotações principalmente entre os comprimentos em altura $\leq 0,5\text{cm}$ e $>0,5\text{ cm}$ a $1,0\text{ cm}$. Desta forma os resultados das médias gerais dos tratamentos nas diferentes classes de altura das brotações obtidas no 14º e no 35º dia de cultura corresponderam a um aumento de 388,4% para brotações com altura $\leq 0,5\text{cm}$, de 255,7% para brotações com altura $<0,5\text{cm}$ a $1,0\text{cm}$ e 242,5% para brotações com altura $>1,0\text{cm}$ a $1,5\text{cm}$ (Tabelas 26a e 26b).

Tabela 26a: Valores médios para o número de brotações dos clones de *E. grandis* (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico com altura $\leq 0,5$ cm, $>0,5$ a $1,0$ cm e $>1,0$ a $1,5$ cm avaliados no 14º e 21º dia de cultura.

TRATAMENTO	NÚMERO DE BROTAÇÕES						
	DIA	14			21		
	Classe de Altura (cm)	A(2)	B(1)	C(1)	A(1)	B(1)	C(1)
T1		11,4 A	9,2 C	3,3 B	8,4 B	14,8 C	3,5 C
T2		14,9 A	15,9 AB	10,0 A	19,1 AB	23,3 ABC	17,9 AB
T3		19,8 A	16,9 A	13,3 A	26,9 A	30,3 AB	14,9 AB
T4		20,2 A	14,6 AB	10,0 A	30,1 A	32,1 A	19,7 A
T5		11,7 A	8,8 BC	1,1 B	11,5 B	18,8 BC	9,0 B
F		9,0**	5,9**	12,0**	4,6**	5,2**	16,9**
CV (%)		24,2	24,0	55,2	22,3	13,2	22,6
Média geral		15,6	13,0	7,5	19,2	23,8	13,0

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, $p = 0,05$

(ns) não significativo pelo teste F

A altura $\leq 0,5$ cm

(*) significativo pelo teste F, $p < 0,05$

B altura $> 0,5$ a $1,0$ cm

(**) significativo pelo teste F, $p < 0,01$

C altura $> 1,0$ a $1,5$ cm

(1) valores transformados em $\ln x + 0,5$

(2) valores transformados em $\sqrt{x} + 0,5$

T1: 20 ml de meio de cultura sólido por frasco;

T2: idem T1 e no 7º dia de cultura acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco;

T3: idem T1 e no 7º dia de cultura acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco, no 14º dia, retirou-se a quantidade de meio de cultura líquido sobrenadante e dispensou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco;

T4: idem T3 e no 21º dia de cultura, retirou-se a quantidade de meio de cultura líquido sobrenadante e dispensou-se 10 ml de meio de cultura por frasco;

T5: idem T1 e no 14º dia acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco.

Tabela 26b. Valores médios para o número de das brotações clones de *E. grandis* (G2 e G5) na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS bifásico com altura $\leq 0,5$ cm, $>0,5$ a $1,0$ cm e $>1,0$ a $1,5$ cm avaliados no 28º e 35º dia de cultura

TRATAMENTO	NÚMERO DE BROTAÇÕES						
	DIA	28			35		
	Classe de Altura (cm)	A ⁽¹⁾	B ⁽¹⁾	C ⁽¹⁾	A ⁽¹⁾	B ⁽¹⁾	C ⁽¹⁾
T1		16,7 C	15,9 C	8,6 C	22,1 C	18,0 D	10,4 C
T2		30,9 BC	37,0 B	21,4 B	53,3 B	34,6 CD	18,2 BC
T3		114,4 A	61,1 A	33,5 A	92,7 AB	60,1 AB	35,9 A
T4		126,2 A	81,4 A	44,8 A	162,0 A	81,1 A	37,9 A
T5		47,9 B	22,6 BC	15,3 B	50,8 B	39,4 BC	26,1 AB
F		15,8**	14,1**	18,9**	14,8**	10,9**	11,8**
CV (%)		14,8	11,0	10,5	11,8	12,2	14,2
Média geral		67,2	43,6	24,7	76,2	46,6	25,7

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, $p = 0,05$

** significativo pelo teste F, $p < 0,01$

(1) Valores transformados em $\ln x + 0,5$

A Altura $\leq 0,5$ cm

B Altura $>0,5$ a $1,0$ cm

C Altura $>1,0$ a $1,5$ cm

T1: 20 ml de meio de cultura sólido por frasco;

T2: idem T1 e no 7º dia de cultura acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco;

T3: idem T1 e no 7º dia de cultura acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco, no 14º dia, retirou-se a quantidade de meio de cultura líquido sobrenadante e dispensou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco;

T4: idem T3 e no 21º dia de cultura, retirou-se a quantidade de meio de cultura líquido sobrenadante e dispensou-se 10 ml de meio de cultura por frasco;

T5: idem T1 e no 14º dia acrescentou-se 10 ml de meio de cultura líquido por frasco.

5. CONCLUSÕES

1. O crescimento e desenvolvimento de gemas de clones de *E. grandis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis* em meio de cultura líquido e sólido, na fase de multiplicação permitiu observar:
 - variações entre clones para PMF, PMS em meio líquido e sólido em 42 dias de cultura;
 - maiores taxas de crescimento relativo em meio líquido e sólido aos 7 dias de cultura;
 - redução e estabilização das taxas de crescimento relativo a partir do 14º dia de cultura, em meio líquido e sólido;
 - em meio líquido, maior PMF e PMS, para clones de *E. grandis*;
 - em meio sólido, maior PMF e PMS para clones de *E. grandis* x *E. urophylla*;
 - que não houve diferença para PMF e PMS tanto em meio líquido como em meio sólido para o clone de *E. urophylla* x *E. grandis*.
2. O crescimento e desenvolvimento de gemas de clones de *E. grandis* cultivados em meio de cultura bifásico, na fase

de multiplicação, permitiu observar:

- variações entre clones e entre tratamentos para PMF, PMS, taxa de crescimento relativo, número total de brotações e número de brotações em classes de altura, em 35 dias de cultura;
 - média da taxa de crescimento relativo de 21,9%, em meio sólido, no 7º dia de cultura;
 - que a maior frequência de acréscimos de meio líquido favoreceu a manutenção da taxa de crescimento relativo médio de 10,8% até o 21º dia de cultura e um maior número de brotações por explante com uniformidade em crescimento em altura das brotações;
 - redução e estabilização da taxa de crescimento relativo após 21º dia e/ou após o último acréscimo de meio de cultura em todos os tratamentos.
3. A eficácia do método de cultivo em meio de cultura bifásico pode favorecer o crescimento e desenvolvimento de gemas, induzindo brotações com alturas mais homogêneas e sem vitrificação. Avanços desta metodologia podem contribuir a otimização do cultivo *in vitro* de *Eucalyptus*.
4. A possibilidade de ocorrência de híbridos inter-específicos naturais ou espontâneos em *Eucalyptus* pode levar a inferências incorretas nos resultados e suas interpretações. Sugere-se adequada caracterização e identificação através de características morfológicas e/ou moleculares.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEM-CHRISTIE, J. & JONES, C. Towards automation: **Radiata pine** shoot hedges "in vitro". **Plant Cell, Tissue and Organ culture**. Rotorua, 8:185-196. 1987.
- BARKER, P. K.; DE FOSSARD, R. A. & BOURNE, R. A. Progress toward propagation of *Eucalyptus* species by tissue culture techniques. In: INTERNATIONAL PLANT PROGATORS SOCIETY COMBINED PROCEEDINGS. 1977. V. 27., P. 546-56.
- BRIGATTI, R. A.; FERREIRA, M., BEIG, O. & FREITAS, M. de Polinização controlada em *Eucalyptus urophylla*: um programa desenvolvido pela Champion Papel e Celulose S/A. **Silvicultura**. São Paulo, 8(28): 213-15. 1983.
- BROOME, O.C. & ZIEMMERMAN, R.H. Culture of shoot meristems: fruit plants. In: VASIL, I.K. (ed) **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Vol.1. Orlando. Academic Press Inc. 1984. p.111-122.
- CARVALHO, D. de. Micropropagação de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden através da cultura "in vitro" de segmentos nodais. Lavras. UFL. 1988. 75 p. Tese de Mestrado.
- CRESSWELL, R. J. & de FOSSARD, R. A. Organ culture of *Eucalyptus grandis*. **Australian Forestry**. Armidale, 37:55-69. 1974.

- CRESSWELL, R. A. & NITSCH, C. Organ culture of *Eucalyptus grandis* L. **Planta**, New York, 125: 87-90. 1975.
- CRESSWELL, R. D. & NITSCH, C. Factors influencing the regeneration of. *Eucalyptus grandis* by organ culture. **Acta Horticulturae**. Toulouse. 78:149-55. 1977.
- DEBERGH, P. C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**. Copenhagen. 59:270-6. 1983.
- DE FOSSARD, R. A. Tissue culture of *Eucalyptus*. **Australian Forestry**, Canbera, 37:43-54. 1974.
- DE FOSSARD, R. A.; BARKER, P. K. & BOURME, R. A. The organ culture of nodes of four species of *Eucalyptus*. **Acta Horticulturae**, Armidale, 78:157-165. 1977.
- DIAS, J. M. C. DE S. Aplicação do método dinâmico de medida da velocidade específica máxima de crescimento celular à fermentação alcoólica contínua de mosto de melão. São Paulo. ESCOLA POLITÉCNICA DA USP. 1982. 225p. Tese de Mestrado.
- FRANCLET, A. Rajeunissement et propagation végétative des ligneuse. **Annales de Recherches Sylvicoles**, Paris, (1980): 11-9. 1981.
- FRANCLET, A. & BOULAY, M. Micropropagation of frost resistant eucalypt clone. **Australian Forestry Research**. 13:83-89. 1983.

