**EFEITO DO THIDIAZURON NA MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE
TRÊS HÍBRIDOS DE *Eucalyptus* spp.**

MÁRCIA MARIA DE LIMA

Engenheira Florestal

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área de Concentração: Ciências
Florestais.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Janeiro - 1998

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Lima, Márcia Maria de

Efeito do thidiazuron na multiplicação *in vitro* de três híbridos de *Eucalyptus spp.* /
Márcia Maria de Lima. - - Piracicaba, 1998.
91 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Clone de eucalipto 2. Cultura "in vitro" 3. Herbicida 4. Híbrido de eucalipto 5.
Melhoramento genético vegetal 6. Regulador de crescimento I. Título

CDD 634.9734

**EFEITO DO THIDIAZURON NA MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE
TRÊS HÍBRIDOS DE *Eucalyptus* spp.**

MÁRCIA MARIA DE LIMA

Aprovada em : 22/04/1998

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

ESALQ/USP

Prof^a Dr^a ADRIANA MARTINELLI PINHEIRO RODRIGUES

CENA/USP

Prof. Dr. MARCÍLIO DE ALMEIDA

ESALQ/USP

Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

Orientador

*Aos meus pais Iracema e Rubens (in
memorian) e aos meus irmãos Ivani
(especialmente), Osvaldo, Agnaldo e
Ricardo, por acreditarem em mim.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Antonio Natal Gonçalves pela orientação em todas as fases desse trabalho, e também pela oportunidade para realização deste curso;

Ao Professor Marcílio de Almeida e à Professora Adriana Martinelli Pinheiro Rodrigues pelas sugestões apresentadas ao trabalho;

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

Ao Engenheiro agrônomo Marcelo Correa Alves (Ciagri) pela orientação na análise estatística;

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

Aos funcionários da Biblioteca Central, Eliana (bibliotecária), Fátima, Silvana, Ronaldo e Aílton, e também aos da Biblioteca do Departamento de Ciências Florestais, Marialice (bibliotecária) e Paulinho pela atenção e gentileza;

Ao Udemilson do Laboratório de Secagem de Madeiras pela ajuda durante o período de secagem do material;

Ao José Roberto Romanini (Beto) pela atenção, sugestões e colaboração durante a instalação dos experimentos, e também pela amizade e estímulo;

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia das Árvores, especialmente Araci, Sandra, Lúcia e Yurika pela amizade e estímulo, e ao Edson pela ajuda com o material de revisão;

Aos amigos da graduação e do curso de Ciências Florestais;

À amiga Cláudia Chiarini Monteiro Lima pela amizade e companheirismo, não somente durante a realização desse trabalho, mas em todos os momentos;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
Resumo.....	xv
Summary	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 TDZ: Considerações gerais.....	3
2.2 Vantagens e desvantagens do TDZ em relação a outras citocininas.....	5
2.2.1 Vantagens.....	5
2.2.2 Desvantagens.....	6
2.2.2.1 Hiperhidria.....	6
2.2.2.2 Alongamento das gemas.....	7
2.2.2.3 Enraizamento	8
2.3 Proliferação de gemas axilares.....	10
2.4 Indução de gemas adventícias	12
2.5 Indução de calo.....	13
2.6 Embriogênese somática.....	14
2.7 Modo de ação	17
2.8 Combinação de reguladores de crescimento: efeito sinérgico	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Local.....	21
3.2 Material usado	21

3.3	Multiplicação de gemas <i>in vitro</i>	22
3.4	Características do explante padrão	23
3.5	Experimentos realizados	24
3.6	Delineamento estatístico	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Experimento 1: Efeito do TDZ e da interação TDZ x AIA na multiplicação de gemas de um clone de <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	28
4.1.1	Efeito do TDZ.....	28
4.1.2	Efeito da interação TDZ x AIA	34
4.1.3	Comparação qualitativa entre TDZ e BAP	36
4.2	Experimento 2: Efeito do TDZ e da interação TDZ x AIA na multiplicação de gemas do clone 1 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	39
4.2.1	Efeito do TDZ.....	39
4.2.2	Efeito da interação TDZ x AIA	45
4.2.3	Comparação qualitativa entre TDZ e BAP	47
4.3	Experimento 3: Efeito do TDZ e da interação TDZ x AIA na multiplicação de gemas do clone 2 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	50
4.3.1	Efeito do TDZ.....	50
4.3.2	Efeito da interação TDZ x AIA	55
4.3.3	Comparação qualitativa entre TDZ e BAP	59
4.4	Experimento 4: Efeito do TDZ na multiplicação de gemas de um clone de <i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	62
5	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	APÊNDICES	78

LISTA DE FIGURAS

	página
1: PMF (mg) de um clone de <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias.....	29
2: PMS (mg) de um clone de <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias.....	30
3: C (cm) de um clone de <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias	32
4: C (cm) de um clone de <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> para a interação TDZ x AIA em meio de multiplicação aos 21 dias	34
5: Valores médios para PMF (mg) de um clone de <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias	36
6: Valores médios para PMS (mg) de um clone de <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias	37
7: Valores médios para C (cm) de um clone de <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias	37

8: Gemas de um clone de <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> em meio de cultura Gonçalves (1980) modificado aos 21 dias de cultivo	38
9: PMF (mg) do clone 1 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias	40
10: PMS (mg) do clone 1 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias	41
11: C (cm) do clone 1 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias	43
12: C (cm) do clone 1 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> para a interação TDZ x AIA em meio de multiplicação aos 14 dias	46
13: Valores médios para PMF (mg) do clone 1 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias	47
14: Valores médios para PMS (mg) do clone 1 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias	48
15: Valores médios para C (cm) do clone 1 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias	48

16: Gemas do clone 1 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> em meio de cultura Gonçalves (1980) modificado aos 21 dias de cultivo	49
17: PMF (mg) do clone 2 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias	51
18: PMS (mg) do clone 2 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias	52
19: C (cm) do clone 2 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias	53
20: PMF (mg) do clone 2 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> para a interação TDZ x AIA em meio de multiplicação aos 14 dias	56
21: PMS (mg) do clone 2 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> para a interação TDZ x AIA em meio de multiplicação aos 14 dias	57
22: Valores médios para PMF (mg) do clone 2 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> em meio multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias	60
23: Valores médios para PMS (mg) do clone 2 de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> em meio multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias	60

- 24: Valores médios para C (cm) do clone 2 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias 61
- 25: Gemas do clone 2 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de cultura Gonçalves (1980) modificado aos 21 dias de cultivo 61
- 26: PMF (mg) de um clone de *E. grandis* x *E. tereticornis* em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias 63
- 27: PMS (mg) de um clone de *E. grandis* x *E. tereticornis* em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias 63
- 28: C (cm) de um clone de *E. grandis* x *E. tereticornis* em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias 65
- 29: Gemas de um clone de *E. grandis* x *E. tereticornis* em meio de cultura Gonçalves (1980) modificado aos 21 dias de cultivo 66

LISTA DE TABELAS

	página
1: Composição do meio de cultura Gonçalves (1980) modificado	23
2: Concentrações de TDZ (mg.L ⁻¹), BAP(mg.L ⁻¹) e AIA (mg.L ⁻¹) para os experimentos 1, 2 e 3	25
3: Concentrações de TDZ (mg.L ⁻¹) para o experimento 4.....	25
4: Valores médios de PMF (mg), PMS (mg) e C (cm) de um clone do híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias.....	31
5: TCR médio para PMS de um clone do híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E.</i> <i>grandis</i> na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias	33
6: Valores médios de C (cm) de um clone do híbrido de <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> para a interação TDZ x AIA na fase de multiplicação de gemas aos 21 dias de cultivo	35
7: Valores médios de PMF (mg), PMS (mg) e C (cm) do clone 1 do híbrido de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias.....	42

8: TCR médio para PMS do clone 1 do híbrido de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias	44
9: Valores médios de C (cm) do clone 1 do híbrido de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> na fase de multiplicação de gemas aos 14 dias de cultivo	45
10: Valores médios de PMF (mg), PMS (mg) e C (cm) do clone 2 do híbrido de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias.....	52
11: TCR médio para PMS do clone 2 do híbrido de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias	54
12: Valores médios de PMF (mg) do clone 2 do híbrido de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> para a interação TDZ x AIA na fase de multiplicação de gemas aos 14 dias de cultivo	55
13: Valores médios de PMS (mg) do clone 2 do híbrido de <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> para a interação TDZ x AIA na fase de multiplicação de gemas aos 14 dias de cultivo	56
14: Valores médios de PMF (mg), PMS (mg) e C (cm) de um clone do híbrido de <i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias.....	64

15: TCR médio para PMS de um clone do híbrido de <i>E. grandis</i> x <i>E.</i> tereticornis na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias	66
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	:	Ácido indol acético
AIB	:	Ácido indol butírico
ANA	:	Ácido naftaleno acético
BAP	:	6- Benzilaminopurina
2 iP	:	Isopenteniladenina
2,4-D	:	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
TDZ	:	Thidiazuron (N'-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5,1-uréia)
PBA	:	Ácido [2-1(pirenol) benzóico]
DPU	:	N - N' - difeniluréia
CPPU	:	N - (2-cloro - 4 -piridil) - N' - feniluréia
PMF	:	Produção de matéria fresca
PMS	:	Produção de matéria seca
C	:	Comprimento médio de gemas
p/v	:	peso/volume
TCR	:	Taxa de crescimento relativo

EFEITO DO THIDIAZURON NA MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE TRÊS HÍBRIDOS DE *Eucalyptus* spp.

Autora: MÁRCIA MARIA DE LIMA

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

RESUMO

Os objetivos desse trabalho foram: avaliar o comportamento de quatro clones de *Eucalyptus* em meio de multiplicação suplementado com diferentes concentrações de TDZ e determinar a concentração de TDZ mais adequada para a multiplicação de *Eucalyptus*; analisar o efeito sinérgico de TDZ com o AIA. Gemas de quatro clones pertencentes a três híbridos, *E. urophylla* x *E. grandis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. grandis* x *E. tereticornis* foram utilizadas como fonte de explante padrão (tufos de gemas ou nós epicórmicos). Essas gemas foram multiplicadas em meio de cultura Gonçalves (1980) modificado e suplementado com 0,3 mg.L⁻¹ de BAP (*E. urophylla* x *E. grandis*, *E. grandis* x *E. urophylla*) ou 0,5 mg.L⁻¹ de BAP (*E. grandis* x *E. tereticornis*) + 0,1 mg.L⁻¹ de AIA. Foram feitos subcultivos a cada 21 dias até a obtenção de explantes padrão suficientes para a instalação dos experimentos. Para os híbridos *E. urophylla* x *E. grandis* e *E. grandis* x *E. urophylla* foram testadas 5 concentrações de TDZ (0; 0,001; 0,01; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹) associadas a 2 concentrações de AIA (0 e 0,1 mg.L⁻¹). Gemas multiplicadas em meio de cultura suplementado com 0,3 mg.L⁻¹ de BAP + 0,1

mg.L⁻¹ de AIA serviram como parâmetro de qualidade (comprimento de gemas, presença de calo e hiperhidria) para gemas originadas em TDZ. Para o híbrido *E. grandis* x *E. tereticornis* foram testadas somente as 5 concentrações de TDZ (0; 0,001; 0,01; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹). As avaliações foram feitas aos 7, 14 e 21 dias para os parâmetros Produção de matéria fresca (PMF), Produção de matéria seca (PMS) e Comprimento médio de gemas (C). Essas avaliações permitiram concluir que: a concentração mais adequada para a multiplicação de gemas foi 0,01 mg.L⁻¹ de TDZ para todos os clones testados; as concentrações 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ de TDZ apresentaram efeito inibitório para a multiplicação adequada quanto à qualidade de gemas em todos os clones testados, uma vez que estas se caracterizaram pela presença de calo, hiperhidria, folhas quebradiças e com coloração verde claro, pecíolo com espessamento e coloração avermelhada; o TDZ proporcionou reduções significativas no comprimento de gemas nas concentrações 0,01; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ para os híbridos *E. urophylla* x *E. grandis*, *E. grandis* x *E. tereticornis* e para o clone 1 do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*; o híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* apresentou maior taxa de crescimento em todas as concentrações de TDZ; o híbrido *E. grandis* x *E. tereticornis* apresentou menor taxa de crescimento em todas as concentrações de TDZ; a multiplicação de gemas dos dois clones do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* foi mais efetiva em meio de multiplicação suplementado com BAP; a interação TDZ x AIA foi significativa para as variáveis Comprimento médio de gemas (clone 1 de *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis*), Produção de matéria fresca e Produção de matéria seca (clone 2 de *E. grandis* x *E. urophylla*).

EFFECT OF THIDIAZURON ON *in vitro* SHOOT MULTIPLICATION OF THREE *Eucalyptus* spp. HYBRIDS

Author: MÁRCIA MARIA DE LIMA

Adviser: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

SUMMARY

The aims of this work were: to evaluate the behavior of four clones of *Eucalyptus* spp. hybrids on multiplication medium supplemented with TDZ concentrations and to determine the most adequate TDZ concentration for the shoot multiplication; to analyse the synergistic effect of TDZ with IAA. Shoots from four clones of three *Eucalyptus* spp. hybrids, *E. urophylla* x *E. grandis*, *E. grandis* x *E. urophylla* and *E. grandis* x *E. tereticornis*, were utilized as explants. These shoots were multiplied on modified Gonçalves (1980) medium and supplemented with 0,3 mg.L⁻¹ for *E. urophylla* x *E. grandis* and *E. grandis* x *E. urophylla* or 0,5 mg.L⁻¹ of BAP for *E. grandis* x *E. tereticornis* plus 0,1 mg.L⁻¹ of IAA. Subcultures were made every 21 days to obtain enough explants to establish the trials. For the hybrids *E. urophylla* x *E. grandis* and *E. grandis* x *E. urophylla*, five TDZ concentrations (0; 0,001; 0,01; 0,1 and 1,0 mg.L⁻¹) and two IAA concentrations (0 and 0,1 mg.L⁻¹) were utilized. Shoots were cultivated on medium supplemented with 0,3 mg.L⁻¹ of BAP plus 0,1 mg.L⁻¹ of IAA to serve as standard for shoot quality (shoot height, callus induction and Hyperhydricity). For

the hybrid *E. grandis* x *E. tereticornis* only five TDZ concentrations (0; 0,001; 0,01; 0,1 and 1,0 mg.L⁻¹) were utilized. The evaluations were made at the 7th, 14th and 21st days of culture for fresh weight, oven dry weight and mean shoot height. These evaluations allowed to conclude that: the most adequate TDZ concentration for shoot multiplication was 0,01 mg.L⁻¹ for all clones tested; the TDZ concentrations of 0,1 and 1,0 mg.L⁻¹ were inhibiting for adequate shoot growth in relation to shoot quality for all clones tested. These concentrations induced callus, hyperhydricity, brittle leaves, leaf blade chlorosis, thick and redish petiole; TDZ induced significative reductions on shoot height at 0,01; 0,1 and 1,0 mg.L⁻¹ concentrations for the hybrids *E. urophylla* x *E. grandis*, *E. grandis* x *E. tereticornis* and for *E. grandis* x *E. urophylla* (clone 1); the hybrid *E. urophylla* x *E. grandis* showed the best growth in all TDZ concentrations tested; the hybrid *E. grandis* x *E. tereticornis* showed the poorest growth in all TDZ concentrations tested; the shoot multiplication of the two clones of the hybrid *E. grandis* x *E. urophylla* was more effective on medium supplemented with BAP; synergistic effect were significative for mean shoot height [*E. grandis* x *E. urophylla* (clone 1) and *E. urophylla* x *E. grandis*] and for fresh weight and oven dry weight [*E. grandis* x *E. urophylla* (clone 2)].

1 INTRODUÇÃO

A micropropagação é uma técnica da cultura *in vitro* de células e tecidos que tem sido muito utilizada por apresentar várias vantagens em relação aos métodos convencionais de propagação vegetativa, como a propagação em larga escala em períodos de tempo e espaço físico reduzidos, conservação de germoplasma, recuperação de plantas livres de doenças e apoio a programas de melhoramento genético (Grattapaglia & Machado, 1990).

No setor florestal, esta técnica tem sido utilizada principalmente para as espécies de *Pinus* e *Eucalyptus*. Apesar das inúmeras vantagens associadas à micropropagação, muitos estudos ainda são necessários para que o potencial dessa técnica possa ser melhor explorado.

Para as espécies florestais como *Eucalyptus*, isto é ainda mais evidente à medida em que muitas das pesquisas em micropropagação têm-se baseado no uso de meios de cultura inicialmente propostos para espécies não florestais, não se considerando a especificidade e exigência nutricional de cada espécie e/ou clone.

Além do aspecto nutricional do meio de cultura, outro fator muito importante está relacionado aos fitoreguladores, particularmente o balanço auxinina/citocinina no meio de cultura (Handro & Floh, 1990).

O thidiazuron é um herbicida que tem sido descrito em muitos trabalhos de micropropagação como um regulador de crescimento que apresenta efeitos semelhantes às citocininas sendo muito eficiente na micropropagação de várias espécies, principalmente arbóreas ou florestais (Hutteman & Preece, 1993).

Dessa maneira, levando-se em consideração a necessidade de novos estudos e de uma adequação do meio de cultura para espécies de *Eucalyptus* tem-se por objetivo:

- 1 Avaliar o comportamento de 4 clones de *Eucalyptus* em meio de multiplicação suplementado com diferentes concentrações de TDZ.
- 2 Determinar a concentração de TDZ mais adequada para a multiplicação de gemas de *Eucalyptus*.
- 3 Analisar o efeito sinérgico do TDZ com o AIA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TDZ : Considerações gerais

A atividade citocínica, ou seja, a capacidade de uma substância ou composto atuar como uma citocinina, é uma propriedade de dois tipos de compostos químicos: as adeninas e as uréias (Mok et al., 1982; Capelle et al., 1983). A classe das uréias pode ser dividida em pelo menos duas subclasses - as tiadiazoliuréias e as piridiluréias que abrangem vários compostos que desempenham alta atividade citocínica, que se equivalem ou excedem às mais ativas citocininas do tipo adenina como a zeatina, BAP, e cinetina (Mok et al., 1982; Thomas & Katterman, 1986).

O thidiazuron (N-fenil-N'-1,2,3-tiadiazol-5,1-uréia) é um composto pertencente à classe das tiadiazoliuréias (Mok et al., 1982) e foi primeiramente usado como desfoliante de algodão com o nome comercial de "DROPP" (Arndt¹ et al., citados por Mok & Mok, 1985).

Cruz et al. (1977) comprovaram a ação do thidiazuron como desfoliante, ao utilizar as dosagens 0,050, 0,125 e 0,250 kg/ha de ingrediente ativo (i.a.) em culturas de algodão. As dosagens 0,125 e 0,250 kg/ha foram as melhores. O

¹ ARNDT, F. R.; RUSCH, R.; STILLFRIED, H. V.; HANISCH, B.; MARTIN, W. C. A new defoliant. *Plant Physiology*, v. 57, 1976.

thidiazuron apresentou boa ação desfoliante, pois 7 dias após sua aplicação proporcionou queda de folhas superior a 80%, e aos 21 dias da aplicação os índices de queda de folhas superaram 90%.

Para Suttle (1985), a indução da abscisão das folhas pelo TDZ em “seedlings” de algodão ocorre pelo menos em parte através de um aumento dos níveis de etileno endógeno.

Para Wang et al. (1986) a quebra de dormência em gemas de maçã (*Malus domestica*) pelo TDZ está associada ao aumento de DNA, RNA e proteínas. Para os autores, essa transição do estado dormente para o estado biologicamente ativo envolve a síntese de DNA, RNA e proteínas.

Em *Cydonia oblonga* L. o TDZ previniu a senescência de folhas e induziu a formação de gemas axilares muito mais efetivamente quando comparado ao BAP (Dolcet-Sanjuan et al., 1991).

A propriedade biológica do TDZ como regulador de crescimento foi demonstrada primeiramente em culturas de calo de *Phaseolos lunatus* cv. Kingstom por Mok et al. (1982). Nesse experimento, comprovou-se que o TDZ não só estimulou a proliferação de calo, mas também excedeu todas as tiadiazoliuréias testadas em atividade citocínica. Sua superioridade também foi comprovada quando comparada à zeatina.

Similarmente a outras citocininas sintéticas, o TDZ é menos susceptível a enzimas degradantes quando comparadas a citocininas endógenas (Huetteman & Preece, 1993).

2.2 Vantagens e desvantagens do TDZ em relação a outras citocininas

2.2.1 Vantagens

O TDZ é mais ativo biologicamente do que o BAP ou a zeatina, e baixas concentrações são utilizadas na cultura de tecidos (Lu, 1993).

Innecco et al. (1993) estudaram o efeito do TDZ comparando-o com o BAP em pimentão (*Capsicum annuum* L.), e verificaram que o TDZ foi mais ativo que o BAP proporcionando melhores respostas morfogênicas em todas as concentrações testadas. No entanto, para Menegucci et al. (1993) existem diferenças nas respostas a essas citocininas, pois enquanto que para as cultivares de banana (*Musa* sp.) Maçã e Mysore o TDZ proporcionou maior número de brotos, para a cultivar Prata Anã o BAP foi melhor.

O TDZ é tão ou mais efetivo na maioria das espécies nas quais tem sido testado, particularmente nas espécies arbóreas (Lu, 1993). É capaz de induzir multiplicação de gemas em espécies como *Prunus* (Mante et al., 1989), *Cydonia oblonga* L. (Dolcet - Sanjuan et al., 1991), *Vitis vinifera* L. (Gribaudo & Fronda, 1991) e *Acer saccharinum* L. (Preece et al., 1991), que mostram baixas taxas de proliferação quando cultivadas em meio de cultura suplementado com citocininas comumente usadas em cultura *in vitro*.

2.2.2 Desvantagens

Em certas espécies, algumas desvantagens têm sido relatadas e associadas ao uso do TDZ, como hiperhidria (Briggs et al., 1988; Gribaudo & Fronda, 1991), morfologia anormal de folhas (Van Nieuwkerk et al., 1986; Briggs et al., 1988; Badzian et al., 1989, Gribaudo & Fronda, 1991; Kim et al., 1997), gemas curtas e não alongadas (Badzian et al., 1989; Preece & Imel, 1991; Kim et al., 1997), gemas fasciadas (Preece et al., 1991), diminuição ou eliminação do enraizamento (Badzian et al., 1989; Gribaudo & Fronda, 1991).

2.2.2.1 Hiperhidria

Hiperhidria ou vitrificação é um distúrbio fisiológico que ocorre devido a fatores físicos, químicos e bioquímicos atuando conjuntamente. Esse fenômeno é frequentemente associado ao acúmulo de etileno, tipo de agente solidificante, composição mineral do meio de cultura, tipo e concentração de citocinina (Pâques, 1991).

Sintomas de vitrificação e má formação de folhas foram observados em gemas de azaléia (*Rhododendron* sp) originadas em meio de cultura suplementado com TDZ por Briggs et al. (1988).

Gribaudo & Fronda (1991) concluíram que sintomas de vitrificação e má formação de folhas tornaram-se mais pronunciados à medida que se aumentou a concentração de TDZ em gemas axilares de *Vitis vinifera* L. cultivadas *in vitro*.

2.2.2.2 Alongamento de gemas

Citocininas comumente estimulam a proliferação de gemas e inibem seu alongamento. Dessa maneira, a inibição do alongamento de gemas pelo TDZ pode ser consistente devido à sua alta atividade citocínica, e poderia assim, ser considerado um efeito tóxico (Huetteman & Preece, 1993).

Tem sido atribuído ao TDZ a formação *in vitro* de gemas muito curtas em várias espécies como *Rhododendron* (Briggs et al., 1988; Preece & Imel, 1991), *Brassaia actinophylla* Endl. cv. Amate (Badzian et al., 1989), *Oxydendrum arboreum* (L.) DC. (Banko & Stefani, 1989), *Vitis vinifera* L. (Gribaudo & Fronda, 1991), *Liquidambar styraciflua* L. (Kim et al., 1997).

No entanto, o problema do alongamento das gemas pode ser superado através da transferência das culturas de gemas para um meio secundário isento de TDZ ou com um balanço diferente de reguladores de crescimento. Dessa maneira, um meio primário poderia ser usado para maximizar a proliferação de gemas, e depois de um tempo suficiente, as gemas ou aglomerados de gemas poderiam ser transferidas para um meio secundário com outras combinações de reguladores de crescimento (Huetteman & Preece, 1993).

Chalupa (1985) relatou que gemas de *Larix decidua* e *Pinus sylvestris* originadas em meio com TDZ, se alongaram após serem transferidas para meio isento de reguladores de crescimento. Gemas curtas de *Rhododendron* (menores que 10 mm) formadas em meio com TDZ, alongaram após serem transferidas para meio suplementado com 50 μ M de 2iP e 1 μ M de AIB. Após dois meses nesse meio essas gemas se alongaram e puderam ser enraizadas (Preece & Imel, 1991).

Alternativamente, tratamentos a frio podem ser usados para o alongamento de gemas. Briggs et al. (1988) refrigeraram gemas de *Rhododendron* sp a $3 \pm 1^\circ\text{C}$ durante dois meses. Depois do retorno às condições normais de luz e temperatura, essas gemas se alongaram rapidamente.

2.2.2.3 Enraizamento

O enraizamento de gemas pode ser dificultado devido ao efeito habituação das citocininas adicionadas ao meio de multiplicação. Isso pode ser uma grande preocupação quando se usa uma citocinina tão potente quanto o TDZ. Esta dificuldade na capacidade de enraizamento pode ser atribuída à alta atividade citocínica e persistência do TDZ quando comparado a outras citocininas do tipo adenina (Huetteman & Preece, 1993).

Explantes de *Brassaia actinophylla* cv. Amate foram cultivados em meio contendo TDZ (0,5-5,0 mg.L⁻¹) em combinação com ANA (0,10 ou 0,25 mg.L⁻¹). A formação de raízes das gemas, no entanto, foi altamente inibida mesmo quando estas foram transferidas para meio isento de reguladores de crescimento (Badzian et al., 1989).

Gemas de híbridos de *Rhododendron* originadas em meio contendo TDZ tiveram taxa de enraizamento variando entre 0 e 73 %, enquanto que gemas originadas em meio contendo 2iP apresentaram porcentagem de enraizamento variando entre 74 e 100 % (Preece & Imel, 1991).

Gribaudo & Fronda (1991) relataram que gemas de *Vitis vinifera* L. originadas em meio contendo 0,001 e 0,01 μM de TDZ, apresentaram porcentagem de enraizamento variando entre 50 e 80 % quando estas foram transferidas para meio isento de reguladores de crescimento. No entanto, em concentrações acima de 0,1 μM de TDZ a porcentagem de enraizamento foi diminuída ou eliminada.

Embora a diminuição no enraizamento em algumas espécies esteja associada ao TDZ, ela não é relatada para várias espécies como *Quercus robur*, *Quercus petraea*, *Fagus sylvatica*, *Betula pendula*, *Populus tremula*, *Tilia cordata*, *Sorbus aucuparia* e *Juglans regia* cujas gemas originadas em meio de cultura suplementado com baixas concentrações de TDZ, BAP ou PBA foram posteriormente enraizadas em meio contendo somente auxinas (AIB e ANA) (Chalupa, 1985).

Van Nieuwkerk et al. (1986) trabalhando com várias concentrações de TDZ (0,1; 1,0 e 10 μM) para multiplicação de gemas de maçã, obtiveram enraizamento destas após uma ou duas subculturas em meio isento de reguladores de crescimento.

Gemas de maçã obtidas a partir de folhas cultivadas em meio com TDZ foram posteriormente enraizadas em meio contendo somente 0,2 mg.L^{-1} de AIB (Theiler-Hedtrich & Theiler-Hedtrich, 1990). Para os autores, uma permanência acima de 8 semanas em meio com TDZ não é recomendada, pois posteriormente poderia ocorrer a inibição do alongamento e do enraizamento.