- FRANCLET, A.; GOULAY, M., BEKKAQUI, M., FOURET, Y., VERSHOOREMARTOUZET & WALKER, N. Rejuvenation. In: BONGA, J. M. & DURZAN, D. J. (eds). **Cell and Tissue Culture in Forestry: General Principles and Biotechnology**. Vol 1. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p. 232-48.
- FURZE, M. J. & CRESSWELL, C. F. Micropropagation of *Eucalyptus grandis* and *nitens* using tissue culture techniques. **South African Forestry Journal**. Witwatersrand. 135:20-3. 1985.
- GEORGE, E. F. & SHERRINGTOM, P. D. **Plant propagation by tissue culture: Hand Book and Directory of Commercial Laboratories**. Eversley. Exegetics. 1984. 709p.
- GOLFARI, L.; CASER, R. L. & MOURA, V. P. G. **Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil; 2ª aproximação**. Belo Horizonte, IBDF. 1978. 66p. (Série Técnica, 11).
- GOLFARI, L. Comparações de locais entre Austrália e Brasil visando ao plantio de *Eucalyptus grandis*. **Silvicultura**. São Paulo, (31):407-409. 1983.
- GONÇALVES, A. M. Reversion to juvenility and cloning of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake in cell and tissue culture systems. In: SIMPOSIO IUFRO EM MELHORAMENTO GENÉTICO E PRODUTIVIDADE DE ESPÉCIES FLORESTAIS DE RÁPIDO CRESCIMENTO, Águas de São Pedro, 25-30. Agosto. 1980.
- GONÇALVES, A. M. Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake "in vitro". Piracicaba. ESALQ, 1982. 97p. Tese de Doutorado.

- GONÇALVES, J. L. DE M. Interações genótipo ambiente e relações entre a produtividade de sítios florestais de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna* com as propriedades de alguns solos de textura arenosa e média no Estado de São Paulo. Piracicaba. ESALQ. 1990. 135p. Tese de Doutorado.
- GRATTAPAGLIA, D; ASSIS, T. F. & CALDAS, L. S. Efeito residual de BAP (6-benzil amino purina) e NAA (ácido naftaleno acético) na multiplicação e enraizamento "in vitro" de *Eucalyptus*. In: **Resumos do 2º Simpósio Nacional de Cultura de Tecidos Vegetais**. Brasília. 1987. p.8.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C. & CALDAS, L. S. (eds) **Técnicas e Aplicações de Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília. 1990. p. 99-200.
- HALL, N.; JOHNSON, R. D. & CHIPPENDALE, G. M. **Forest Trees of Australia**. Cambera, Australian Government, 1970. p. 54-5.
- HARTNEY, V. J. & BARKER, P. K. Vegetative propagation of eucalipts by tissue culture. **Silvicultura**. São Paulo, 8:791-7. 1983.
- HUANG, L. C. & MURASHIGE, T. Plant tissue culture média: major constituents, their preparation and some applications. **TCA Manual**, 3(1):339-48. 1976.
- HUNT, R. Concepts in plant growth analysis. In: **EDWARD ARNOLD (ed). Plant Growth Curves the Functional Approach to Plant Growth Analysis**. 1982. p.14-46.

- IKEMORI, Y. K. Epicormic shoots from the branches of *Eucalyptus grandis* as an explant source for "in vitro" culture. **Commonwealth Forestry Review**. 66(4) 351-6. 1987.
- IKEMORI, Y. K. Genetic variation in characteristics of *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden raised from micro-propagation, macro-propagation and seed. Oxford, OXFORD UNIVERSITY. 1990. 123 p. Thesis of Doctor.
- IKEMORI, Y. K. & CAMPINHOS JR., E. Produção de sementes de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* por polinização aberta. Resultados preliminares. **Silvicultura**, São Paulo, 8(28):306-08, jan/fev. 1983.
- INGESTAT, T. Nutrition and growth of forest trees. **Tappi Journal**, Uppsala, 55-62. 1991.
- KNOP, W. Quantitative untersuchungen uber den Ernährungs process der PF lanzen. Landwn Vers Stuen. 7:93-107. 1965.
- LEVEAU, J. & BOUIX, M. Cinéticas microbianas. In: MONOLE (ed). **Biotecnologia**. São Paulo. 1985. p.103-23.
- MACRAE, S. & STADEN J. van In vitro culture of *Eucalyptus grandis*: effect of gelling agents on propagation. **Journal Plant Physiologica**. Congella 137:249-51, 1990.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review Plant Physiology**, 25:135-166. 1974.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Phisiologia Plantarum**. Copenhagen, 15(3): 473-97. 1962.

- ODA, S. & FERREIRA, M. Produção de híbridos interespecíficos por polinização aberta. **Silvicultura**, São Paulo, 8(28):407-08, 1983.
- PAQUES, M. Vitrification and micropropagation: causes, remedies and projects. **Acta Horticulturae**, Genova. 289:283-9. 1991.
- PATON, D. M.; WILLING, R. R. & PRYJOR, L. D. Root-shoot gradients in *Eucalyptus* ontogeny. **Annual Botanical**. 47:835-38. 1981.
- PENCHEL, R. M. Development of cell culture and protoplast by stems of *Eucalyptus grandis*. New Brunswik. RUTGERS. 1991. 421p. Tese of Doctor.
- QUOIRIN, M. & LEPOIVRE, P. Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de *Prunus*. **Acte Horticulturae**. 78:437-42. 1977.
- RAO, K. S. & VENKATESWARA, R. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Eucalyptus grandis* L. **Plant Science**. Bangalore, 40:51-5. 1985.
- SALISBURY, F. B. & ROSS, C. W. Plant development. In: CAREY, J.C. (ed). **Plant Physiology**. 3 ed. Belmont. Wadsworth Publishing Company. 1985. p. 290-447.
- SILVA, L. C. da. Propagação "in vitro" de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, a partir de gemas apicórmicas. Viçosa. UFV. 1990. 60p. Tese de mestrado.

- SITA, L. G. Progress towards the in vitro clonal propagation of *Eucalyptus grandis*. In: WITHERS, L. A. AND ALDERSON, P. G. (eds). **Plant Tissue Culture and its Agricultural Application**. 1986. p. 159-65.
- SITA, G. L. & RANI, B. S. In vitro propagation of *Eucalyptus grandis* L. by tissue culture. **Plant Cell Reports**. Bangalore. 4:63-5. 1985.
- SKIDMORE, D. I.; SIMONS, A. J. & BEDI, S. In vitro culture of shoots of *Pinus cariebaea* on a liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Dordrecht. 14:129-36. 1988.
- SODI, A. M. & PANIZZA, M. & TOGNONI, F. Ethylene involvement in "in vitro" regeneration of Lily. **Acta Horticulturae**. Genova. 280:151-154. 1990.
- STANDARDI, A & MICHELI, M. Control of vitrification in proliferating shoots of M-26. **Acta Horticulturae**. Genova. 227:425-27. 1988.
- TOTH, V. B dos R. Efeito de esteróides no crescimento "in vitro" de híbridos de *Eucalyptus*. Piracicaba. ESALQ. 1991. 81p. Tese de mestrado.
- VANDERSCHAEKHE, A. M. & DEBERGH, P. C. Automation of tissue culture manipulations in the final stages. **Acta Horticulturae**, Genova. 227:299-301. 1988.
- WANG, Q. Shoot multiplication of pear in double-phase medium culture. **Acta Horticulturae**, Genova. 289:349-50. 1991.

- WARRAG, E. I.; LESNEY. M. S. & ROCKWOOD. D. L.
Micropropagation of field tested superior *Eucalyptus grandis* hybrids. **New Forests**. Gainesville. 4:67-79. 1990.
- WHITE, P. R. The cultivation of Animal and Plant cells 2nd edition. The Ronald Pressco. New York. 1963. 228p.
- WILLIAMS, R. R. & TAJI, A. M. Effects of temperature, darkness and gelling agent on long-term storage of in vitro shoot cultures of Australian woody plant species. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**. Dordrecht. 11:151-6, 1987.