Em *Acer saccharinum* L., tanto explantes nodais adultos quanto juvenis cresceram em meio suplementado com 10 η M de TDZ, e essas gemas puderam ser enraizadas duas semanas após serem transferidas diretamente para casa de vegetação (Preece et al., 1991).

Para Kim et al. (1997) o uso do TDZ na indução de gemas adventícias de *Liquidambar styraciflua* não causou problemas para o subsequente enraizamento das gemas.

2.3 Proliferação de gemas axilares

O TDZ tem sido utilizado visando a micropropagação de um grande número de espécies arbóreas devido à sua grande capacidade em estimular a proliferação de gemas. Além de estimular a proliferação de gemas axilares, pode ocorrer a formação de calo e organogênese de gemas. Portanto, a seleção de níveis adequados de TDZ é essencial quando se deseja fidelidade clonal, uma vez que variantes somaclonais podem resultar de gemas adventícias e altas taxas de produção de gemas, frequentemente desejáveis para uma micropropagação eficiente, pode incluir tanto gemas axilares quanto adventícias (Huetteman & Preece, 1993).

Em maçã “Gala” (*Malus domestica* Borkh.), o número de gemas originadas em meio suplementado com 0,1; 1 e 10 μ M de TDZ foi igual ou maior, quando comparado com o meio suplementado com 4,4 μ M de BAP (Van Nieuwkerk et al., 1986).

Para Briggs et al. (1988) o nível ótimo de TDZ em relação à número e qualidade de gemas de azaléia (*Rhododendron* sp) variou em função da cultivar. Para a variedade 'Tobasco' o nível ótimo foi de 0,23 μM , para a variedade 'Gibraltar' foi de 0,23 μM -0,45 μM e para a variedade 'Peachy Keen' foi de 1,4 μM -2,3 μM .

Em cacau, o maior número de gemas axilares ocorreu em meio suplementado com 0,1 μM de TDZ (Figueira et al., 1991).

Em *Acer saccharinum* L., a proliferação de gemas axilares é bastante baixa em meio contendo cinetina, 2iP e BAP. No entanto, meio contendo TDZ estimulou a proliferação de gemas de explantes nodais juvenis e adultos (Preece et al., 1991).

Le Roux & Van Staden (1991) iniciaram culturas de explantes nodais de *Eucalyptus saligna* Sm., *E. macarthurii* Deane et Maiden, *E. smithii* R.T. Baker e do híbrido *E. macarthurii* x *E. grandis* Hill ex Maiden em meio de cultura MS modificado contendo 0,1 mg.L^{-1} de BAP. Na fase de multiplicação de gemas, o meio MS modificado foi suplementado com 0,01 mg.L^{-1} de ANA e várias concentrações de BAP (0,2; 0,5 ou 1,0 mg.L^{-1}) ou TDZ (0,1 ou 0,2 mg.L^{-1}). O meio suplementado com 0,2 mg.L^{-1} de BAP e 0,01 mg.L^{-1} de ANA foi o mais efetivo na multiplicação de gemas. A concentração de TDZ provavelmente foi muito elevada, pois houve somente formação de calo.

2.4 Indução de gemas adventícias

Embora gemas adventícias sejam geralmente indesejáveis para a micropropagação, pois podem resultar em variantes somaclonais, estas podem representar uma excelente oportunidade para regenerar plantas a partir de tecidos manipulados através da biotecnologia (Huetteman & Preece, 1993).

A regeneração de gemas adventícias a partir de calo em marmelo (*Cydonia oblonga* L.) constitui-se num pré requisito para a seleção de variantes somaclonais tolerantes à baixa disponibilidade de Fe^{++} . A partir disso, folhas foram cultivadas em meio contendo TDZ ou BAP. A maior frequência de regeneração ou porcentagem de explantes contendo gemas (78 %) foi obtida em meio suplementado com 32 μM de TDZ e 0,3 μM de ANA, enquanto que a taxa de regeneração com BAP (1, 3, 10, 32 e 100 μM) foi muito baixa (Dolcet-Sanjuan et al., 1991).

Gemas adventícias de *Larix decidua* e *Picea abies* foram induzidas a partir de cotilédones, acículas e primórdios de acículas, em meio suplementado com TDZ, BAP ou PBA (Chalupa, 1985).

Gemas adventícias foram regeneradas a partir da região proximal de cotilédones imaturos de *Prunus persica* e a partir da mesma região em cotilédones maduros de *Prunus domestica* e de *Prunus cerasus*, em meio suplementado com 2,5 μM de AIB e 5-12,5 μM de TDZ, após 35 dias de cultivo (Mante et al., 1989). Meio suplementado com AIB e TDZ também foi utilizado por Preece & Imel (1991) para regenerar gemas de híbridos de *Rhododendron* a partir de folhas.

2.5 Indução de calo

A proliferação de calo é desejável quando se deseja induzir variação somaclonal, para estudos fisiológicos, ou quando produtos secundários são desejados. O TDZ é uma citocinina potente para a indução de calo em explantes de espécies arbóreas, especialmente quando usados em concentrações iguais ou superiores a $0,1 \mu\text{M}$ (Huetteman & Preece, 1993).

A produção de calo é frequentemente um passo essencial na regeneração de órgãos adventícios, ainda que se acredite que o seu crescimento iniba a proliferação de gemas axilares na cultura de tecidos em espécies arbóreas. Altas concentrações de TDZ tendem a estimular a formação de calo em muitas espécies arbóreas às custas da proliferação de gemas axilares (Huetteman & Preece, 1993). Por exemplo, a altas concentrações de TDZ (1 ou $10 \mu\text{M}$) houve a formação de grande quantidade de calo na base de explantes de *Vitis vinifera* L. cultivados *in vitro*, enquanto que o número e o comprimento de gemas decresceu na concentração de $10 \mu\text{M}$ de TDZ (Gribaudo & Fronda, 1991).

Explantes de *Brassica actinophylla* cv. Amate cultivados em meio suplementado com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ formaram calo, seguido de indução de gemas. No entanto, estas se mostraram deformadas quando transferidas para meio isento de reguladores de crescimento (Badzian et al., 1989).

Em *Albizia julibrissin* Durrazz., grande quantidade de calo foi formado em meio contendo $0,1$ - $1,0 \mu\text{M}$ de TDZ, com posterior desenvolvimento de gemas (Sankhla et al., 1994).

Calos embriogênicos, porém, se formaram em meio contendo 0,009 μM de TDZ e 2,3-4,6 μM de 2,4-D em *Cayratia japonica* cultivada *in vitro* (Zhou et al., 1994).

2.6 Embriogênese somática

Dentre os reguladores de crescimento, as auxinas têm sido críticas na indução de calo embriogênico (Tisserat² et al., citados por Schultheis et al., 1990). As citocininas, porém, podem favorecer a formação de calo embriogênico, mas em algumas famílias parece não ser essencial (Chée & Cantliffe, 1988), e podem também melhorar a regeneração de plantas, a partir de embriões somáticos (Schultheis et al. 1990).

O TDZ foi utilizado para estimular a embriogênese somática em várias espécies como *Arachis hypogaea* L. (Murthy et al., 1995; Saxena et al., 1992), *Nicotiana tabacum* L. (Gill & Saxena, 1993), gerânio (*Pelargonium x hortorum*) (Visser et al., 1992; Hutchinson et al., 1996), *Cayratia japonica* (Thump.) (Zhou et al., 1994) e em *Eucalyptus urophylla* (Tibok et al., 1995).

Em três cultivares de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), embriões somáticos se desenvolveram na região apical e na superfície de cotilédones e hipocótilos de “seedlings” intactos, quando cultivados em meio de cultura com 5-40 μM de TDZ. Esses embriões se desenvolveram em plantas completas. No entanto, níveis superiores a 50-100 μM de TDZ inibiram a formação de embriões (Saxena et al., 1992).

² TISSERAT, B.; ESAN, E.; MURASHIGE, T. Somatic embryogenesis in angiosperm. **Horticultural Reviews**, v.1, p.1-78, 1979.

Visser et al. (1992) compararam o efeito do TDZ, TDZ + AIA, BAP e BAP + AIA sobre a indução de embriogênese somática em hypocótilos de gerânio (*Pelargonium x hortorum*). Embriões somáticos foram observados nas concentrações de 0,2 a 1,0 μM de TDZ em uma frequência significativamente superior à melhor concentração de BAP + AIA (8 μM e 1 μM , respectivamente).

Óvulos não polinizados de *Cayratia japonica* (Thunb.) foram cultivados em meio MS contendo diferentes concentrações de 2,4-D sozinho ou em combinação com 0,009 μM de TDZ ou 0,23 μM de cinetina. Embriões somáticos se originaram em maior frequência em meio contendo TDZ e 2,3-4,6 μM de 2,4-D. (Zhou et al., 1994).

Embriogênese somática direta foi obtida a partir de folhas de gemas de *Nicotiana tabacum* L. cultivadas em meio de cultura suplementado com 0,25-15 μM de TDZ, com a maior frequência de embriões em 0,5 μM de TDZ. Quando o meio com BAP (4,4 ou 44,4 μM) foi usado somente organogênese foi obtida, mas a inclusão de 0,54 μM de ANA proporcionou a formação de embriões somáticos embora em menor número comparado ao meio contendo TDZ (Gill & Saxena, 1993).

Calos iniciados a partir de hypocótilo de “seedlings” de 14 dias cultivados em meio MS suplementado com 0,01-2,0 mg.L^{-1} de TDZ e 0,05-2,0 mg.L^{-1} de ANA originaram embriões somáticos em *Eucalyptus urophylla*. A melhor concentração utilizada foi a de 0,5 mg.L^{-1} de TDZ e 0,1 mg.L^{-1} de ANA. No entanto, foi observada variação somaclonal entre as plantas regeneradas (28 % haplóides, 12 % triploides e remanescentes diplóides) (Tibok et al., 1995).

Não só a concentração do TDZ é importante para a manifestação do potencial embriogênico, mas também a duração da exposição ao TDZ. Experimentos sobre o efeito da duração da exposição a diferentes concentrações de TDZ têm fornecido muitas informações interessantes.

Para Visser et al. (1992), a exposição do explante a altas concentrações de TDZ por um curto período de tempo é suficiente para induzir a formação de embriões somáticos.

Culturas de gerânio expostas somente por dois dias em meio com 5 μ M de TDZ foram capazes de formar embriões somáticos após sua transferência para meio isento de reguladores de crescimento. No entanto, a exposição contínua nessa mesma concentração foi letal aos explantes (Visser et al., 1992).

Murthy et al. (1995) concluíram que para *Arachis hypogaea* L. cv. Tango existe uma relação direta entre embriogênese somática e concentração ou duração da exposição ao TDZ. Dessa maneira, aumentando-se a duração da exposição ao TDZ ou a sua concentração tem-se um aumento do número médio de embriões.

2.7 Modo de ação

O mecanismo através do qual o TDZ induz respostas semelhantes às das citocininas ainda não é totalmente entendido. Uma proposta do modo de ação das citocininas do tipo uréia, é a de que elas promovem a conversão de ribonucleotídeos citocínicos em ribonucleosídeos, que são biologicamente mais ativos (Capelle et al., 1983).

Thomas & Katterman (1986) concluíram que em cultura de calo de *Glicyne max* Merrill cv. Acme o TDZ promoveu a proliferação de calo através da síntese e/ou acúmulo de citocininas do tipo adenina. Os autores chegaram a essa conclusão ao verificar que quantidades similares de citocinina do tipo adenina foram encontradas em massas de calo cultivadas em meio suplementado com TDZ e também em tecidos cultivados em meio suplementado com zeatina.

Para Sankhla et al. (1994), o TDZ influenciou a produção de gemas a partir de raízes de “seedlings” de *Albizzia julibrissin* Durrazz. através da modulação do gradiente endógeno de reguladores de crescimento em favor da formação do primórdio de gema.

O mecanismo do TDZ induzindo a embriogênese somática também é pouco conhecido. No entanto, a embriogênese pode ser obtida em meio de cultura suplementado somente com TDZ. Isso pode ser uma indicação de que o TDZ pode ter atividade auxínica ou pode estar envolvido no metabolismo auxínico (Lu, 1993).

Para Visser et al. (1992) a alta eficiência com que o TDZ induziu embriogênese somática em gerânio pode ser um reflexo da sua capacidade em criar níveis endógenos ótimos de citocinina/auxina no tecido cultivado. Saxena et al. (1992) hipotetizaram que o TDZ ajuda no estabelecimento de um balanço ótimo de citocinina/auxina requeridos para a expressão da embriogênese somática ou ainda pode atuar como regulador de biossíntese e/ou acumulação de citocinina.

Análise de tecidos de *Arachis hypogaea* L. previamente cultivados em meio com TDZ mostraram que houve o aumento de triptamina, um precursor do AIA, e também do AIA citosólico nos tecidos analisados. Houve também uma redução dos níveis de 2iP, podendo sugerir assim, uma conversão do 2iP em outras formas de citocininas como a zeatina e adenosina. Desse modo, o TDZ induz embriogênese somática através da influência de níveis endógenos tanto de auxinas quanto de citocininas (Murthy et al., 1995).

Aumentos nos níveis de AIA e de seu precursor triptamina, também foram relatados por Hutchinson et al. (1996) no cultivo de gerânio. Isso indica que o TDZ promove a síntese “de novo” de auxinas ou reduz o catabolismo das mesmas (Hutchinson et al., 1996).

Enzimas que degradam citocininas provavelmente desempenham um papel importante no controle dos níveis endógenos de citocininas em plantas (Laloue & Fox, 1989). Esses autores relataram a purificação parcial dessa enzima em *Triticum aestivum* L., e enfatizaram a sua inibição por citocininas do tipo uréia como a DPU e a CPPU. Chatfield & Armstrong (1986) relataram que o TDZ também pode atuar através da inibição da citocinina oxidase em *Phaseolus vulgaris*.

2.8 Combinação de reguladores de crescimento: efeito sinérgico

Frequentemente a proliferação de gemas pode ser significativamente aumentada através da adição de uma baixa concentração de auxina ou pelo acréscimo de uma citocinina secundária no meio de multiplicação (Huetteman & Preece, 1993).