A P Ê N D I C E S

APÊNDICE 1: Tipos de frutos das árvores matrizes

G2 - 01.149.006

G1 - 01.147.033

G4 - 01.081.025

G5 - 01.081.027

APÊNDICE 1: continuação

U3 - 01.141.006

H3 - 01.005.004

H9 - 07.148.018

H10 - 07.148.019

Apêndice 2: Valores obtidos para PMF e PMS (mg) dos explantes-padrão dos clones de E.grandis (fase inicial) - Experimento I

DIA	REP	CLONE							
		G1		G2		G4		G5	
		PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS
0	1	289.1	25.7	224.5	18.3	344.0	29.8	217.4	17.8
	2	399.3	36.5	214.3	19.3	493.7	43.6	420.6	32.2
	3	224.7	18.8	322.6	25.1	264.2	21.4	219.6	19.2
	4	146.2	13.8	175.5	16.3	232.9	19.3	258.6	22.1
	5	84.5	9.3	220.4	16.1	353.1	26.4	281.3	24.2
	6	250.7	25.6	181.7	17.2	339.2	32.5	296.4	23.2
	7	105.9	13.5	286.6	23.4	294.5	26.5	306.8	26.6
	8	241.7	29.9	342.1	30.5	321.8	27.9	212.5	20.8
	9	349.5	34.4	390.9	33.2	240.7	24.1	287.4	25.3
	10	164.8	16.2	446.0	37.6	438.4	37.1	183.4	19.2

PMF : Produção de Matéria Fresca

PMS : Produção de Matéria Seca

REP : Repetição

Apêndice 3: Valores obtidos para PMF e PMS (mg) dos explantes-padrão dos clones de E.grandis x E.urophylla (fase inicial) - Experimento II

DIA	REP	H3		H4		H8		H9		H10	
		PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS
0	1	325.1	27.6	574.1	45.3	426.0	28.4	392.1	29.5	401.2	37.2
	2	661.1	49.2	497.1	39.2	373.1	27.4	321.6	27.5	608.0	50.3
	3	424.6	30.3	587.1	45.8	517.9	39.5	287.2	19.7	454.7	33.2
	4	600.4	47.8	1002.0	71.5	243.1	19.7	542.6	50.0	362.1	31.4
	5	492.3	42.1	729.2	50.6	602.1	50.0	266.5	23.9	511.4	40.3
	6	446.7	43.5	355.2	28.1	391.0	30.2	372.9	29.8	624.8	51.0
	7	618.0	48.3	644.0	48.7	272.4	23.4	225.8	20.6	347.6	27.1
	8	441.6	32.2	345.9	31.2	332.5	23.9	354.6	26.9	480.8	39.5
	9	207.8	18.5	395.9	30.0	428.6	34.1	382.5	27.8	352.9	23.9
	10	539.6	40.9	782.5	60.0	304.2	24.0	274.1	21.5	302.6	22.5

PMF : Produção de Matéria Fresca

PMS : Produção de Matéria Seca

REP : Repetição

Apêndice 4: Valores obtidos para PMF e PMS (mg) dos explantes-padrão dos clones de E.urophylla x E.grandis (U3) fase inicial) - Experimento III

DIA	REP	PMF	PMS
0	1	789.3	57.1
	2	491.5	42.1
	3	438.3	38.9
	4	639.7	44.1
	5	462.0	35.4
	6	686.3	53.9
	7	344.5	27.2
	8	710.8	51.9
	9	590.9	42.8
	10	452.2	39.3

Apêndice 5: Valores obtidos para PMF e PMS (mg) dos clones de *E. grandis* na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS líquido e sólido avaliados a cada 7 dias dutante 42 dias de cultura - Experimento I.

DIA	REP	CLONE																	
		G1						G2						G4					
		Meio de cultura						Meio de cultura						Meio de cultura					
		LIQUIDO		SOLIDO		LIQUIDO		SOLIDO		LIQUIDO		SOLIDO		LIQUIDO		SOLIDO		LIQUIDO	
		PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS
7	1	834.2	67.2	677.2	59.4	914.6	85.4	528.4	54.7	1514.8	154.5	405.2	40.2	681.7	54.6	192.3	24.8		
	2	429.5	36.9	532.9	51.5	368.0	42.2	965.7	90.7	841.7	72.2	432.3	43.8	316.8	43.8	235.2	28.1		
	3	308.3	23.5	590.1	56.3	1162.1	127.1	435.4	46.8	1589.3	133.3	509.6	56.1	996.7	97.0	1316.1	109.5		
	4	231.1	21.3	182.6	22.0	1341.8	101.6	491.5	49.5	1068.9	78.2	224.8	25.7	365.1	29.1	274.7	27.9		
	5	844.8	75.7	278.4	34.9	298.9	25.7	296.0	35.5	504.6	57.8	650.6	60.3	551.1	50.5	328.0	36.6		
	6	730.6	74.2	741.4	77.7	900.5	73.2	525.2	59.4	407.7	42.4	1160.1	113.2	851.9	70.7	299.9	35.4		
	7	662.5	60.7	553.7	55.4	688.1	74.0	587.3	63.1	691.4	72.1	589.9	59.1	1284.0	119.5	990.8	86.3		
	8	157.0	16.9	130.0	15.6	915.2	75.8	746.5	74.6	469.2	44.5	667.6	56.0	1085.9	89.5	754.9	73.4		
	9	794.4	57.3	414.8	46.0	1544.0	141.1	580.5	62.4	566.3	40.7	785.9	66.2	641.2	67.0	511.0	51.1		
	10	380.7	45.2	279.0	33.4	656.3	69.0	466.4	55.3	465.8	38.8	437.8	49.2	673.6	69.7	232.4	31.7		
14	1	1715.5	192.8	1660.5	126.8	1752.8	208.3	829.8	84.3	812.5	81.9	1015.5	105.5	1278.6	148.0	1101.3	97.7		
	2	1187.5	116.5	904.9	88.8	1470.4	146.4	629.1	62.2	1317.4	102.9	1842.9	171.1	1170.3	137.7	812.6	92.8		
	3	1270.8	133.8	1107.6	94.1	1811.6	185.9	847.1	100.3	1706.4	148.9	1866.9	160.7	1051.1	116.9	1436.6	126.0		
	4	835.0	103.6	675.3	75.6	1125.7	124.7	1064.6	109.6	1735.0	139.7	1960.0	156.9	2711.1	239.0	790.2	97.6		
	5	1650.5	190.2	1536.7	139.9	1151.8	135.8	1135.2	112.3	860.1	73.3	917.2	83.6	1461.3	151.9	790.8	100.9		
	6	1162.2	98.6	1132.5	101.5	1192.5	117.9	650.3	62.9	2164.2	151.5	961.1	93.6	1953.1	185.3	484.9	56.7		
	7	1497.8	116.5	1862.7	131.7	1688.2	177.6	1609.8	138.3	1024.8	86.4	1752.1	166.3	1677.6	199.3	481.5	65.0		
	8	1015.7	102.6	2028.6	153.6	1929.2	215.2	905.1	96.8	1693.0	124.4	864.2	81.3	1675.4	170.3	1719.5	160.7		
	9	502.1	62.4	2013.2	144.5	864.0	97.3	1992.3	172.5	728.9	79.2	791.3	82.8	1452.4	157.1	447.0	50.3		
	10	1692.3	161.1	927.3	95.8	2131.8	262.6	924.0	99.0	858.0	88.1	1592.9	129.2	1196.4	123.2	774.0	90.8		
21	1	525.7	59.7	597.5	65.3	793.8	102.5	929.4	114.0	880.0	114.1	978.3	120.0	1899.4	219.8	791.8	78.1		
	2	719.1	95.0	1236.0	117.8	1050.0	145.3	1210.1	128.5	1406.8	161.7	1109.4	150.2	1453.0	186.7	694.9	90.8		
	3	1272.7	126.2	451.7	49.2	823.0	115.2	900.8	115.2	1156.6	107.6	1962.8	191.9	986.0	140.9	1503.4	165.8		
	4	1242.7	118.6	1363.9	125.3	1720.0	182.6	877.2	110.2	1074.7	120.8	1159.0	113.6	625.2	91.5	345.3	38.3		
	5	1057.9	117.6	878.8	92.3	1607.6	187.6	1232.5	138.7	1128.5	132.9	1052.9	120.2	2014.0	226.7	790.1	82.2		
	6	814.5	77.9	1387.4	137.5	1594.6	218.9	1074.1	113.1	1613.3	174.6	1923.9	220.2	965.8	137.5	830.4	97.7		
	7	2121.2	245.7	930.0	83.7	863.3	105.4	1413.5	153.2	1678.1	183.6	1184.2	118.4	1656.3	211.8	2544.2	193.0		
	8	2083.7	218.5	1762.9	142.4	1482.5	182.5	812.1	104.6	1549.7	152.5	846.8	108.7	2196.6	261.2	555.0	66.7		
	9	708.7	89.0	888.7	95.4	1449.5	208.0	1003.0	99.7	1402.0	151.5	1200.0	121.0	1728.2	207.3	976.0	118.1		
	10	667.9	78.3	735.4	79.1	1179.5	144.7	2302.5	210.8	2190.0	221.0	1128.7	118.7	1045.2	158.5	1199.9	119.5		

PMF : Produção de Matéria Fresca

PMS : Produção de Matéria Seca

REP : Repetição

Apêndice 5: Continuação

		CLONE																	
		G1						G2						G4					
DIA	REP	Meio de cultura						Meio de cultura						Meio de cultura					
		LIQUIDO			SOLIDO			LIQUIDO			SOLIDO			LIQUIDO			SOLIDO		
		PMF	PMS		PMF	PMS		PMF	PMS		PMF	PMS		PMF	PMS		PMF	PMS	
28	1	1338.3	147.4	1016.7	114.3	810.6	128.8	429.5	64.7	2056.2	236.1	1187.9	123.7	866.7	125.0	1179.1	135.0		
	2	1623.9	215.0	918.6	107.5	1921.9	257.4	1241.1	130.2	2023.7	254.5	1092.2	108.1	1720.2	231.3	1743.6	163.7		
	3	1370.9	149.3	1571.7	96.2	1151.6	165.3	556.0	80.9	2292.5	263.4	1437.0	140.7	1527.0	219.0	1368.9	157.9		
	4	996.8	122.2	1609.5	156.6	1110.5	286.3	1424.7	151.0	1570.4	139.0	1503.7	138.0	1068.5	143.9	1724.7	173.5		
	5	620.1	84.8	1003.7	96.4	1317.7	184.6	1740.9	217.8	1014.2	99.0	1607.1	139.9	1045.8	144.5	612.5	69.9		
	6	610.0	83.0	601.0	61.9	2002.0	286.0	1143.9	135.6	1221.8	110.9	1332.4	128.4	1693.9	236.8	1291.7	145.3		
	7	2122.0	248.6	755.9	91.6	901.4	113.1	2137.2	198.3	1499.3	159.6	1206.4	107.4	845.3	120.5	1009.9	111.3		
	8	2083.7	229.7	929.8	107.6	1082.2	150.1	870.5	128.4	1935.0	210.7	1059.6	114.0	864.7	132.8	811.3	102.5		
	9	948.9	117.9	1345.3	143.4	1142.8	150.0	2035.7	222.0	1285.4	170.2	701.3	85.4	1625.5	209.3	1109.3	158.0		
	10	1670.9	198.3	1542.3	195.3	598.5	87.7	480.4	66.4	1903.3	185.7	1456.1	128.0	642.2	117.2	848.3	109.8		
35	1	1348.3	170.8	1255.3	149.5	1547.2	170.8	607.1	78.6	2292.0	248.3	848.7	102.2	2316.9	240.5	1221.3	190.5		
	2	1390.0	156.7	1758.7	180.5	1181.9	142.0	1565.6	174.4	1625.0	182.7	1398.3	161.9	1178.1	151.1	596.5	74.3		
	3	1503.2	177.5	888.5	114.7	1658.4	219.1	750.8	117.2	1996.0	208.9	1871.2	219.6	1705.8	224.4	975.6	150.0		
	4	1309.9	137.9	1630.0	222.4	1319.7	159.3	925.8	115.3	1979.3	212.8	1393.5	174.8	2014.7	231.5	1331.1	171.1		
	5	1364.2	162.3	1116.7	125.3	1341.0	174.0	871.3	119.6	720.8	83.0	1190.1	144.7	782.9	99.1	1275.7	181.5		
	6	2371.3	302.6	2000.0	194.3	771.9	112.4	369.9	58.0	1447.8	179.2	1887.1	219.8	797.0	210.3	1820.7	200.0		
	7	2392.7	241.8	1057.2	135.2	1826.2	265.8	1185.7	147.8	1244.4	113.6	1557.5	164.9	1380.4	178.6	1098.8	138.7		
	8	1225.0	165.7	735.0	105.7	1076.8	158.3	816.8	82.7	1916.1	225.3	1332.8	181.2	1656.6	182.1	1256.3	159.6		
	9	1478.8	172.3	1009.7	103.1	2533.7	324.1	2020.7	212.7	2309.1	206.7	1589.8	187.5	1778.1	217.9	807.3	213.9		
	10	2290.3	225.9	1324.6	143.7	1210.1	197.0	878.3	127.4	1710.8	174.6	1081.9	131.1	1246.2	145.8	1321.7	161.8		
42	1	1676.7	184.6	1020.0	100.0	1528.8	179.6	919.9	102.9	900.8	134.2	1514.4	154.4	1212.9	143.1	1419.9	174.5		
	2	1550.0	140.6	1169.8	116.9	1782.5	173.3	1102.5	136.6	1845.2	205.3	1661.3	164.1	1137.1	123.4	1070.5	158.8		
	3	1765.3	176.7	1719.0	192.0	1689.7	177.9	1072.4	135.5	3211.6	290.5	1161.7	130.9	775.6	111.8	1028.4	128.7		
	4	1264.7	151.9	2033.2	210.3	1647.0	205.1	1555.7	139.0	1934.3	220.9	1422.3	127.8	1518.6	147.4	1075.6	117.0		
	5	1402.2	146.1	1296.1	146.3	1580.0	206.4	1157.1	131.8	1272.3	121.4	923.2	106.0	643.2	98.4	2931.7	220.7		
	6	1995.3	200.7	1537.6	136.3	1989.4	244.1	1043.6	135.3	856.8	94.7	1278.1	151.5	1618.3	158.4	1003.4	141.5		
	7	2313.0	325.1	942.9	82.4	1163.3	138.2	1668.4	143.9	1847.4	178.1	1384.4	125.8	1934.7	216.3	2427.7	197.5		
	8	1527.2	171.8	2004.2	177.5	620.4	82.6	2022.4	187.4	1264.1	141.2	1620.8	166.3	2381.1	356.7	2259.3	195.9		
	9	1802.6	194.7	1478.9	147.8	1373.5	175.8	1466.6	207.2	1113.0	157.9	1349.2	131.7	2093.5	191.2	951.8	124.2		
	10	1033.1	127.7	1913.4	190.0	2098.8	231.4	1172.9	137.8	1967.3	217.5	2525.2	222.5	1554.6	176.7	2392.2	262.1		

PMF : Produção de Matéria Fresca
PMS : Produção de Matéria Seca
REP : Repetição

Apêndice 6:

Valores obtidos para PMF e PMS (mg) dos clones de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas cultivados em meio de cultura JADS sólido e líquido avaliados a cada 7 dias durante 42 dias de cultura - Experimento II

DIA REP		CLONE																													
		H3						H4						H8						H9						H10					
		Meio de Cultura			Meio de cultura			Meio de cultura			Meio de cultura			Meio de cultura			Meio de cultura			Meio de cultura			Meio de cultura			Meio de cultura					
		SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO			
PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS				
7	1	829.6	71.6	590.0	55.8	600.0	53.3	791.0	83.2	1135.7	95.0	532.1	68.6	492.5	46.8	764.2	77.6	943.2	74.9	966.6	105.6										
	2	548.3	65.0	534.2	64.0	1039.2	77.9	768.8	73.8	994.2	79.5	443.7	38.9	408.4	38.8	267.8	29.6	381.9	37.9	643.0	53.2										
	3	1552.2	131.8	1068.9	92.1	1216.8	89.3	583.9	65.7	1061.0	79.8	347.7	34.5	486.1	44.5	256.6	29.8	530.2	45.5	460.1	38.4										
	4	590.1	53.8	357.1	35.9	761.6	58.9	559.3	52.9	1316.6	100.0	231.6	23.1	648.6	61.3	287.9	38.6	625.0	53.2	358.8	28.6										
	5	582.9	50.0	249.6	23.2	508.2	49.2	548.6	111.3	768.6	66.1	369.6	46.4	653.3	53.2	848.8	80.3	689.2	57.2	328.2	27.0										
	6	689.2	47.0	571.8	65.8	710.9	58.9	934.2	85.0	722.8	60.0	628.0	56.9	1265.0	93.5	806.9	61.5	441.6	42.9	524.9	46.8										
	7	717.0	62.0	777.7	76.9	743.3	74.3	831.2	73.4	765.6	51.7	526.2	46.0	1694.3	60.0	1563.4	46.7	645.3	53.5	469.8	41.2										
	8	585.1	57.4	594.7	60.3	631.3	52.9	949.6	81.1	1026.5	92.0	1123.7	96.3	520.5	48.5	204.7	20.7	554.6	50.5	789.4	72.3										
	9	1193.6	107.3	725.0	70.1	1216.4	93.5	993.0	111.4	890.5	73.6	560.8	54.8	626.1	47.4	808.9	82.8	1064.9	81.7	496.2	45.8										
	10	851.5	77.4	1290.5	117.1	1182.1	88.3	2295.3	184.2	776.3	71.1	214.3	24.6	712.6	62.9	494.2	46.9	887.0	67.5	511.5	44.1										
14	1	671.0	73.7	1205.2	142.5	817.5	94.2	537.5	67.2	913.0	83.9	300.2	33.6	1168.5	117.5	626.1	74.0	753.1	80.8	1066.3	154.7										
	2	1435.1	136.4	970.0	104.6	1147.0	95.7	474.6	59.6	909.0	98.0	789.1	96.6	675.9	87.4	453.4	62.2	788.2	77.6	933.7	85.2										
	3	1258.0	117.8	610.3	87.7	1046.5	111.2	632.7	80.0	1283.3	117.9	1097.4	137.0	923.9	83.6	868.5	118.7	600.8	59.7	1446.5	164.9										
	4	1115.0	100.3	1291.8	141.4	914.4	86.9	668.0	86.2	788.2	88.9	545.3	77.2	802.0	103.8	332.0	45.6	671.0	71.0	968.9	110.3										
	5	918.9	98.8	928.9	104.1	554.6	68.3	1027.0	112.0	1134.5	128.8	462.7	62.3	452.9	49.1	572.1	79.1	719.0	76.1	753.7	93.5										
	6	1615.4	135.4	1034.3	128.1	501.0	46.8	471.3	65.6	1064.5	115.9	341.4	42.6	1262.1	126.8	452.1	64.3	572.1	58.2	421.6	50.7										
	7	802.2	76.7	1119.2	148.4	709.1	67.4	904.2	112.7	2027.2	205.7	825.2	100.9	1103.6	111.3	987.4	118.9	760.7	83.4	622.2	90.4										
	8	424.1	48.5	500.1	57.7	726.2	83.3	576.6	65.2	752.1	76.3	816.4	80.5	1523.0	135.8	848.1	111.7	852.9	92.6	2039.2	229.1										
	9	803.5	89.9	1083.1	137.6	639.0	67.2	375.5	63.1	1402.6	126.3	290.6	44.0	618.3	55.9	608.3	84.8	777.0	79.6	338.4	34.4										
	10	973.3	91.3	1088.7	143.8	859.0	73.1	743.1	102.3	1094.6	100.7	1017.1	120.0	1432.1	138.2	520.1	64.5	1202.9	112.1	1529.1	156.3										
21	1	1431.7	98.6	692.0	163.4	1263.4	146.6	1381.9	123.4	1339.4	116.8	797.5	120.3	887.6	89.0	672.0	79.6	927.2	162.3	1615.9	105.1										
	2	797.0	105.9	684.1	77.0	836.4	130.1	1185.1	94.8	681.9	153.2	994.0	75.1	759.5	123.4	1021.9	85.8	1515.0	147.6	1603.4	172.5										
	3	1862.0	126.6	851.8	178.7	1224.4	190.2	1832.2	151.0	1113.3	61.0	491.5	113.0	949.4	206.6	1628.2	118.0	811.4	231.4	1740.6	64.1										
	4	1754.8	156.3	1292.5	163.4	1451.7	141.8	1194.5	148.7	1487.7	158.4	1363.6	136.3	732.6	199.0	1403.6	80.5	1496.5	187.6	1944.2	118.1										
	5	1411.6	205.1	415.1	130.1	1891.0	100.6	780.0	157.1	1054.7	171.8	1914.4	108.0	1565.5	165.5	1363.3	84.5	1350.6	187.8	1689.4	135.4										
	6	729.6	125.3	891.9	74.9	875.3	136.1	1099.0	84.1	1612.6	193.2	1375.0	152.7	799.4	75.3	473.6	67.8	914.6	162.5	1365.8	85.6										
	7	1215.6	87.8	747.0	136.7	1338.7	143.1	1152.1	147.3	1715.2	176.4	2113.9	166.5	1468.8	81.2	615.5	161.6	1924.1	97.0	757.4	169.3										
	8	1600.7	123.4	786.6	153.9	1283.7	139.3	1242.9	114.9	1530.7	71.5	711.7	157.9	1088.7	40.3	274.9	88.5	1148.7	163.0	1553.0	119.9										
	9	1498.6	125.5	909.7	154.1	634.2	148.5	1559.0	78.6	906.5	127.2	1212.0	112.3	926.0	112.3	725.2	102.5	1314.5	255.6	1996.0	110.3										
	10	1055.3	165.2	1055.5	111.3	1219.1	140.9	1177.5	110.4	1672.9	253.2	2079.6	147.8	1254.0	144.1	1120.4	126.0	1428.3	131.0	1254.0	137.8										