Combinações de TDZ e outros reguladores de crescimento, incluindo outras citocininas podem ser mais efetivos do que quando usados sozinhos para a obtenção de uma grande variedade de respostas *in vitro*. Isso pode indicar diferenças no reconhecimento pelas células, na absorção ou nos mecanismos de ação das citocininas (Huetteman & Preece, 1993). Briggs et al. (1988) trabalhando com azaléia (*Rhododendron* sp.), obtiveram um grande número de gemas vitrificadas e compactas em meio contendo somente TDZ. Por outro lado, a combinação de TDZ com 2iP proporcionou um grande aumento na qualidade das gemas produzidas. Dessa maneira tanto o 2iP quanto o TDZ parecem beneficiar mutuamente a qualidade e quantidade do crescimento *in vitro* da azaléia.

Culturas de *Hedera canariensis* L. também tiveram o número e o tamanho de gemas aumentados quando cultivadas em meio contendo TDZ e ANA. O efeito sinérgico entre TDZ e ANA sobre o desenvolvimento de gemas parece existir uma vez que nem TDZ e nem ANA sozinhos no meio de cultura foram capazes de induzir o desenvolvimento de gemas (Al-Juboory et al., 1991).

O TDZ também demonstrou ter um efeito sinérgico com ANA e 2,4-D, tanto na indução de calo embriogênico, como na iniciação e desenvolvimento de embriões somáticos em explantes de ovário de *Cayratia japonica* (Zhou et al., 1994).

Kim et al. (1997) relataram que o TDZ foi mais efetivo na produção de gemas de *Liquidambar styraciflua* quando o 2,4-D foi adicionado ao meio de cultura.

Em relação ao AIA, não houve um aumento significativo na regeneração de gemas de *Lonicera nítida* Wils. cv. 'Maigrun' quando essa auxina foi adicionada ao meio de cultura suplementado com TDZ (Cambecédes et al., 1991). Por outro lado, Obando et al. (1992) relataram que tanto a ausência quanto a presença de 1 mg.L⁻¹ de AIA, induziram respostas morfogenéticas em folhas de *Cyphomandra betacea* cultivadas em meio de cultura com 5 e 10 mg.L⁻¹ de TDZ. No entanto, a maior porcentagem de brotos (48%) foi obtida na ausência de AIA, enquanto que na presença dessa auxina, a formação de brotos reduziu para 24%.

Orlikowska & Gabryszewska (1995) relataram que a adição de 0,1 mg.L⁻¹ dessa auxina no meio de cultura suplementado com 0,01 mg.L⁻¹ de TDZ decresceu ligeiramente o número de gemas saudáveis de *Acer rubrun*, e estimulou a hiperhidria.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

Os experimentos foram realizados no laboratório de Fisiologia das Árvores - Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo em Piracicaba - SP no período de julho a novembro de 1996.

3.2 Material usado

Foram utilizados 4 clones de *Eucalyptus* spp. provenientes do trabalho de Correia (1993). Estes foram mantidos *in vitro* no Laboratório de Fisiologia das Árvores em meio de cultura Gonçalves (1980) modificado (Tabela 1) acrescido de 0,3 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de AIA, e subcultivados em intervalos de 3 semanas sob fotoperíodo de 16/8 horas à temperatura de 27 ± 2°C.

Os clones utilizados foram :

- A. Um clone do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*
- B. Dois clones do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*
- C. Um clone do híbrido *E. grandis* x *E. tereticornis*

3.3 Multiplicação de gemas *in vitro*

Para a multiplicação das gemas mantidas *in vitro*, que foram utilizadas como fonte de explante padrão utilizou-se o meio de cultura Gonçalves (1980) modificado (Tabela 1) suplementado com 0,3 mg.L⁻¹ de BAP para os híbridos *E. urophylla* x *E. grandis* e *E. grandis* x *E. urophylla* ou 0,5 mg.L⁻¹ de BAP para o híbrido *E. grandis* x *E. tereticornis* + 0,1 mg.L⁻¹ de AIA + 0,5% (p/v) de ágar (“Difco Bacto-Sigma”) + 3% (p/v) de sacarose.

O pH do meio foi ajustado entre 5,7-5,9, antes da adição de ágar e autoclavagem.

Foram realizados subcultivos a cada 21 dias aproximadamente, nas condições já descritas acima, até a obtenção do número suficiente de explantes padrão para a instalação dos experimentos, que foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e sob fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro).

Tabela 1: Composição do meio de cultura Gonçalves (1980) modificado

	Concentração (mg.L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	800,00
KNO ₃	1000,00
KH ₂ PO ₄	170,00
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	250,00
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80
Na ₂ EDTA	37,30
H ₃ BO ₃	6,20
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,03
MnSO ₄ .H ₂ O	1,70
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3,00
KI	0,75
Meso inositol	100,00
Tiamina	5,00
Piridoxina	0,50
Ácido nicotínico	0,50
Pantotenato de cálcio	1,00

3.4 Características do explante padrão

Os explantes padrão foram formados por tufos de gemas axilares ou nós epicórmicos e preparados de modo a se obter tamanho o mais homogêneo possível.

Foram feitas avaliações no dia da instalação dos experimentos de modo a se obter o peso fresco, peso seco e comprimento das gemas iniciais para cada clone. Essas avaliações foram determinadas pela média de 4 frascos contendo 4

explantes padrão cada, totalizando assim, 16 explantes padrão ou amostras para cada clone.

O peso fresco médio inicial dos explantes padrão foi de 160,35 mg, peso seco médio inicial de 14,85 mg e comprimento médio inicial das gemas de 0,89 cm.

3.5 Experimentos realizados

3.5.1 Experimento 1: Efeito do TDZ e da interação TDZ x AIA na multiplicação de gemas de um clone de *E. urophylla* x *E. grandis*.

3.5.2 Experimento 2: Efeito do TDZ e da interação TDZ x AIA na multiplicação de gemas do clone 1 de *E. grandis* x *E. urophylla*.

3.5.3 Experimento 3: Efeito do TDZ e da interação TDZ x AIA na multiplicação de gemas do clone 2 de *E. grandis* x *E. urophylla*.

3.5.4 Experimento 4: Efeito do TDZ na multiplicação de gemas de um clone de *E. grandis* x *E. tereticornis*.

Os experimentos 1, 2 e 3 se constituíram de 10 tratamentos que se encontram na Tabela 2:

Tabela 2: Concentrações de TDZ (mg.L^{-1}), BAP (mg.L^{-1}) e AIA (mg.L^{-1}) para os experimentos 1, 2 e 3

TRATAMENTOS	TDZ (mg.L^{-1})	AIA (mg.L^{-1})
1	0,0	0,0
2	0,0	0,1
3	0,001	0,0
4	0,001	0,1
5	0,01	0,0
6	0,01	0,1
7	0,1	0,0
8	0,1	0,1
9	1,0	0,0
10	1,0	0,1

TRATAMENTO	BAP (mg.L^{-1})	AIA (mg.L^{-1})
11	0,3	0,1

O experimento 4 se constituiu de 5 tratamentos, que se encontram no Tabela 3:

Tabela 3: Concentrações de TDZ (mg.L^{-1}) para o experimento 4

TRATAMENTOS	TDZ (mg.L^{-1})
1	0,0
2	0,001
3	0,01
4	0,1
5	1,0

Os demais tratamentos presentes nos experimentos 1, 2 e 3 não foram realizados no experimento 4 por não haver número suficiente de explantes padrão.

Com o intuito de avaliar visualmente a qualidade das gemas obtidas com TDZ nos experimentos 1; 2 e 3, simultaneamente foi realizado um tratamento adicional (denominado de número 11) com $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA (padrão utilizado no Laboratório de Fisiologia das Árvores), nas mesmas condições já descritas no item 3.3, que serviu como parâmetro de qualidade (tamanho de gemas, presença de calo e hiperhidria).

Para cada tratamento foram utilizados 12 frascos com 4 explantes padrão cada. Em cada frasco foram colocados 40 ml de meio de cultura. Cada frasco foi considerado uma repetição.

A cada 7 dias a partir da instalação dos experimentos foram retirados 4 frascos para cada tratamento e determinadas a produção de matéria fresca (PMF), a produção de matéria seca (PMS) e o comprimento médio de gemas (C).

Para a obtenção da produção de matéria seca (PMS), os explantes foram secos em estufa à temperatura de 60°C - 70°C até atingirem pesos constantes (48 horas).

A avaliação da taxa de crescimento relativo foi definida com as médias de PMS dos experimentos 1, 2, 3 e 4 através da equação segundo Hunt (1982).

$$\text{Taxa de crescimento relativo} = \frac{\ln \text{PMS2} - \ln \text{PMS1}}{T2 - T1} \cdot 100$$

onde: $\ln$ = logaritmo 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

3.6 Delineamento estatístico

Os experimentos 1, 2 e 3 foram instalados no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x2 e o experimento 4 foi instalado em delineamento inteiramente casualizado.

Para cada tratamento foram utilizados 12 frascos com 4 explantes padrão cada. Cada frasco foi considerado uma repetição. Foram sorteados 4 frascos por tratamento em cada período de avaliação (7, 14 e 21 dias), e em cada um deles foram determinados PMF, PMS e C. Assim, o número de repetições foi igual a 4.

Para avaliar o efeito dos tratamentos nas variáveis estudadas (PMF, PMS e C), foram feitas a análise de variância, teste de Tukey a 5 % de probabilidade e regressão polinomial em relação aos fatores TDZ e AIA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1: Efeito do TDZ e da interação TDZ x AIA na multiplicação de gemas de um clone de *E. urophylla* x *E. grandis*

4.1.1 Efeito do TDZ

As análises de variância dos dados mostraram que para as variáveis PMF e PMS houve diferença altamente significativa pelo teste F ($p < 0,01$) a partir do 14º dia de cultivo para o fator TDZ. Para o fator AIA, o mesmo aconteceu no 21º dia de cultivo (Apêndices 1 e 2).

Em relação à variável C, houve diferença altamente significativa ($p < 0,01$) a partir do 7º dia de cultivo para o fator TDZ. Para o fator AIA, não houve diferença significativa em nenhum dos períodos avaliados (Apêndice 3).

Portanto, houve efeito crescente das diferentes concentrações de TDZ sobre as variáveis analisadas.

As variáveis PMF, PMS e C mostraram uma resposta quadrática em relação ao TDZ (Figuras 1,2 e 3).

Houve um aumento crescente dos valores de PMF à medida que se aumentou as concentrações de TDZ, até a concentração 0,1 mg.L⁻¹. A partir dessa concentração, os valores dessa variável se estabilizaram (Figura 1).

$$y_1 = 256,998 + 482,161 \cdot x - 444,554 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,0687 \text{ ns})$$

$$y_2 = 388,424 + 1704,026 \cdot x - 1586,612 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,2724^{**})$$

$$y_3 = 582,177 + 2715,554 \cdot x - 2493,499 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,2371^{**})$$

onde y_1 , y_2 e y_3 = PMF (mg) aos 7, 14 e 21 dias, respectivamente e x = concentração de TDZ (mg.L⁻¹)

Figura 1: PMF (mg) de um clone de *E. urophylla* x *E. grandis* em meio de multiplicação de gemas aos 7, 14 e 21 dias

A variável PMS também apresentou valores crescentes até a concentração 0,1 mg.L⁻¹ de TDZ. Concentrações superiores foram inibitórias, pois decresceram os valores de PMS (Figura 2), assim como a qualidade das gemas (Figura 8).

$$y_1 = 26,973 + 19,278*x - 19,895*x^2 \quad (R^2 = 0,0145 \text{ ns})$$

$$y_2 = 42,372 + 168,319*x - 161,135*x^2 \quad (R^2 = 0,2127^*)$$

$$y_3 = 68,187 + 501,389*x - 476,093*x^2 \quad (R^2 = 0,4745^{**})$$

onde y_1 , y_2 e y_3 = PMS (mg) aos 7, 14 e 21 dias, respectivamente e x = concentração de TDZ (mg.L⁻¹)

Figura 2: PMS (mg) de um clone de *E. urophylla* x *E. grandis* em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias

Apesar das três maiores concentrações testadas (0,01; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹) não terem diferenciado significativamente entre si em relação às variáveis PMF e PMS (Tabela 4), a concentração 0,01 mg.L⁻¹ de TDZ apresentou gemas de melhor qualidade quanto à hiperhidria e comprimento, pois concentrações iguais ou superiores à 0,1 mg.L⁻¹ se caracterizaram pela formação de um grande número de gemas hiperhídricas, pela diminuição do comprimento de gemas e pela presença de calo nos explantes. A presença de calo também foi relatada por Le Roux & Van Staden (1991) ao cultivar várias espécies de *Eucalyptus* em meio de multiplicação suplementado com concentrações iguais ou superiores à 0,1 mg.L⁻¹ de TDZ.

Carvalho & Pinto (1993) também relataram a formação de brotos com tamanho reduzido e folhas pequenas, e ainda algumas delas apresentando-se queimadas e com aspecto de enrijecimento (hiperidricidade) para *Heliconia* spp., ao elevar a concentração de TDZ de 0,025 e 0,250 mg.L⁻¹ para 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹, respectivamente, no meio de cultivo.

Tabela 4. Valores médios de PMF (mg), PMS (mg) e C (cm) de um clone do híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

TDZ (mg.L ⁻¹)	7			Dia 14			21		
	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)
0	214,12B	21,93A	1,33A	326,35 C	35,52 C	1,48A	465,71 B	54,81 B	1,53A
0,001	256,55AB	27,58A	1,18AB	372,59BC	41,70BC	1,29AB	472,27 B	63,05 B	1,43A
0,01	310,90A	29,26A	1,10 B	494,44AB	52,66AB	1,25B	864,80A	94,43A	1,17B
0,1	295,37AB	27,46 A	1,12 B	533,35A	56,65A	0,92C	801,92A	111,29A	0,82C
1,0	294,65AB	25,46 A	1,09 B	505,92AB	49,57AB	0,78C	804,47A	93,50A	0,52D

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

Em relação à variável C, observa-se que houve um efeito inversamente proporcional em relação à aplicação de doses crescentes de TDZ, ou seja, à medida em que se aumentou a concentração de TDZ observou-se uma diminuição gradativa do comprimento médio das gemas (Figura 3 e Tabela 4).