PMF : Produção de Matéria Fresca
PMS : Produção de Matéria Seca
REP : Repetição

Apêndice 6: continuação

		CLONE																			
		H3			H4			H8			H9			H10							
DIA REP		Meio de Cultura			Meio de cultura			Meio de cultura			Meio de cultura			Meio de cultura							
		SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO					
		PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS				
28	1	2347.6	245.0	1856.3	208.2	1561.6	159.0	1351.9	180.9	1565.6	149.2	1615.9	193.6	1742.9	186.7	1455.1	200.2	1900.7	199.3	2283.0	207.7
	2	1988.3	199.0	963.4	126.9	1533.3	191.5	2980.6	329.8	2218.8	182.6	1186.6	137.8	1775.7	191.8	1319.5	184.6	1280.0	152.8	1230.3	190.1
	3	1346.9	156.3	1181.6	140.8	2249.6	246.5	1921.9	240.2	1460.0	158.0	1089.6	147.0	1815.8	197.0	1150.6	158.5	1914.5	200.0	1178.2	144.1
	4	2256.1	241.5	1288.2	194.5	1029.1	124.8	1184.8	155.1	2048.4	180.3	1452.3	205.9	876.2	96.6	1096.0	147.3	1468.3	172.0	1336.4	143.6
	5	1805.4	166.6	1848.3	268.5	1658.0	191.2	1495.2	203.9	2372.1	227.0	1371.6	185.7	1151.7	124.8	1677.9	250.6	1896.1	189.6	1967.3	224.2
	6	1153.4	132.2	1647.3	208.1	2342.4	185.1	1044.8	142.2	3350.3	318.9	2183.1	255.1	1416.6	143.5	766.9	107.9	1535.7	161.9	1569.5	144.0
	7	1439.8	163.1	893.7	147.0	1282.2	134.3	1269.6	144.2	2043.0	186.7	1497.7	223.7	1500.2	158.8	952.9	121.1	1114.9	119.6	2684.5	261.0
	8	1511.8	175.9	1590.0	218.2	1667.6	168.1	1030.0	135.9	2262.6	214.1	1535.6	195.9	1330.5	148.6	1943.5	233.3	1893.6	199.0	814.4	76.8
	9	1868.8	217.4	817.3	134.3	1514.9	139.8	1491.1	144.5	1435.9	153.3	1309.4	152.3	1050.2	126.7	1279.2	207.2	1869.5	180.2	1833.9	208.1
	10	1153.7	137.5	1397.6	200.9	1365.6	155.2	1381.6	182.8	1463.2	152.6	2209.9	199.6	1305.2	135.1	2073.5	232.8	1264.5	140.0	1792.4	156.3
35	1	1056.4	133.4	1785.0	220.5	1559.0	138.8	990.2	128.5	2223.3	204.4	540.8	83.9	620.3	75.5	1531.2	193.1	2548.7	257.0	2265.5	214.0
	2	1463.8	175.3	1872.6	94.2	1171.3	148.3	1236.3	50.2	3018.7	259.8	976.5	164.8	1000.3	124.4	1235.8	126.4	2057.8	206.7	2505.4	248.9
	3	1519.3	162.7	532.4	75.1	1932.0	174.5	1129.0	133.7	2055.0	192.7	1164.7	162.7	1967.8	200.0	1040.7	118.7	1650.5	150.0	1522.1	204.5
	4	1771.0	204.6	1159.6	173.0	1146.6	104.3	2182.1	292.1	1573.4	172.8	1323.9	141.4	1112.4	127.0	1588.9	220.1	2289.4	226.4	1460.5	156.5
	5	1558.3	159.2	918.5	11.7	1563.7	202.9	1500.1	185.6	1481.9	155.0	778.6	89.9	897.3	101.6	2355.3	248.0	1312.9	127.9	1655.1	199.0
	6	1963.1	222.3	875.4	138.9	2013.3	197.1	1207.3	58.7	1798.6	170.2	1474.3	196.4	2194.6	238.8	753.5	76.1	1938.0	192.7	1769.1	264.8
	7	1192.5	131.6	852.3	138.6	991.8	101.8	831.5	13.0	2177.3	232.8	1279.8	149.5	1302.8	153.8	1295.8	186.0	1523.1	168.4	500.3	79.7
	8	2144.3	231.3	1318.1	178.2	1288.4	124.8	1763.1	186.1	1667.2	158.8	2164.8	275.3	990.6	108.0	892.0	123.2	1562.8	167.9	893.9	130.1
	9	1180.2	139.3	604.5	54.0	1513.2	144.0	1159.8	153.2	1060.8	125.1	679.1	74.6	1503.6	168.6	682.3	80.2	1671.9	168.7	716.5	88.3
	10	1923.1	225.2	1428.2	200.9	1861.8	174.3	1620.0	237.5	1567.5	145.5	2011.0	261.0	1338.1	128.5	1084.7	154.4	1902.0	189.4	1444.3	210.6
42	1	985.6	131.8	937.9	131.2	1128.3	142.3	2244.3	274.1	2561.6	204.8	1534.0	197.1	1310.1	156.8	1104.7	121.9	2036.0	213.8	1669.3	218.2
	2	1898.2	163.3	1575.5	196.6	1373.7	161.8	1347.2	161.0	1647.4	189.3	1905.7	274.4	1628.3	183.7	1227.8	238.2	1273.3	141.7	1208.3	159.8
	3	1566.5	172.7	1009.4	106.7	1683.7	204.5	2609.9	291.3	1911.3	215.4	1044.9	147.8	1599.0	163.5	1043.8	125.1	1066.2	144.2	1312.0	141.8
	4	1652.7	160.8	619.1	100.9	1726.0	210.8	2260.8	230.1	1175.7	138.6	1251.5	182.7	1236.6	147.2	1473.8	181.4	1659.2	154.7	1417.5	169.7
	5	1745.0	210.4	587.4	89.9	968.5	125.4	1663.3	189.3	1798.4	200.0	1008.4	132.5	1516.4	154.4	915.8	110.4	1955.3	237.3	1226.2	171.3
	6	1169.2	159.0	897.7	139.2	1705.1	196.9	984.2	123.3	2642.4	228.2	1170.5	163.0	1047.7	117.6	1426.8	214.0	1291.4	152.8	1438.1	193.6
	7	1689.6	173.8	486.8	69.6	1889.1	187.5	1573.6	170.5	1584.3	165.5	1793.7	141.0	1394.9	140.4	1058.2	129.7	1680.6	175.5	2233.6	260.5
	8	2147.5	249.4	434.4	51.9	1102.0	137.9	1568.1	208.0	1262.1	150.6	1148.5	135.4	1667.1	191.1	922.5	121.9	1374.2	147.9	1481.9	180.9
	9	1464.3	150.3	624.3	89.0	1155.8	144.7	2145.4	259.6	2053.7	208.6	787.9	90.7	1340.4	138.7	869.9	114.6	1127.4	134.1	638.4	73.1
	10	1454.4	159.0	987.4	156.9	1131.6	129.6	1424.7	187.8	2226.2	227.4	875.0	129.8	1859.0	218.7	1305.8	171.7	1597.3	181.9	911.1	123.3