Briggs et al. (1988) também relataram a formação de gemas curtas (< 1 cm) em azaléias cultivadas em meio com TDZ.

$$y_1 = 1,211 - 1,102 \cdot x + 0,988 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,1388^{**})$$

$$y_2 = 1,361 - 4,938 \cdot x + 4,352 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,7055^{**})$$

$$y_3 = 1,404 - 6,579 \cdot x + 5,690 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,8179^{**})$$

onde y_1 , y_2 e y_3 = C (cm) aos 7, 14 e 21 dias, respectivamente e x = concentração de TDZ (mg.L⁻¹)

Figura 3: C (cm) de um clone de *E. urophylla* x *E. grandis* em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias

A TCR (Tabela 5) indica que as maiores taxas de crescimento ocorreram nos 7 primeiros dias de avaliação para todas as concentrações de TDZ.

À medida em que aumentou-se a concentração de TDZ teve-se um aumento progressivo das médias de TCR até atingir um valor máximo (11,21 %) correspondente à concentração 0,1 mg.L⁻¹, para então diminuir. Isso indica a ocorrência de efeitos inibitórios do TDZ para concentrações superiores a 0,1 mg.L⁻¹. Le Roux & Van Staden (1991) também concluíram que concentrações de 0,1 e 0,2 mg.L⁻¹ foram altas demais para a multiplicação de gemas de *Eucalyptus saligna* Sm., *E. macarthurii* Deane et Maiden, *E. smithii* R.T. Baker e para o híbrido *E. macarthurii* x *E. grandis* Hill ex Maiden. Efeitos similares foram

também relatados por Sato et al. (1993), pois doses elevadas de TDZ também acarretaram efeitos inibitórios em mini gérbera.

Tabela 5. TCR (%) para PMS de um clone do híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

Período (dias)	TCR (%) para PMS				
	Concentração de TDZ (mg.L ⁻¹)				
	0	0,001	0,01	0,1	1,0
0 - 7	10,43	13,70	14,55	13,64	12,56
7 - 14	6,89	5,91	8,39	10,35	9,52
14 - 21	6,19	5,91	8,34	9,65	9,07
Média	7,84	8,51	10,43	11,21	10,38

4.1.2 Efeito da interação TDZ x AIA

A interação TDZ x AIA apresentou diferença significativa pelo teste F ($p < 0,05$) somente no 21º dia de cultivo mostrando assim, o efeito sinérgico entre os fatores TDZ e AIA em relação à variável comprimento médio de gemas (Apêndice 3).

As gemas de maior comprimento em meio com TDZ foram originadas na ausência de auxina (Figura 4). No entanto, não houve diferença significativa para comprimento médio de gemas na presença ou ausência de AIA, com exceção da concentração 0,01 mg.L⁻¹ de TDZ (Tabela 6). Portanto, não ficou claro se a adição do AIA no meio de cultura foi benéfica em relação ao comprimento de gemas.

$$y_1 = 1,445 - 7,137 \cdot x_1 + 6,268 \cdot (x_1)^2 \quad (R^2 = 0,8929^{**})$$

$$y_2 = 1,363 - 6,019 \cdot x_2 + 5,113 \cdot (x_2)^2 \quad (R^2 = 0,7688^{**})$$

onde y_1 e $y_2 = C$ (cm), x_1 e $x_2 =$ concentração 0 e 0,1 mg.L⁻¹ de AIA, respectivamente

Figura 4: C (cm) de um clone de *E. urophylla* x *E. grandis* para a interação TDZ x AIA em meio de multiplicação aos 21 dias

Tabela 6. Valores médios de C (cm) de um clone do híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* para a interação TDZ x AIA na fase de multiplicação de gemas aos 21 dias de cultivo

		TDZ (mg.L ⁻¹)				
		0	0,001	0,01	0,1	1,0
AIA (mg.L ⁻¹)	0	1,46Aa	1,48Aa	1,31Aa	0,80Ab	0,58Ac
	0,1	1,60Aa	1,38Ab	1,02Bc	0,84Ac	0,46Ad

letras maiúsculas para comparação na coluna (TDZ)

letras minúsculas para comparação na linha (AIA)

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

Para Orlikowska & Gabryszewska (1995), a adição de 0,1 mg.L⁻¹ de AIA em meio MS suplementado com 0,01 mg.L⁻¹ de TDZ decresceu ligeiramente o número de gemas saudáveis, e estimulou a hiperhidria em *Acer rubrun*.

4.1.3 Comparação qualitativa entre TDZ e BAP

Comparando-se o tratamento 11 (0,3 mg.L⁻¹ de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de AIA) com os melhores tratamentos com TDZ (5 e 6) observa-se que os valores médios de PMF, PMS e C foram bastante similares. (Figuras 5, 6 e 7).

Figura 5: Valores médios para PMF (mg) de um clone de *E. urophylla* x *E. grandis* em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias

Figura 6: Valores médios para PMS (mg) de um clone de *E. urophylla* x *E. grandis* em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias

Figura 7: Valores médios para C (cm) de um clone de *E. urophylla* x *E. grandis* em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias

Como não houve diferenças significativas entre os tratamentos 5 e 6 para as variáveis PMF e PMS, pode-se concluir que tanto o TDZ ($0,01 \text{ mg.L}^{-1}$) quanto

o BAP ($0,3 \text{ mg.L}^{-1}$) foram efetivos para a multiplicação de gemas, pois formaram gemas de qualidade similar (Figura 8).

Innecco et al. (1993) verificaram que a concentração de $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ não diferiu estatisticamente da concentração $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, mostrando assim o maior princípio ativo do TDZ (mais de 25 vezes) quando compararam o efeito do TDZ e do BAP em pimentão (*Capsicum annuum* L.).

Bonga & Pond (1991) também concluíram que para a multiplicação de gemas de *Larix decidua*, tanto o TDZ ($0,001$; $0,01$; $0,1$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$) quanto o BAP ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$) foram igualmente efetivos.

Figura 8: Gemas de um clone de *E. urophylla* x *E. grandis* em meio de cultura
Gonçalves (1980) modificado aos 21 dias de cultivo

4.2 Experimento 2: Efeito do TDZ e da interação TDZ x AIA na multiplicação de gemas do clone 1 de *E.grandis* x *E. urophylla*

4.2.1 Efeito do TDZ

A análise de variância do dados (Apêndices 5, 6 e 7) indica que houve diferenças altamente significativas pelo teste F ($p < 0,01$) a partir do 14º dia de cultivo para as três variáveis analisadas em relação ao fator TDZ.

Para o fator AIA, houve diferença estatística pelo teste F ($p < 0,05$) para a variável PMF e diferença altamente significativa para as variáveis PMS e C (Apêndices 5, 6 e 7) somente no 14º dia de cultivo.

A produção de matéria fresca cresceu linearmente à medida em que se aumentaram as concentrações de TDZ (Figura 9), enquanto que a produção de matéria seca mostrou uma resposta quadrática aos incrementos de TDZ (Figura 10). No entanto, a qualidade das gemas foi muito baixa nas duas maiores concentrações (0,1 e 1,0 mg.L⁻¹) devido à presença de um grande número de gemas hiperhídricas e presença de calo nos explantes (Figura 16). Isso está de acordo com os resultados obtidos por Briggs et al. (1988) que ao aumentarem a concentração de TDZ ($> 1,4 \mu\text{M}$) obtiveram um aumento na taxa de multiplicação de gemas de azaléia, mas também uma diminuição na qualidade das mesmas.

Sintomas de hiperhidria, redução no tamanho de brotos, folhas pequenas e queimadas e também com aspecto de enrijecimento foram obtidas por Carvalho & Pinto (1993) ao cultivar *Heliconia* spp. *in vitro*, em concentrações elevadas de TDZ (0,5 e 1,0 mg.L⁻¹).

A partir da segunda semana de cultivo, observou-se presença de calo avermelhado nos explantes em concentrações superiores à 0,01 mg.L⁻¹ de TDZ. Isso confirma os resultados obtidos por Gribaudo & Fronda (1991) que também relataram a formação de antocianina ao cultivar *Vitis vinifera* em meio suplementado com TDZ.

$$y_1 = 367,721 + 678,346 \cdot x - 573,228 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,1824^*)$$

$$y_2 = 547,569 + 2582,552 \cdot x - 2064,727 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,7023^{**})$$

$$y_3 = 808,227 + 471,316 \cdot x \quad (R^2 = 0,4673^{**})$$

onde y_1 , y_2 e y_3 = PMF (mg) aos 7, 14 e 21 dias, respectivamente e x = concentração de TDZ (mg.L⁻¹)

Figura 9: PMF (mg) do clone 1 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias

$$y_1 = 37,172 - 1,252 \cdot x \quad (R^2 = 0,0043 \text{ ns})$$

$$y_2 = 63,963 + 300,438 \cdot x - 269,142 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,4707^{**})$$

$$y_3 = 88,202 + 371,036 \cdot x - 325,273 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,6555^{**})$$

onde y_1 , y_2 e y_3 = PMS (mg) aos 7, 14 e 21 dias, respectivamente e x = concentração de TDZ (mg.L⁻¹)

Figura 10: PMS (mg) do clone 1 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias

Em relação a variável C, a concentração 0 mg.L⁻¹ apresentou a maiores médias a partir do 14º dia, se diferenciando das demais médias, mas não se diferenciando da concentração 0,001 mg.L⁻¹ (Tabela 7).

Tabela 7. Valores médios de PMF (mg), PMS (mg) e C (cm) do clone 1 do híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

TDZ (mg.L ⁻¹)	7			Dia 14			21		
	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)
0	326,27B	33,67A	0,80A	516,33 C	56,22 B	0,89A	899,23 B	81,23 B	1,25A
0,001	385,14AB	38,45A	0,83A	514,46 C	59,93 B	0,89A	837,86 B	92,53 B	1,11A
0,01	402,38AB	38,26A	0,79A	647,87BC	80,44A	0,73B	673,86 B	95,31 B	0,80B
0,1	426,57AB	38,31A	0,81A	777,36 B	89,8 A	0,72B	875,07 B	121,63A	0,65C
1,0	472,87A	35,78A	0,77A	1065,47A	95,27A	0,59C	1278,93A	133,97A	0,63C

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

A redução no comprimento de gemas multiplicadas em meio suplementado com TDZ evidenciadas na Tabela 7 e na Figura 11 também foi relatada para as espécies azaléia (Briggs et al., 1988; Preece & Imel, 1991), *Brassaia actinophylla* (Badzian et al., 1989), *Oxydendrum arboreum* (Banko & Stefani, 1989) e *Vitis vinifera* (Gribaudo & Fronda, 1991).

$$y_1 = 0,809 - 0,0002 \cdot x + 0,043 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,0591 \text{ ns})$$

$$y_2 = 0,851 - 2,949 \cdot x + 2,816 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,5448^{**})$$

$$y_3 = 1,106 - 5,220 \cdot x + 4,749 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,7263^{**})$$

onde y_1, y_2 e $y_3 = C$ (cm) aos 7, 14 e 21 dias, respectivamente e $x =$ concentração de TDZ (mg.L⁻¹)

Figura 11: C (cm) do clone 1 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias

A concentração de TDZ que proporcionou a maior média de TCR foi 1,0 mg.L⁻¹ (9,99 %). A menor média foi apresentada pela concentração 0 mg.L⁻¹ (7,26 %). Observa-se que houve uma relação diretamente proporcional entre concentração de TDZ e valores médios de TCR. À medida em que aumentou-se a concentração de TDZ teve-se um aumento no valor médio das TCR (Tabela 8).

Verifica-se também pela Tabela 8 que as TCR foram mantidas altas até o segundo período de crescimento (7-14 dias) para as três maiores concentrações. No terceiro período (14-21 dias) de crescimento houve uma diminuição bastante acentuada no crescimento dos explantes, principalmente para as duas maiores concentrações de TDZ testadas (0,1 e 1,0 mg.L⁻¹) (Tabela 8). Isso se deve

provavelmente a uma dificuldade no transporte de nutrientes nos explantes, proporcionada pelo grande crescimento destes durante os dois primeiros períodos de crescimento, ou ainda a um possível esgotamento dos nutrientes do meio de cultivo.

Tabela 8. TCR (%) para PMS do clone 1 do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

Período (dias)	TCR (%) para PMS				
	Concentração de TDZ (mg.L ⁻¹)				
	0	0,001	0,01	0,1	1,0
0 - 7	10,26	12,16	12,08	12,10	11,13
7 - 14	6,27	6,34	10,26	12,18	13,99
14 - 21	5,26	6,21	6,27	4,32	4,87
Média	7,26	8,24	8,37	9,53	9,99

4.2.2 Efeito da interação TDZ x AIA

Os níveis de significância (Apêndice 7) mostraram que apenas a variável C diferiu estatisticamente pelo teste F ($p < 0,01$) em relação à interação TDZ x AIA no 14º dia de cultivo.

Para as menores concentrações de TDZ utilizadas (0; 0,001 e 0,01 mg.L⁻¹), a ausência de AIA proporcionou médias significativamente maiores que a concentração 0,1 mg.L⁻¹ de AIA para a variável C (Tabela 9 e Figura 12). Para as duas maiores concentrações de TDZ (0,1 e 1,0 mg.L⁻¹), no entanto, não houve diferenças significativas entre as médias para essa mesma variável (Tabela 9).