PMF : Produção de Matéria Fresca

PMS : Produção de Matéria Seca

REP : Repetição

Apêndice 7: Valores obtidos para PMF e PMS (mg) de um clone de *E.urophylla* x *E.grandis* (U3) na fase de multiplicação de gemas cultivado em meio de cultura JADS sólido e líquido avaliadas a cada 7 dias durante 42 dias de cultura - Experimento III

DIAS												
7			14			21						
REP	Meio de cultura			Meio de cultura			Meio de cultura					
	SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO			
	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS		
1	628.5	57.6	759.6	69.9	81.9	728.9	81.9	88.0	876.5	90.6	759.4	86.2
2	831.1	66.0	1099.8	87.3	97.1	1094.5	97.1	81.1	1068.5	133.5	959.3	97.4
3	1133.6	96.4	559.4	49.7	104.8	1157.7	104.8	79.6	1121.6	108.9	750.4	115.5
4	913.6	64.8	492.8	44.6	113.8	1340.2	113.8	116.3	1095.9	106.1	735.8	85.4
5	675.2	58.8	715.3	72.5	96.5	976.1	96.5	90.0	1067.6	167.9	1589.2	104.4
6	342.1	31.2	655.6	72.2	120.4	1332.5	120.4	176.3	778.0	224.7	1974.9	82.3
7	700.8	70.0	761.5	63.1	81.7	1014.1	81.7	106.3	1958.8	205.4	1121.6	166.3
8	501.1	53.1	606.3	74.8	861.7	748.9	107.3	107.3	885.3	77.8	633.1	91.7
9	427.2	34.2	378.2	134.7	72.5	722.8	72.5	132.2	1517.6	108.5	836.2	127.9
10	583.7	54.2	323.5	94.4	77.0	852.6	77.0	108.0	1086.8	199.7	1904.1	112.1

DIAS												
28			35			42						
REP	Meio de cultura			Meio de cultura			Meio de cultura					
	SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO	SOLIDO		LIQUIDO			
	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS	PMF	PMS		
1	726.3	86.6	1276.8	166.8	164.0	1459.8	164.0	50.4	1497.2	159.6	1875.5	188.8
2	1599.4	180.6	1140.6	144.2	128.7	2221.6	128.7	68.9	1516.6	176.9	1487.7	221.2
3	1617.7	150.9	1242.9	155.2	155.7	1452.5	155.7	157.6	1190.8	145.8	1406.3	183.9
4	1126.2	112.8	1608.9	194.9	160.3	1528.6	160.3	206.1	1234.6	134.4	756.9	99.1
5	1663.9	189.5	1071.0	164.8	177.9	1519.8	177.9	151.7	1629.9	187.4	870.2	102.5
6	1377.9	146.7	1363.6	143.0	142.9	1358.5	142.9	36.8	1648.5	185.4	1481.1	164.2
7	1587.1	140.0	1453.8	192.9	154.7	1688.9	154.7	10.9	1544.1	166.0	1663.1	240.3
8	1344.2	149.5	642.7	95.5	184.4	1745.1	184.4	219.7	1647.6	170.8	1380.0	161.3
9	1578.7	164.1	1907.6	173.3	185.9	1626.1	185.9	195.3	1680.8	168.2	1453.5	167.3
10	1676.6	165.4	1311.7	157.3	167.4	1556.5	167.4	160.5	1320.6	136.2	1566.3	192.9

PMF : Produção de Matéria Fresca

PMS : Produção de Matéria Seca

REP : Repetição

CLONE														
T D I A T	R	R	E	P	G2									
					A	B	C	D	E	F	G	H	PMS	PMF
0	1	1											11.2	74.4
2	1	2											14.3	103.3
3	1	3											7.2	88.2
4	1	4											10.1	66.6
5	1	5											11.4	86.0

PMF : Produção de Matéria Fresca
CLASSES DE ALTURA:
A= <0,5 cm
E= >2,0 cm a 2,5 cm

PMS : Produção de Matéria Seca
B= >0,5 cm a 1,0 cm
F= >2,5 cm a 3,0 cm
G= >3,0 cm a 3,5 cm

REP = Repetição
D= >1,5 cm a 2,0 cm
H= >3,5 cm a 4,0 cm

TRAT = Tratamento

T D I A T		CLONE																			
		G2										G5									
		PMS	PMF	A	B	C	D	E	F	G	H	PMS	PMF	A	B	C	D	E	F	G	H
7	1	27.7	235.4									41.4	558.8								
	2	48.6	468.2									42.6	432.4								
	3	33.9	354.7									17.5	191.9								
	4	34.1	360.3									40.7	430.9								
	5	46.7	412.6									35.9	295.9								
	6	40.0	298.2									31.3	277.4								
	7	46.1	500.8									36.1	263.3								
	8	30.1	193.7									29.7	262.9								
	9	38.9	235.4									28.0	288.0								
	10	48.1	344.7									24.3	243.6								
2	1	44.8	299.4									31.1	183.3								
	2	49.3	322.3									26.4	269.2								
	3	26.1	269.0									27.9	245.1								
	4	29.5	197.9									34.4	399.1								
	5	40.2	300.4									25.1	219.0								
	6	35.1	249.0									29.9	230.8								
	7	58.9	407.2									40.0	363.8								
	8	68.2	484.5									49.6	449.5								
	9	29.0	286.2									20.9	186.7								
	10	54.8	451.6									47.5	245.5								
3	1	65.1	465.9									32.2	262.2								
	2	36.4	273.1									27.7	242.4								
	3	25.7	242.4									24.4	224.3								
	4	69.7	480.4									15.8	131.3								
	5	55.9	391.3									17.8	188.5								
	6	30.1	206.9									23.3	196.6								
	7	48.6	349.8									16.6	168.4								
	8	22.8	184.2									26.9	210.4								
	9	43.2	361.6									34.4	308.8								
	10	35.0	229.9									18.3	172.9								
4	1	46.8	360.3									32.0	300.9								
	2	64.1	486.4									39.7	319.6								
	3	50.9	363.8									17.1	142.5								
	4	50.6	383.8									35.6	352.8								
	5	45.9	342.4									26.5	214.3								
	6	37.2	397.2									29.5	257.9								
	7	34.6	275.2									40.7	282.5								
	8	40.0	266.2									31.6	266.0								
	9	32.1	234.0									29.2	246.5								
	10	36.0	253.3									25.0	184.9								
5	1	62.0	411.6									41.7	274.4								
	2	25.6	184.8									34.6	322.4								
	3	53.7	365.1									42.5	421.7								
	4	28.9	221.2									27.7	232.7								
	5	26.6	207.2									25.9	173.7								
	6	30.3	303.0									37.6	408.1								
	7	56.7	378.4									26.4	174.8								
	8	29.9	208.8									30.7	292.6								
	9	32.7	247.6									31.7	251.4								
	10	41.9	340.5									22.1	194.5								

TRAT = Tratamento

REP = Repetição

PMS : Produção de Matéria Fresca

PMF : Produção de Matéria Seca

CLASSES DE ALTURA: A = <0,5 cm B = >0,5 cm a 1,0 cm C = >1,0 cm a 1,5 cm D = >1,5 cm a 2,0 cm E = >2,0 cm a 2,5 cm F = >2,5 cm a 3,0 cm G = >3,0 cm a 3,5 cm H = >3,5 cm a 4,0 cm