Tabela 9. Valores médios de C (cm) do clone 1 do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* para a interação TDZ x AIA na fase de multiplicação de gemas aos 14 dias de cultivo

		TDZ (mg.L ⁻¹)				
		0	0,001	0,01	0,1	1,0
AIA (mg.L ⁻¹)	0	0,97Aa	0,95Aa	0,81Ab	0,59Ac	0,68Ac
	0,1	0,81Ba	0,83Ba	0,66Bbc	0,60Ac	0,76Aab

letras maiúsculas para comparação na coluna (TDZ)

letras minúsculas para comparação na linha (AIA)

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

$$y_1 = 0,925 - 3,819x_1 + 3,575(x_1)^2 \quad (R^2 = 0,8185^{**})$$

$$y_2 = 0,777 - 2,079x_2 + 2,058(x_2)^2 \quad (R^2 = 0,4399^{**})$$

onde y_1 e $y_2 = C$ (cm), x_1 e $x_2 =$ concentração 0 e 0,1 mg.L⁻¹ de AIA, respectivamente

Figura 12: C (cm) do clone 1 de *E. grandis* x *E. urophylla* para a interação TDZ x AIA em meio de multiplicação aos 14 dias de cultivo

Yang & Read (1991) verificaram que o AIA, assim como o ANA inibiram o alongamento de gemas em *Ligustrum vulgaris*.

Al-Juboory et al. (1991) observaram o efeito significativo da interação TDZ x ANA sobre o comprimento de gemas de *Hedera canariensis* cultivadas *in vitro*. As gemas mais alongadas foram obtidas na concentração 40 µM de ANA e a 0,1 µM ou 0,5 µM de TDZ.

4.2.3 Comparação qualitativa entre TDZ e BAP

O clone 1 mostrou resultados superiores quando o BAP foi adicionado ao meio de cultura, pois mesmo os melhores tratamentos com TDZ (5 e 6) (Figuras 13, 14 e 15) foram inferiores em qualidade de gemas quando comparados ao tratamento com BAP (Figura 16).

Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Compton & Gray (1993), que também concluíram que as concentrações 5 e 10 μM de BAP foram superiores à melhor concentração de TDZ utilizada (0,1 μM) quanto à porcentagem de explantes com gemas, número de gemas e qualidade de gemas de *Citrullus lanatus*, pois muitas das gemas cultivadas em TDZ foram anormais (compactas e atrofiadas) e/ou vitrificadas.

Figura 13: Valores médios para PMF (mg) do clone 1 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias

Figura 14: Valores médios para PMS (mg) do clone 1 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias

Figura 15: Valores médios para C (cm) do clone 1 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias

Figura 16: Gemas do clone 1 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de cultura Gonçalves (1980) modificado aos 21 dias de cultivo

O BAP também foi mais efetivo na multiplicação de *Phlox paniculata* quando comparado ao TDZ, pois induziu maior número de gemas por explante, e também menor quantidade de calo (Declerck & Korban, 1995).

4.3 Experimento 3: Efeito do TDZ e da interação TDZ x AIA na multiplicação de gemas do clone 2 de *E. grandis* x *E. urophylla*

4.3.1 Efeito do TDZ

A análise de variância pelo teste F indica que houve diferença altamente significativa ($p < 0,01$) em relação ao fator TDZ a partir do 14º dia de cultivo para as variáveis PMF e PMS e a partir do 7º dia para variável C. Em relação ao fator AIA, somente as variáveis PMF e PMS diferenciaram significativamente pelo teste F ($p < 0,01$) no 14º dia de avaliação (Apêndices 9, 10 e 11).

A produção de matéria fresca cresceu proporcionalmente à medida que se aumentou as concentrações de TDZ (Tabela 10 e Figura 17). Isso ocorreu provavelmente pela presença de grande número de gemas hiperhídricas e grande produção de biomassa, que caracterizam essas gemas (Pâques, 1991).

$$y_3 = 205,145 + 50,482 \cdot x \quad (R^2 = 0,1508^*)$$

$$y_2 = 316,229 + 1219,949 \cdot x - 1055,818 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,4353^{**})$$

$$y_1 = 503,914 + 4383,964 \cdot x - 3846,178 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,7441^{**})$$

onde y_1 , y_2 e y_3 = PMF (mg) aos 7, 14 e 21 dias, respectivamente e x = concentração de TDZ (mg.L⁻¹)

Figura 17: PMF (mg) do clone 2 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias

A produção de matéria seca cresceu até a concentração 0,1 mg.L⁻¹. Concentrações superiores foram inibitórias, pois houve um decréscimo a nível quantitativo (Figura 18) e qualitativo das gemas (Figura 25).

$$y_1 = 26,230 + 0,342 \cdot x \quad (R^2 = 0,0007 \text{ ns})$$

$$y_2 = 44,968 + 131,529 \cdot x - 124,797 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,1740^*)$$

$$y_3 = 69,720 + 627,542 \cdot x - 587,131 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,6605^{**})$$

onde y_1 , y_2 e y_3 = PMS (mg) aos 7, 14 e 21 dias, respectivamente e x = concentração de TDZ (mg.L^{-1})

Figura 18: PMS (mg) do clone 2 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias

Tabela 10. Valores médios de PMF (mg), PMS (mg) e C (cm) do clone 2 do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

TDZ (mg.L^{-1})	Dia 7			Dia 14			Dia 21		
	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)
0	214,57A	24,10A	1,08A	303,00 C	38,41 C	1,09A	422,47 C	55,92 C	1,34A
0,001	189,30A	26,58A	1,02AB	298,60 C	44,84BC	1,05A	511,90BC	67,99 C	1,10B
0,01	209,12A	27,34A	0,92BC	364,09BC	53,92AB	0,89B	634,78 B	94,05 B	0,97C
0,1	213,72A	26,34A	0,89C	423,94AB	56,03A	0,69C	894,19A	124,64A	0,78D
1,0	255,30A	26,55A	1,00ABC	480,39A	51,71AB	0,68C	1041,79A	110,15AB	0,71D

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

A variável C apresentou uma relação inversamente proporcional em relação ao fator TDZ (Tabela 10). A redução no comprimento de gemas foi mais pronunciado até a concentração $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$. A partir dessa concentração houve uma tendência de estabilização dos valores dessa variável (Figura 19).

A diminuição do comprimento de gemas associada à presença de TDZ no meio de multiplicação foi relatada por vários autores (Briggs et al., 1988; Badzian et al., 1989; Banko & Stefani, 1989; Gribaudo & Fronda, 1991; Preece & Imel, 1991).

$$y_1 = 1,017 - 1,465 \cdot x + 1,448 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,2472^{**})$$

$$y_2 = 1,026 - 3,804 \cdot x + 3,457 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,7555^{**})$$

$$y_3 = 1,159 - 4,309 \cdot x + 3,859 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,6758^{**})$$

onde y_1 , y_2 e y_3 = C (cm) aos 7, 14 e 21 dias, respectivamente e x = concentração de TDZ (mg.L^{-1})

Figura 19: C (cm) do clone 2 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias

As TCR apresentadas pela Tabela 11 evidenciam que para as duas maiores concentrações de TDZ elas foram crescentes em relação ao período de

(dias), ao contrário das demais TCR que se mostraram decrescentes em relação a esses mesmos períodos. Provavelmente isso se deve à presença de grande número de gemas hiperhídricas nas duas maiores concentrações de TDZ testadas (0,1 e 1,0 mg.L⁻¹), e portanto à grande produção de biomassa e hiperatividade que caracterizam essas gemas (Pâques, 1991).

Os valores médios das taxas de crescimento relativo (Tabela 11) foram crescentes até a concentração 0,1 mg.L⁻¹, onde atingiu o seu valor máximo (10,19 %). A partir daí houve uma diminuição da taxa de crescimento relativo, provavelmente ocasionada por limitações no transporte de nutrientes ou esgotamento do meio, ou ainda pela formação de substâncias inibitórias.

Tabela 11. TCR (%) médio para PMS do clone 2 do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

Período (dias)	TCR (%) para PMS				
	Concentração de TDZ (mg.L ⁻¹)				
	0	0,001	0,01	0,1	1,0
0 - 7	6,82	8,22	8,94	8,09	8,20
7 - 14	6,66	7,47	9,38	10,78	9,52
14 - 21	5,36	5,95	7,95	11,42	10,80
Média	6,28	7,21	8,76	10,09	9,51

4.3.2 Efeito da Interação TDZ x AIA

A interação TDZ x AIA apresentou diferenças altamente significativas pelo teste F ($p < 0,01$) somente para as variáveis PMF e PMS aos 14 dias de cultivo (Apêndices 9 e 10).

Para as menores concentrações de TDZ (0; 0,001 e 0,01 mg.L⁻¹), médias significativamente superiores de PMF e PMS foram apresentadas na presença de 0,1 mg.L⁻¹ de AIA. Para as concentrações maiores (0,1 e 1,0 mg.L⁻¹) as médias não diferiram estatisticamente para essas mesmas variáveis (Tabelas 12 e 13 e Figuras 20 e 21).

Tabela 12. Valores médios de PMF (mg) do clone 2 do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* para a interação TDZ x AIA na fase de multiplicação de gemas aos 14 dias de cultivo

		TDZ (mg.L ⁻¹)				
		0	0,001	0,01	0,1	1,0
AIA (mg.L ⁻¹)	0	220,92 Bb	252,48 Bb	299,28 Bb	454,34 Aa	511,60 Aa
	0,1	385,08 Aab	344,73 Ab	428,90 Aab	393,54 Aab	449,19 Aa

letras maiúsculas para comparação na coluna (TDZ)

letras minúsculas para comparação na linha (AIA)

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

$$y_1 = 248,169 + 229,382 \cdot x_1 - 2032,979 \cdot (x_1)^2 \quad (R^2 = 0,8285^{**})$$

$$y_2 = 386,181 + 63,488 \cdot x_2 \quad (R^2 = 0,0912 \text{ ns})$$

onde y_1 e y_2 = PMF (mg), x_1 e x_2 = concentração 0 e 0,1 mg.L⁻¹ de AIA, respectivamente

Figura 20: PMF (mg) do clone 2 de *E. grandis* x *E. urophylla* para a interação TDZ x AIA em meio de multiplicação aos 14 dias de cultivo

Tabela 13. Valores médios de PMS (mg) do clone 2 do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* para a interação TDZ x AIA na fase de multiplicação de gemas aos 14 dias de cultivo

		TDZ (mg.L ⁻¹)				
		0	0,001	0,01	0,1	1,0
AIA (mg.L ⁻¹)	0	29,83Bc	38,77Bbc	43,67Bb	58,44Aa	54,76Aa
	0,1	46,99Ab	50,92Ab	64,17Aa	53,63Ab	48,65Ab

letras maiúsculas para comparação na coluna (TDZ)

letras minúsculas para comparação na linha (AIA)

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

$$y_1 = 36,328 + 249,834 \cdot x_1 - 231,404 \cdot (x_1)^2 \quad (R^2 = 0,6364^{**})$$

$$y_2 = 54,046 - 5,286 \cdot x_2 \quad (R^2 = 0,0625 \text{ ns})$$

onde y_1 e y_2 = PMS (mg), x_1 e x_2 = concentração 0 e 0,1 mg.L⁻¹ de AIA, respectivamente

Figura 21: PMS (mg) do clone 2 de *E. grandis* x *E. urophylla* para a interação TDZ x AIA em meio de multiplicação aos 14 dias de cultivo

Esses resultados contrastam com aqueles obtidos por Cambecédes et al. (1991), que relataram que variações no balanço exógeno de citocinina/auxina tanto pelo aumento de TDZ e/ou pela supressão de AIA, não aumentaram significativamente a regeneração de gemas em *Lonicera nitida* Wils. cv. 'Maigrun'.

Para Obando et al. (1992) gemas de *Cyphomandra betacea* foram obtidas tanto na ausência quanto na presença de AIA (1,0 mg.L⁻¹) quando o TDZ foi utilizado nas concentrações 5,0 e 10,0 mg.L⁻¹. No entanto, a maior porcentagem de explantes com brotos (48%) foi obtida na ausência da auxina, e quando níveis

inferiores a $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ ou níveis superiores a $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA foram utilizados não houve resposta morfogenética.

Declerck & Korban (1995) concluíram que para *Phlox paniculata* L. cv. Franz Schubert, o AIA parece não ser essencial para organogênese, quando altas concentrações de BAP são adicionadas ao meio de cultura. No entanto, quando a concentração de BAP foi baixada, efeitos significativos da interação BAP x AIA foram obtidos.

4.3.3 Comparação qualitativa entre TDZ e BAP

Comparando-se os tratamentos contendo TDZ com o tratamento contendo BAP observa-se que as duas maiores concentrações de TDZ usadas apresentaram valores médios superiores de PMF e PMS (Figuras 22 e 23). Apesar disso, as gemas de melhor qualidade quanto à hiperhidria (Figura 25) e comprimento (Figura 24) foram originadas em meio suplementado com BAP.

Carvalho & Pinto (1993) também verificaram que concentrações altas de TDZ (0,5 e 1,0 mg.L⁻¹) induziram a formação de brotos com tamanho reduzido e com aspecto de enrijecimento (hiperhidria), enquanto que o BAP produziu brotações mais alongadas e aparentemente mais vigorosas.

Declerck & Korban (1995) também concluíram que o TDZ originou gemas de menor comprimento quando comparadas àquelas originadas em meio contendo BAP.

O BAP também apresentou superioridade quanto à qualidade de gemas quando comparado com os os melhores tratamentos de TDZ (5 e 6) (Figura 25).

Figura 22: Valores médios para PMF (mg) do clone 2 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias

Figura 23: Valores médios para PMS (mg) do clone 2 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias

Figura 24: Valores médios para C (cm) do clone 2 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de multiplicação suplementado com TDZ ou BAP aos 7, 14 e 21 dias

Figura 25: Gemas do clone 2 de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio de cultura Gonçalves (1980) modificado aos 21 dias de cultivo

4.4 Experimento 4: Efeito do TDZ na multiplicação de gemas de um clone de *E. grandis* x *E. tereticornis*

A análises de variância dos dados (Apêndices 13, 14 e 15) indicam que ocorreram diferenças significativas pelo teste F a partir do 14º dia de cultivo para as três variáveis analisadas em relação ao fator TDZ. Essas diferenças foram altamente significativas ($p < 0,01$) para as variáveis PMF e C.

A análise de variância pelo teste F para a variável PMS foi altamente significativa ($p < 0,01$) aos 14 dias de avaliação, e significativa ($p < 0,05$) aos 21 dias (Apêndice 14).