T D I A T		CLONE																			
		G2										G5									
		PMS	PMF	A	B	C	D	E	F	G	H	PMS	PMF	A	B	C	D	E	F	G	H
14	1	91.2	638.4	10.0	7.0							53.6	540.9	10.0	3.0	7.0					
	2	52.8	363.7									43.2	360.2								
	3	106.3	1013.1	10.0	7.0							68.5	639.0	9.0	11.0	12.0					
	4	83.1	573.0	1.0	2.0							71.8	743.5	19.0	33.0						
	5	94.7	717.8									59.3	635.9								
	6	102.0	764.8	3.0								41.9	359.8	13.0	3.0						
	7	94.7	798.7									41.2	342.1	24.0	23.0	12.0					
	8	93.7	845.1									97.8	977.2								
	9	63.7	478.4									74.0	674.9								
	10	63.3	463.3	15.0	3.0	2.0						35.2	262.7								
2	1	147.7	1384.5	18.0	11.0	8.0	2.0	2.0				69.5	720.9								
	2	98.3	699.5									72.8	728.1								
	3	70.4	488.0									97.7	935.7	31.0	16.0	10.0	2.0				
	4	107.7	884.1									78.1	853.7	10.0	15.0	7.0					
	5	76.2	674.0	15.0	28.0	22.0	1.0					86.6	823.7	20.0	6.0	6.0	2.0	2.0			
	6	104.1	844.8	7.0	10.0	10.0						101.5	938.3	27.0	17.0	8.0					
	7	138.8	1406.3	5.0	13.0	8.0	8.0					82.8	785.7								
	8	106.3	838.4									64.0	593.7								
	9	162.6	1629.8	5.0	24.0	14.0						60.5	689.3								
	10	114.7	1201.3									106.0	968.7	11.0	19.0	7.0	3.0	1.0			
3	1	78.4	865.6	8.0	9.0	11.0	4.0					93.7	878.4								
	2	125.7	1190.4									101.8	1088.6								
	3	136.9	1344.0	4.0	11.0	6.0	11.0					99.2	1016.9	35.0	28.0	5.0					
	4	125.0	1185.6									123.5	1246.3	28.0	18.0	14.0	5.0	2.0			
	5	113.4	1332.7	7.0	14.0	22.0						72.6	622.1								
	6	150.3	1276.2									100.2	1143.3	35.0	24.0	19.0	1.0				
	7	104.0	1050.6									115.5	1281.3	38.0	21.0	23.0					
	8	104.6	973.8									78.6	743.3								
	9	136.5	1136.2	6.0	19.0	11.0	6.0					91.7	935.8	34.0	17.0	13.0					
	10	153.4	1488.6	3.0	8.0	9.0	4.0	1.0				68.7	705.3								
4	1	99.4	1154.3									75.2	728.1	22.0	9.0	7.0					
	2	144.0	1401.8	15.0	14.0	15.0						74.7	679.1	21.0	10.0	4.0					
	3	145.8	1542.7									78.4	665.5								
	4	93.2	932.1									50.7	507.9								
	5	97.9	853.4									81.2	726.8	24.0	21.0	10.0	1.0				
	6	134.4	1598.0	7.0	18.0	18.0						125.9	1427.6								
	7	159.9	1536.6	15.0	22.0	13.0						60.8	660.5								
	8	141.0	1528.3	9.0	12.0	13.0	8.0					62.4	647.6	47.0	15.0	9.0					
	9	174.2	1761.2	2.0	11.0	7.0	21.0	3.0				97.6	1018.5	40.0	14.0	4.0	2.0				
	10	121.8	1233.0									90.7	920.2	39.0	8.0						
5	1	100.7	569.7	4.0								76.6	681.9	15.0	16.0	9.0					
	2	114.0	906.9									54.6	416.1	16.0	17.0						
	3	47.9	313.7		5.0	1.0						70.2	571.5								
	4	47.1	299.0									36.0	257.5								
	5	71.9	818.2	3.0	4.0							40.5	298.2								
	6	73.9	613.6	7.0	3.0							41.9	328.3	11.0	11.0						
	7	52.0	329.4									57.8	456.8								
	8	105.8	1000.5	5.0	2.0							69.1	613.7	7.0	17.0						
	9	106.4	915.7	10.0	5.0	1.0						61.0	550.7								
	10	51.2	412.0																		

TRAT = Tratamento

REP = Repetição
D= >1,5 cm a 2,0 cm
H= >3,5 cm a 4,0 cm

PMS : Produção de Matéria Seca
B= >0,5 cm a 1,0 cm C= >1,0 cm a 1,5 cm
F= >2,5 cm a 3,0 cm G= >3,0 cm a 3,5 cm

PMF : Produção de Matéria Fresca
A= <0,5 cm
E= >2,0 cm a 2,5 cm

T D I A T		CLONE																			
		G2										G5									
		PMS	PMF	A	B	C	D	E	F	G	H	PMS	PMF	A	B	C	D	E	F	G	H
21	1	80.3	918.9	2.0	6.0							88.7	1029.4	12.0	19.0	1.0					
	2	131.0	1035.8	6.0	13.0							59.4	504.3	12.0	25.0	3.0					
	3	96.8	935.1									76.5	788.1	7.0	9.0	11.0	1.0				
	4	121.9	1068.5									63.3	540.4								
	5	89.4	939.0	3.0	18.0	1.0						80.3	674.8	20.0	25.0	9.0					
	6	67.7	661.6									104.5	1308.4								
	7	97.7	823.8	8.0	4.0	1.0	1.0					56.1	489.4								
	8	120.3	1061.1									54.2	454.7	9.0	23.0	6.0	1.0				
	9	76.0	609.3	5.0	6.0	3.0						94.2	931.4								
	10	96.6	1044.4									66.2	640.2								
2	1	157.6	1342.5	10.0	7.0	14.0						162.5	1549.8	12.0	30.0	27.0	14.0	1.0			
	2	116.0	1077.8									247.4	2001.5								
	3	127.3	1140.9	23.0	20.0	6.0	3.0					178.1	1609.3	3.0	11.0	33.0	6.0	4.0			
	4	198.2	1901.9									218.8	1825.5	12.0	27.0	24.0	6.0	1.0			
	5	174.8	1783.4	52.0	27.0	22.0	7.0					250.0	2344.6								
	6	200.1	2129.3	11.0	15.0	7.0	4.0	1.0				139.0	1288.4	18.0	31.0	25.0	4.0				
	7	184.0	1942.4									173.1	1764.1								
	8	103.8	1002.8	25.0	21.0	8.0						153.4	1274.4								
	9	158.8	1532.2									96.5	949.7	25.0	44.0	13.0	4.0	1.0			
	10	184.3	1631.5	20.0	27.0	21.0	21.0	5.0	3.0			103.4	940.1	36.0	45.0	9.0	1.0				
3	1	373.1	3846.5	27.0	35.0	29.0	2.0	11.0	2.0			191.4	2139.5	33.0	24.0	6.0	2.0				
	2	236.5	2644.6	14.0	29.0	26.0	16.0					134.2	1280.0	25.0	28.0	4.0	2.0				
	3	390.1	4051.5									107.8	965.5								
	4	184.7	1857.8	15.0	28.0	13.0	5.0	1.0				169.8	1878.3	19.0	24.0	9.0	2.0				
	5	231.1	2303.9									163.6	1578.6	25.0	28.0	4.0	2.0				
	6	205.3	2190.4	50.0	35.0	24.0	2.0					74.8	717.3	19.0	24.0	9.0	2.0				
	7	210.3	2000.2									139.5	1509.6	30.0	28.0	8.0	1.0				
	8	210.5	3458.0									102.2	1019.3	30.0	28.0	19.0	1.0				
	9	189.3	1855.4									172.1	1792.1	30.0	35.0	6.0					
	10	315.6	3428.5									240.1	2297.5	30.0	35.0	19.0					
4	1	144.9	1518.4	29.0	31.0	27.0	12.0	2.0				74.4	841.8	20.0	37.0	6.0					
	2	208.6	2290.2	42.0	30.0	32.0	13.0					206.5	2076.4								
	3	317.0	3666.7									126.7	1281.4								
	4	395.9	4767.0									161.1	1544.8	20.0	37.0	6.0					
	5	155.9	1487.7	47.0	61.0	24.0	3.0	5.0	2.0			143.4	1431.6	9.0	17.0	16.0					
	6	452.6	5171.7	25.0	40.0	35.0	5.0					201.8	1927.7	47.0	27.0	13.0	2.0				
	7	350.4	3850.9	7.0	19.0	16.0	4.0					161.4	1696.0	45.0	24.0	9.0	1.0				
	8	200.0	1993.3									224.8	2289.0	5.0	25.0	3.0	4.0				
	9	269.5	2712.2									230.8	2434.6	10.0	27.0	10.0					
	10	216.9	2751.4	9.0	11.0	9.0	1.0					83.4	882.0	10.0	27.0	10.0	4.0				
5	1	113.6	1298.1	19.0	14.0	14.0						114.2	1204.0	10.0	27.0	10.0	4.0				
	2	161.3	1585.5									76.8	802.0								
	3	184.6	1937.1									106.1	1178.9	10.0	9.0	5.0					
	4	93.1	1078.0									82.0	918.9	10.0	19.0	3.0	3.0				
	5	74.0	806.9	2.0	18.0	18.0	3.0	2.0				94.7	915.0	10.0	19.0	3.0					
	6	185.2	1938.5									122.6	1338.9								
	7	140.6	1345.9									57.1	592.0								
	8	80.6	870.2	31.0	20.0	8.0	3.0	1.0				100.1	1094.5	9.0	30.0	8.0	4.0				
	9	129.6	1361.2	10.0	15.0	12.0	2.0	1.0				125.0	1290.8								
	10	111.9	1240.2																		

TRAT = Tratamento

REP = Repetição

PMS : Produção de Matéria Seca

PMF : Produção de Matéria Fresca

CLASSES DE ALTURA: A = <0,5 cm E = >2,0 cm a 2,5 cm B = >0,5 cm a 1,0 cm F = >2,5 cm a 3,0 cm C = >1,0 cm a 1,5 cm G = >3,0 cm a 3,5 cm D = >1,5 cm a 2,0 cm H = >3,5 cm a 4,0 cm

T D I A T		CLONE																			
		G2										G5									
		PMS	PMF	A	B	C	D	E	F	G	H	PMS	PMF	A	B	C	D	E	F	G	H
28	1	127.7	831.4	29.0	16.0	7.0	1.0					163.0	1222.2	15.0	22.0	16.0	5.0	1.0			1.0
	2	108.2	1064.8									103.3	841.3	11.0	13.0	7.0	3.0				
	3	165.9	1402.8									85.6	497.2								
	4	149.2	1056.5									106.0	885.7	30.0	13.0	8.0	2.0				
	5	138.3	1126.7	14.0	25.0	8.0						111.6	748.4								
	6	141.1	890.0									94.3	627.5								
	7	91.1	751.4	16.0	10.0	5.0						83.4	719.9								
	8	70.3	643.1									93.9	670.5	2.0	14.0	9.0		2.0			
	9	175.9	1212.2	19.0	20.0	8.0	2.0					86.3	834.4								
	10	151.0	1104.9	10.0	5.0	6.0						122.9	942.4	21.0	21.0	12.0	3.0		1.0		
2	1	181.4	1644.9									279.8	2408.4	80.0	50.0	20.0	5.0				
	2	335.9	3009.9	40.0	86.0	25.0	8.0					230.3	2056.4	26.0	28.0	33.0	4.0				
	3	271.1	2548.7									233.5	2483.0								
	4	242.2	2039.5									213.1	1662.4	50.0	35.0	13.0	12.0				
	5	290.2	2289.1	6.0	19.0	12.0	10.0	9.0	3.0	1.0		195.0	1728.7	34.0	60.0	27.0	5.0				
	6	237.6	2021.4									232.9	2350.1								
	7	253.2	1883.4	8.0	15.0	10.0	12.0	2.0	1.0	1.0		199.0	1768.3								
	8	224.0	1925.7	6.0	19.0	12.0	10.0	9.0	3.0			186.4	1993.8								
	9	141.6	1184.5									107.3	1110.4								
	10	277.6	2213.2	35.0	26.0	22.0	6.0	4.0				225.3	2029.1	24.0	32.0	40.0	7.0	1.0			
3	1	155.6	1398.8									220.5	2558.5								
	2	248.7	2525.2	65.0	31.0	23.0	5.0					273.1	3030.3								
	3	188.2	1815.4									240.9	3371.9								
	4	224.0	1953.4									331.1	3744.6	131.0	76.0	46.0	20.0				
	5	225.0	1837.1									214.1	2666.5								
	6	178.6	1601.8									292.1	3243.8	126.0	61.0	40.0	1.0				
	7	226.5	2470.1	38.0	27.0	18.0	6.0	2.0	1.0			290.4	3266.6	125.0	54.0	32.0	10.0				
	8	434.9	4862.3	140.0	74.0	28.0	4.0					366.4	4608.8	205.0	85.0	41.0	12.0				
	9	355.8	3515.0	61.0	42.0	35.0	6.0	2.0				259.6	3168.2	110.0	85.0	36.0	8.0	1.0			
	10	459.7	4531.6	143.0	76.0	36.0	12.0					245.2	3114.1								
4	1	390.7	4425.6	45.0	57.0	59.0	18.0	5.0	1.0	1.0		189.4	2357.6	120.0	54.0	50.0	10.0	1.0			
	2	275.3	3030.1									326.7	2642.2	295.0	100.0	20.0	3.0				
	3	270.8	2973.5									401.1	4937.7	210.0	95.0	30.0	5.0	1.0			
	4	357.3	4580.6	70.0	85.0	45.0	6.0					328.8	3550.2								
	5	446.0	5357.4	35.0	57.0	45.0	11.0	7.0	1.0			276.5	3428.4								
	6	385.4	4240.2	52.0	55.0	54.0	11.0	3.0	1.0			232.8	2604.9								
	7	349.4	4306.9									244.8	2962.5								
	8	528.1	5786.2	28.0	76.0	58.0	31.0	12.0				404.5	5183.5	227.0	100.0	17.0					
	9	220.5	2201.4									121.7	1536.1								
	10	298.1	3456.0									359.1	4608.0	180.0	135.0	70.0	1.0				
5	1	155.5	1236.5									144.0	1480.0								
	2	284.3	2072.2									121.6	1207.9								
	3	198.5	1722.1	25.0	25.0	12.0	1.0	1.0				177.4	1587.3								
	4	204.2	1723.5	18.0	15.0	12.0	4.0					237.9	2247.1	90.0	31.0	22.0	6.0	1.0			
	5	146.0	1006.8									203.7	1654.7	54.0	26.0	15.0	10.0				
	6	149.9	1159.7									142.2	1214.8	47.0	20.0	19.0	3.0				
	7	158.4	1306.3									198.3	1718.0	53.0	23.0	18.0	9.0	4.0			
	8	274.2	2091.7	14.0	23.0	16.0	6.0	1.0				167.1	1288.0								
	9	208.8	1781.5	18.0	15.0	12.0	4.0					159.3	1538.6								
	10	202.1	1665.6	25.0	25.0	15.0	3.0	1.0				172.5	1623.6	135.0	23.0	12.0					

TRAT = Tratamento

REP = Repetição

PMS : Produção de Matéria Fresca

PMF : Produção de Matéria Seca

CLASSES DE ALTURA: A = <0,5 cm E = >2,0 cm a 2,5 cm B = >0,5 cm a 1,0 cm C = >1,0 cm a 1,5 cm D = >1,5 cm a 2,0 cm F = >2,5 cm a 3,0 cm G = >3,0 cm a 3,5 cm H = >3,5 cm a 4,0 cm

T D I A T		CLONE																			
		G5																			
		G2																			
		PMS	PMF	A	B	C	D	E	F	G	H	PMS	PMF	A	B	C	D	E	F	G	H
35	1	117.4	1277.4	18.0	15.0	2.0						152.3	805.9	26.0	17.0	12.0					
	2	141.5	1333.0	41.0	16.0	4.0						105.9	828.0	7.0	5.0	12.0					
	3	129.3	1068.4	10.0	15.0	12.0	1.0					126.6	908.0								
	4	187.7	1373.5									169.9	1242.7								
	5	85.6	494.4									93.6	632.1								
	6	125.9	861.4									111.7	676.8								
	7	95.3	648.0									62.9	445.4								
	8	139.1	1237.2	16.0	25.0	9.0						141.0	1417.6								
	9	142.4	1056.8									96.1	683.4								
	10	156.0	1377.5	10.0	19.0	7.0						178.1	1800.4								
2	1	249.0	1640.6	17.0	16.0	11.0	4.0					249.9	2184.4	62.0	33.0	27.0					
	2	158.8	1502.2									271.4	2022.6	62.0	53.0	27.0					
	3	104.2	682.6									200.6	1529.6								
	4	188.5	1413.2	21.0	10.0	12.0	5.0					209.0	1971.4								
	5	246.2	1691.7	30.0	33.0	8.0	2.0					203.6	1866.5								
	6	123.5	793.7									234.0	2033.7								
	7	236.9	1716.7	46.0	29.0	13.0	4.0					257.2	2560.8								
	8	241.3	1545.6									387.5	4021.5	180.0	102.0	34.0					
	9	194.1	1213.3									198.3	2014.6								
	10	210.7	1191.8	22.0	6.0	3.0	3.0					124.8	1451.4								
3	1	270.4	2179.5	29.0	61.0	41.0	2.0					351.7	3819.9	139.0	74.0	42.0					
	2	225.8	1750.9									319.6	3100.9	104.0	52.0	34.0					
	3	395.2	3633.6	64.0	54.0	49.0	6.0					202.7	1742.1								
	4	239.5	1581.5									243.6	2402.9	150.0	93.0	43.0					
	5	481.9	3984.0	74.0	62.0	50.0	6.0					249.8	2409.1								
	6	330.2	2739.8	59.0	37.0	27.0	5.0					405.5	3891.8	145.0	80.0	25.0					
	7	193.8	1416.7									326.6	3420.6	390.0	104.0	14.0					
	8	247.1	1808.8									363.9	3682.8								
	9	200.7	1566.8	31.0	16.0	11.0	7.0					297.4	3157.5	139.0	57.0	35.0					
	10	302.0	2246.5									427.2	4531.8	190.0	112.0	51.0					
4	1	342.3	3800.2	106.0	53.0	40.0	23.0					289.4	3304.0	315.0	191.0	24.0					
	2	343.4	3683.1	85.0	56.0	47.0	13.0					292.2	3640.3								
	3	357.6	2979.7	24.0	35.0	37.0	12.0					362.7	2975.7								
	4	437.7	4807.8	130.0	70.0	67.0	12.0					282.8	2821.4								
	5	252.7	2373.0									248.5	2635.7								
	6	428.9	4261.6	96.0	53.0	39.0	14.0					253.6	2168.6	51.0	44.0	40.0					
	7	317.6	3278.9									245.0	1847.1	38.0	75.0	33.0					
	8	197.9	3327.9									212.3	1659.9	50.0	49.0	32.0					
	9	315.3	2701.7									203.6	1562.3								
	10	327.4	3175.9									203.5	1860.7								
5	1	210.2	1598.9	40.0	22.0	15.0	5.0					183.2	1762.2	31.0	41.0	41.0					
	2	148.2	2207.1									196.7	1873.4								
	3	221.8	1097.8	80.0	24.0	11.0	5.0					236.2	2647.2	30.0	61.0	41.0					
	4	239.7	2171.7	32.0	29.0	24.0	5.0					172.3	2018.9								
	5	185.6	1641.8									169.0	1482.4								
	6	190.3	1569.4																		
	7	249.7	2143.4																		
	8	256.9	2187.1	91.0	31.0	12.0	3.0														
	9	234.0	1897.5	65.0	18.0	12.0	5.0														
	10	180.1	1651.4																		

TRAT = Tratamento

REP = Repetição

PMS = Produção de Matéria Seca

PMF = Produção de Matéria Fresca

CLASSES DE ALTURA:

B = >0,5 cm a 1,0 cm
 C = >1,0 cm a 1,5 cm
 D = >1,5 cm a 2,0 cm
 E = >2,0 cm a 2,5 cm
 F = >2,5 cm a 3,0 cm
 G = >3,0 cm a 3,5 cm
 H = >3,5 cm a 4,0 cm