As três variáveis mostraram uma resposta quadrática em relação ao TDZ (Figuras 26, 27 e 28).

A produção de matéria fresca e produção de matéria seca apresentaram valores crescentes até a concentração $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figuras 26 e 27). No entanto, as concentrações 0,01, 0,1 e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ não diferenciaram entre si em nenhum dos períodos avaliados (Tabela 14).

A partir da concentração $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ houve uma tendência de queda das variáveis PMF e PMS (Figuras 26 e 27).

$$y_1 = 193,529 + 229,002 \cdot x - 194,409 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,1049 \text{ ns})$$

$$y_2 = 263,762 + 1360,445 \cdot x - 1231,919 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,4614^{**})$$

$$y_3 = 352,827 + 4646,085 \cdot x - 4240,307 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,6758^{**})$$

onde y_1 , y_2 e y_3 = PMF (mg) aos 7, 14 e 21 dias, respectivamente e x = concentração de TDZ (mg.L⁻¹)

Figura 26: PMF (mg) de um clone de *E. grandis* x *E. tereticornis* em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias

$$y_1 = 26,281 + 1,204 \cdot x \quad (R^2 = 0,0122 \text{ ns})$$

$$y_2 = 38,535 + 59,254 \cdot x - 55,856 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,0624 \text{ ns})$$

$$y_3 = 53,181 + 410,522 \cdot x - 386,978 \cdot x^2 \quad (R^2 = 0,4252^{**})$$

onde y_1 , y_2 e y_3 = PMS (mg) aos 7, 14 e 21 dias, respectivamente e x = concentração de TDZ (mg.L⁻¹)

Figura 27: PMS (mg) de um clone de *E. grandis* x *E. tereticornis* em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias

Tabela 14. Valores médios de PMF (mg) , PMS (mg) e C (cm) de um clone do híbrido de *E. grandis* x *E. tereticornis* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

TDZ (mg.L ⁻¹)	7			Dia 14			21		
	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)
0	168,11A	22,04A	0,98A	223,87 B	33,19 B	1,00A	222,60 C	32,83 C	0,99A
0,001	181,01A	26,09A	0,94A	246,54 B	34,16AB	0,89AB	364,05BC	52,51BC	0,92AB
0,01	238,49A	30,31A	0,88A	342,64AB	50,04A	0,86B	537,49AB	81,29A	0,83B
0,1	209,93A	26,92A	0,89A	380,50A	42,75AB	0,83B	757,69A	87,73A	0,66C
1,0	228,16A	27,39A	0,89A	392,35A	41,94AB	0,82B	738,74A	76,75AB	0,58C

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

As gemas cultivadas nos meios com concentrações 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ se caracterizaram pela presença de calo, hiperhidria e menor comprimento (Figura 29). A presença de calo também foi relatada por Gribaudo & Fronda (1991) ao cultivar *Vitis vinifera* em meio suplementado com TDZ, e também por Le Roux & Van Staden (1991) para *E. saligna*, *E. smithii*, *E. macarthurii* e para o híbrido *E. macarthurii* x *E. grandis* cultivados em meio contendo 0,1 e 0,2 mg.L⁻¹ de TDZ.

As médias para a variável C diminuíram proporcionalmente ao aumento da concentração de TDZ (Tabela 14 e Figura 28), sendo que a maior média ocorreu para a concentração 0 mg.L⁻¹ de TDZ que não diferiu da concentração 0,001 mg.L⁻¹ de TDZ em nenhum dos períodos avaliados (Tabela 14).

Essa diminuição no tamanho das gemas obtidas nos meios suplementados com TDZ está de acordo com os resultados obtidos para azaléia por Briggs et al.

(1988) e por Preece & Imel, (1991), para *Vitis vinifera* por Gribaudo & Fronda (1991), para *Heliconia* spp. por Carvalho & Pinto (1993).

$$y_1 = 0,935 - 0,594x + 0,552x^2 \quad (R^2 = 0,0650 \text{ ns})$$

$$y_2 = 0,925 - 1,094x + 0,994x^2 \quad (R^2 = 0,3491^*)$$

$$y_3 = 0,924 - 3,019x + 2,671x^2 \quad (R^2 = 0,8036^{**})$$

onde y_1 , y_2 e y_3 = C (cm) aos 7, 14 e 21 dias, respectivamente e x = concentração de TDZ (mg.L⁻¹)

Figura 28: C (cm) de um clone de *E. grandis* x *E. tereticornis* em meio de multiplicação aos 7, 14 e 21 dias

Os valores médios da taxa de crescimento relativo (Tabela 15) foram crescentes até atingir o seu valor máximo (7,69 %), que correspondeu à concentração 0,1 mg.L⁻¹. A partir dessa concentração o valor médio da TCR diminuiu. Isso pode indicar o efeito inibitório do TDZ em concentrações superiores a 0,1 mg.L⁻¹.

As altas taxas de crescimento relativo no terceiro período de crescimento (14-21 dias) para as duas maiores concentrações (0,1 e 1,0 mg.L⁻¹) se devem, provavelmente, às altas taxas de hiperhidria presentes nessas duas concentrações. O grande número de gemas e a alta produção de biomassa, que são características

típicas de plantas hiperhídricas (Pâques, 1991) podem justificar esses altos valores de TCR.

Tabela 15. TCR (%) médio para PMS de um clone do híbrido de *E. grandis* x *E. tereticornis* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

Período (dias)	TCR (%) para PMS				
	Concentração de TDZ (mg.L ⁻¹)				
	0	0,001	0,01	0,1	1,0
0 - 7	3,33	5,75	7,89	6,19	6,44
7 - 14	5,85	3,85	7,16	6,61	6,09
14 - 21	-0,16	6,14	6,93	10,27	8,63
Média	3,01	5,25	7,33	7,69	7,05

Figura 29: Gemas de um clone de *E. grandis* x *E. tereticornis* em meio de cultura
Gonçalves (1980) modificado aos 21 dias de cultivo

5 CONCLUSÕES

- A concentração mais adequada para a multiplicação de gemas foi $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ para todos os clones testados.
- As concentrações $0,1$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de TDZ apresentaram efeito inibitório para a multiplicação adequada quanto à qualidade de gemas em todos os clones testados, uma vez que estas se caracterizaram pela presença de calo, hiperhidria, folhas quebradiças e com coloração verde claro, pecíolo com espessamento e coloração avermelhada.
- O TDZ proporcionou reduções significativas no comprimento de gemas nas concentrações $0,01$; $0,1$ e $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ para o híbridos *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis* e para o clone 1 do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.
- O híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* apresentou maior taxa de crescimento em todas as concentrações de TDZ, quando comparado aos demais híbridos.
- O híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis* apresentou menor taxa de crescimento em todas as concentrações de TDZ, quando comparado aos demais híbridos.

- A multiplicação de gemas dos dois clones do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* foi mais efetiva em meio de multiplicação suplementado com BAP, em relação ao meio suplementado com TDZ.
- A interação TDZ x AIA foi significativa para as variáveis Comprimento médio de gemas (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* e clone 1 de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*), Produção de matéria fresca e Produção de matéria seca para o clone 2 de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-JUBOORY, K. H.; WILLIAMS, D. J.; SKIRVIN, R. M. Growth regulators influence root and shoot development of micropropagated Algerian ivy. **HortScience**, v.26, n.8, p.1079-1080, Aug. 1991.
- BADZIAN, T.; FOTYMA-KERN, J.; HENNEN, G. R.; OGLESBY, P. The influence of 6-benzyladenine and thidiazuron on organogenesis of *Brassaia actinophylla* Endl. cv. Amate shoot explants. **Acta Horticulturae**, n.251, p.191-197, Sept. 1989.
- BANKO, T. J.; STEFANI, M. A. *In vitro* propagation of *Oxydendrum arboreum* from mature trees. **HortScience**, v.24, n.4, p.683-685, Aug. 1989.
- BONGA, J. M.; POND, S. E. Adventitious shoot formation in cultures of 30-year old *Larix decidua*, *L. leptolepis*, *L. eurolepis* and *L. laricina* trees. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.26, n.1, p.45-51, July. 1991.
- BRIGGS, B. A.; McCULLOCH, S. M.; EDICK, L. A. Micropropagation of azaleas using thidiazuron. **Acta Horticulturae**, n.227, p.330-333, July. 1988.

- CAMBECÉDES, J.; DURON, M.; DECOURTYE, L. Adventitious bud regeneration from leaf explants of shrubby ornamental honeysuckle, *Lonicera nítida* Wils. cv. 'Maigrun': effects of thidiazuron and 2,3,5-triiodobenzoic acid. **Plant Cell Reports**, v.10, n.9, p.471-474, Nov. 1991.
- CAPELLE, S. C.; MOK, D. W. S.; KIRCHNER, S. C.; MOK, M. C. Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N⁶(Δ^2 -Isopentenyl) [8-¹⁴C]Adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. **Plant Physiology**, v.73, n.3, p.796-802, June. 1983.
- CARVALHO, D. G.; PINTO, J. E. B. P. Multiplicação de *Heliconia* spp. *in vitro* através do uso do TDZ. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, Brasília, 1993. **Resumos**. Brasília: REDBIO, 1993. p.152.
- CHALUPA, V. *In vitro* propagation of *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Quercus*, *Fagus* and other species using adenine type cytokinins and thidiazuron. **Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae**, v.14, p.65-90, 1985. / Resumo em **CAB Abstracts on CD-Rom**, v.3A, 1990 - 91 /.
- CHATFIELD, J. M.; ARMSTRONG, D. J. Regulation of cytokinin oxidase activity in callus tissues of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Great Northern. **Plant Physiology**, v.80, n.2, p.493-499, Feb.1986.

- CHÉE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Selective enhancement of *Ipomonea batatas* Poir. embryogenic and non embryogenic callus growth and production of embryos on liquid cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.15, p.149-159, 1988.
- COMPTON, M. E.; GRAY, D. J. Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, and tetraploid watermelon. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.118, n.1, p.151-157, Jan. 1993.
- CORREIA, D. Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp. em meio de cultura líquido e sólido. Piracicaba, 1993. 113p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- CRUZ, L. S. P.; LEIDERMAN, L.; GROSSI, J. M. M. Efeitos de dois novos desfolhantes para algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **O Biológico**, v.43, n. 9/10, p.179-86, 1977.
- DECLERCK, V.; KORBAN, S. S. Shoot regeneration from leaf tissues of *Phlox paniculata* L. **Journal of Plant Physiology**, v. 147, n.3-4, p.441-446, Dec.1995.
- DOLCET-SANJUAN, R.; MOK, D. W. S.; MOK, M. C. Plantlet regeneration from cultured leaves of *Cydonia oblonga* L. (quince). **Plant Cell Reports**, v.10, n.5, p.240-242, Aug. 1991.

- FIGUEIRA, A.; WHIPKEY, A.; JANICK, J. Increased CO₂ and light promote *in vitro* shoot growth and development of *Theobroma cacao*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.116, n.3, p.585-589, 1991.
- GILL, R.; SAXENA, P. K. Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L.: induction by thidiazuron of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. **Plant Cell Reports**, v.12, n.3, p.154-159, Mar. 1993.
- GONÇALVES, A. N. Reversion to juvenility and cloning of *Eucalyptus urophylla* s. T. Blake in cell and tissue culture systems. In: SIMPÓSIO IUFRO EM MELHORAMENTO GENÉTICO E PRODUTIVIDADE DE ESPÉCIES FLORESTAIS DE RÁPIDO CRESCIMENTO, Águas de São Pedro, Agosto. 1980.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.C. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1990. p.99-169.
- GRIBAUDO, I.; FRONDA, A. Effects of thidiazuron on Grapevine axillary buds cultivated *in vitro*. **HortScience**, v.26, n.8, p.1083, Aug. 1991.
- HANDRO, W.; FLOH, E. I. S. In: Aspectos básicos do controle de morfogênese *in vitro*. TORRES, A.C.; CALDAS, L.C. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1990. p.203-211.

- HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.33, n.2, p.105-119, May 1993.
- HUNT, R. Concepts in plant growth analysis. In: **Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis**. London: Edward Arnold, 1982. p.14-46.
- HUTCHINSON, M. J.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Morphoregulatory role of thidiazuron: Evidence of the involvement of endogenous auxin in thidiazuron induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bayley). **Journal of Plant Physiology**, v. 149, n.5, p.573-579, 1996.
- INNECCO, R.; PINTO, J. E. B. P.; DECHAMPS, C. Efeito comparativo do "TDZ e BAP" na regeneração de brotações e calos em pimentão (*Capsicum annuum* L.) **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 1, p. 100, Jun. 1993.
- KIM, M. K.; SOMMER, H. E.; BONGARTEN, B. C.; MERKLE, S. A. High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron. **Plant Cell Reports**, v.16, n.8, p.536-540, May 1997.
- LALOUE, M.; FOX, J. E. Cytokinin oxidase from wheat. **Plant Physiology**, v.90, n.3, p.899-906, 1989.

- LE ROUX, J. J.; VAN STADEN, J. Micropropagation of *Eucalyptus* species. **HortScience**, v.26, n.2, p.199-200, Feb. 1991.
- LU, C. Y. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cell Development Biology**, v.29, n.2, p.92-96, Apr. 1993.
- MANTE, S.; SCORZA, R.; CORDTS, J. M. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica* and *Prunus cerasus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.19, p.10-11, 1989.
- MENEGUCCI, J. L. P.; PINTO, J. E. B. P.; SILVA, C. R. R. Avaliação de um novo regulador de crescimento na micropropagação de cultivares de bananeira (*Musa* sp.) In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL, Brasília, 1993. **Anais**. Brasília: REDBIO, 1993. p.149.
- MOK, M. C.; MOK, D. W. S.; ARMSTRONG, D. J.; SHUDO, K.; ISOGAI, Y.; OKAMOTO, T. Cytokinin activity of N-phenyl- N'-1,2,3-thiadiazol-5-yurea (thidiazuron). **Phytochemistry**, v.21, n.7, p.1509-1511, July. 1982.
- MOK, M. C.; MOK, D. W. S. The metabolism of [^{14}C] - Thidiazuron in callus tissues of *Phaseolus lunatus*. **Physiologia Plantarum**, v.65, n.4, p.427-432, Dec. 1985.

- MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron- induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator leveus and significance of cotyledons. **Physiologia Plantarum**, v.94, n.2, p.268-276, Feb. 1995.
- OBANDO, M.; GOREUX, A.; JORDAN, M. Regeneración *in vitro* de *Cyphomandra betacea* (Tamarillo), una especie frutal andina. **Ciencia e Investigación agraria**, v.19, n.3, p.125-130, Set. 1992.
- ORLIKOWSKA, T.; GABRYSZEWSKA, E. *In vitro* propagation of *Acer rubrum* cv. Red Sunset. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v.3, n.4, p.195 - 204, 1995 / Resumo em **CAB Abstratcs on CD-Rom**, v.5, Jan.1996 - Abr.1997 /.
- PÂQUES, M. Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects. **Acta Horticulturae**, n.289, p.283-290, Apr. 1991.
- PREECE, J. E.; IMEL, M. R. Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* 'P.J.M.hybrids'. **Scientia Horticulturae**, v.48, n.1-2, p.159-170, 1991.
- PREECE, J. E.; HUETTEMAN, C. A.; ASHBY, W. C.; ROTH, P. L. Micro-and cutting propagation of Silver Maple. I. Results with adult and juvenile propagules. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.116, n.1, p.142-148, 1991.

- SANKHLA, D.; DAVIS, T. D.; SANKHLA, N. Thidiazuron-induced *in vitro* shoot formation from roots of intact seedlings of *Albizzia julibrissin*. **Plant Growth Regulation**, v.14, n.3, p.267-272, May 1994.
- SATO, A. Y.; PINTO, J. E. B.P.; MODESTO, H. S. Avaliação de um novo regulador de crescimento na indução de brotações *in vitro* de mini-gérbera. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.5, n.1, p.99, Jun. 1993.
- SAXENA, P. K.; MALIK, K. A.; GILL, R. Induction by thidiazuron of somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut. **Planta**, v.187, n.3, p.421-424, June. 1992.
- SCHULTHEIS, J. R.; CHÉE, R. P.; CANTLIFFE, D. J. Embriões somáticos e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.C. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1990. p.227 - 249.
- SUTTLE, J. C. Involvement of ethylene in the action of the cotton defoliant thidiazuron. **Plant Physiology**, v.78, n.2, p.272-76, June. 1985.
- THEILER-HEDTRICH, C.; THEILER-HEDTRICH, R. Influence of TDZ and BA on adventitious shoot regeneration from apple leaves. **Acta Horticulturae**, n.280, p.195-199, Sept. 1990.
- THOMAS, J. C.; KATTERMAN, F. R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiology**, v.81, n.2, p.681-683, 1986.

- TIBOK, A.; BLACKHALL, N. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. **Plant Science**, v.110, n.1, p.139-145, Oct. 1995.
- VAN NIEUWKERK, J. P.; ZIMMERMAN, R. H.; FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. **HortScience**, v.21, n.3, p.516-518, June. 1986.
- VISSER, C.; QURESHI, J. A.; GILL, R.; SAXENA, P. K. Morphoregulatory role of thidiazuron. Substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in *Geranium* hypocotyl cultures. **Plant Physiology**, v.99, n.4, p.1704-1707, Aug.1992.
- WANG, S. Y.; STEFFENS, G. L.; FAUST, M. Breaking bud dormancy in apple with a plant bioregulator, Thidiazuron. **Phytochemistry**, v.25, n.2, p.311-317, Feb. 1986.
- YANG, G.; READ, P. E. Influence of plant growth regulators and season on growth responses of forced woody stems. **Acta Horticulturae**, n.300, p.173-177, Jan. 1991.
- ZHOU, J.; MA, H.; GUO, F.; LUO, X. Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.36, n.1, p.73-79, Jan. 1994.

APÊNDICES

Apêndice 1. Resumo da análise de variância para PMF (mg) de um clone do híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		7	14 (dias)	21
TDZ	4	12262,3163 ns	66543,2642 **	307127,3820 **
AIA	1	334,3731 ns	1638,7200 ns	187874,9960 **
TDZxAIA	4	2873,6830 ns	13148,4868 ns	10424,5360 ns
Frasco	3	15061,5434 *	19668,5493 ns	6691,6040 ns
Resíduo	27	4063,2027	8873,8507	21724,5680
F		2,18 *	3,56 **	5,67 **
CV (%)		23,24	21,09	21,62
Média (mg)		274,33	446,53	681,84

(ns) não significativo pelo teste F

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

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

Apêndice 2. Resumo da análise de variância para PMS (mg) de um clone do híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		7	14 (dias)	21
TDZ	4	63,0231 ns	582,9925 **	4465,6603 **
AIA	1	38,0250 ns	60,2703 ns	2502,7240 **
TDZxAIA	4	32,8776 ns	216,3242 ns	111,8895 ns
Frasco	3	111,4787 *	202,9729 ns	238,7687 ns
Resíduo	27	34,4050	91,5819	179,4736
F		1,83 ns	3,52 **	10,00 **
CV (%)		22,27	20,27	16,06
Média (mg)		26,34	47,22	83,42

(ns) não significativo pelo teste F

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

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

Apêndice 3. Resumo da análise de variância para C(cm) de um clone de híbrido do *E. urophylla* x *E. grandis* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		7	14 (dias)	21
TDZ	4	0,07512 **	0,66728 **	1,42885 **
AIA	1	0,00351 ns	0,01702 ns	0,04389 ns
TDZx AIA	4	0,00644 ns	0,03952 ns	0,05463 *
Frasco	3	0,00802 ns	0,03531 ns	0,03589 ns
Resíduo	27	0,01446	0,02133	0,01629
F		2,04 ns	11,52 **	36,38 **
CV (%)		10,32	12,77	11,69
Média (cm)		1,17	1,14	1,09

(ns) não significativo pelo teste F

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

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

Apêndice 4. Valores médios de PMF (mg), PMS (mg) e C (cm) de um clone do híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

AIA (mg.L ⁻¹)	7			Dia 14			21		
	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)
0	271,43A	25,36A	1,16A	440,13A	45,99A	1,16A	613,30B	75,51B	1,13A
0,1	277,22A	27,31A	1,18A	452,93A	48,45A	1,12A	750,37A	91,33A	1,06A

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

Apêndice 5. Resumo da análise de variância para PMF (mg) do clone 1 do híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		7	14 (dias)	21
TDZ	4	23284,626 ns	420669,667 **	396747,976 **
AIA	1	3712,365 ns	94274,390 *	68190,435 ns
TDZxAIA	4	10520,796 ns	15311,003 ns	32115,998 ns
Frasco	3	5308,315 ns	13826,340 ns	5581,764 ns
Resíduo	27	8645,298	15792,116	40810,314
F		1,49 ns	9,92 **	3,68 **
CV (%)		23,09	17,84	22,13
Média (mg)		402,65	704,29	912,95

(ns) não significativo pelo teste F

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

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

Apêndice 6. Resumo da análise de variância para PMS (mg) do clone 1 do híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		7	14 (dias)	21
TDZ	4	35,9139 ns	2465,4567 **	3860,3697 **
AIA	1	68,5131 ns	1567,8170 **	1211,9258 *
TDZxAIA	4	42,2458 ns	98,0998 ns	44,8063 ns
Frasco	3	28,6631 ns	75,4908 ns	64,3115 ns
Resíduo	27	64,8660	164,1533	207,4826
F		0,60 ns	6,12 **	6,84 **
CV (%)		21,83	16,78	17,73
Média (mg)		36,89	76,35	104,93

(ns) não significativo pelo teste F

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

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

Apêndice 7. Resumo da análise de variância para C (cm) do clone 1 do híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		7	14 (dias)	21
TDZ	4	0,00383 ns	0,12380 **	0,5944 **
AIA	1	0,00006 ns	0,04556 **	0,0098 ns
TDZxAIA	4	0,00092 ns	0,02185 **	0,0178 ns
Frasco	3	0,01129 ns	0,00692 ns	0,0053 ns
Resíduo	27	0,00545	0,00405	0,0099
F		0,81 ns	13,58 **	20,63 **
CV (%)		9,22	8,31	11,03
Média (cm)		0,80	0,77	0,91

(ns) não significativo pelo teste F

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

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

Apêndice 8. Valores médios de PMF (mg), PMS (mg) e C (cm) do clone 1 do híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

AIA (mg.L ⁻¹)	7			Dia 14			21		
	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)
0	393,01A	35,59A	0,80A	655,75B	70,09B	0,79A	871,67A	99,43B	0,89A
0,1	412,28A	38,20A	0,79A	752,75A	82,61A	0,73B	954,24A	110,44A	0,92A

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

Apêndice 9. Resumo da análise de variância para PMF (mg) do clone 2 do híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		7	14 (dias)	21
TDZ	4	4662,515 ns	49275,285 **	54236, 943 **
AIA	1	55,873 ns	27630,792 **	7884,864 ns
TDZxAIA	4	350,344 ns	23018,340 **	14738,598 ns
Frasco	3	1071,069 ns	3091,883 ns	17926,773 ns
Resíduo	27	2965,090	3451,766	17442,903
F		0,65 ns	7,87 **	10,94 **
CV (%)		25,16	15,70	18,83
Média (mg)		216,40	374,01	701,03

(ns) não significativo pelo teste F

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

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

Apêndice 10. Resumo da análise de variância para PMS (mg) do clone 2 do híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		7	14 (dias)	21
TDZ	4	15,459 ns	421,001 **	6533,622 **
AIA	1	9,950 ns	605,089 **	491,226 ns
TDZxAIA	4	3,678 ns	310,171 **	250,998 ns
Frasco	3	9,413 ns	45,613 ns	68,873 ns
Resíduo	27	31,850	48,436	197,607
F		0,30 ns	6,31 **	11,74 **
CV (%)		21,45	14,20	15,52
Média (mg)		26,31	48,98	90,55

(ns) não significativo pelo teste F

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

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

Apêndice 11. Resumo da análise de variância para C (cm) do clone 2 do híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		7	14 (dias)	21
TDZ	4	0,04834 **	0,29775 **	0,51817 **
AIA	1	0,00225 ns	0,01406 ns	0,00689 ns
TDZxAIA	4	0,00854 ns	0,01141 ns	0,00552 ns
Frasco	3	0,01023 ns	0,00144 ns	0,01718 ns
Resíduo	27	0,00533	0,00599	0,00803
F		4,07 **	17,74 **	22,35 **
CV (%)		7,42	8,81	9,12
Média (cm)		0,98	0,88	0,98

(ns) não significativo pelo teste F

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

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

Apêndice 12. Valores médios de PMF (mg), PMS (mg) e C (cm) do clone 2 do híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

AIA (mgL ⁻¹)	7			Dia 14			21		
	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)
0	215,22A	26,81A	0,98A	347,72B	45,09B	0,89A	686,99A	87,04A	0,99A
0,1	217,58A	25,81A	0,99A	400,29A	52,87A	0,86A	715,06A	94,05A	0,96A

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

Apêndice 13. Resumo da análise de variância para PMF (mg) de um clone do híbrido de *E. grandis* x *E. tereticornis* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		7	14 (dias)	21
TDZ	4	3618,984 ns	24004,505 **	217332,704 **
Frasco	3	1468,114 ns	5263,771 ns	12184,038 ns
Resíduo	12	1500,581	3501,867	13695,723
F		1,80 ns	4,56 **	9,45 **
CV (%)		18,88	18,66	22,32
Média (mg)		205,14	317,18	524,12

(ns) não significativo pelo teste F

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

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

Apêndice 14. Resumo da análise de variância para PMS (mg) de um clone do híbrido de *E. grandis* x *E. tereticornis* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias.

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		7	14 (dias)	21
TDZ	4	35,534 ns	191,833 *	2103,954 **
Frasco	3	14,083 ns	34,118 ns	34,359 ns
Resíduo	12	14,896	50,319	154,961
F		1,77 ns	2,47 *	7,85 **
CV (%)		14,54	17,55	18,79
Média (mg)		26,55	40,42	66,22

(ns) não significativo pelo teste F

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

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

Apêndice 15. Resumo da análise de variância para C (cm) de um clone do híbrido de *E. grandis* x *E. tereticornis* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

Fonte de Variação	GL	Quadrados médios		
		7	14 (dias)	21
TDZ	4	0,00770 ns	0,02027 **	0,12089 **
Frasco	3	0,01225 ns	0,01875 ns	0,00721 ns
Resíduo	12	0,00856	0,00330	0,00437
F		1,26 ns	3,74 *	16,52 **
CV (%)		9,55	6,51	8,34
Média (cm)		0,92	0,88	0,79

(ns) não significativo pelo teste F

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

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

Apêndice 16. Valores médios de PMF (mg), PMS (mg) e C (cm) de um clone do híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

TRATAMENTO	7			Dia 14			21		
	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)
1	214,27	21,02	1,35	286,09	30,00	1,58	357,59	44,19	1,46
2	214,03	22,84	1,31	366,61	41,04	1,39	573,83	65,44	1,60
3	237,46	26,02	1,18	337,81	38,03	1,38	434,59	59,39	1,48
4	275,64	29,15	1,19	407,36	45,38	1,21	509,96	66,70	1,38
5	289,54	26,64	1,13	487,88	47,49	1,21	838,96	90,39	1,31
6	332,26	31,87	1,09	501,00	57,83	1,28	890,65	98,46	1,02
7	295,61	25,21	1,08	594,73	63,13	0,94	728,55	100,07	0,80
8	295,14	29,70	1,17	471,98	50,18	0,90	875,29	122,51	0,84
9	320,30	27,92	1,07	494,14	51,31	0,71	706,82	83,48	0,58
10	269,01	23,00	1,13	517,71	47,82	0,84	902,13	103,53	0,46
11	299,06	27,76	1,18	478,86	46,79	1,39	844,68	92,04	1,26

Apêndice 17. Valores médios de PMF (mg), PMS (mg) e C (cm) do clone 1 do híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

TRATAMENTO	7			Dia 14			21		
	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)
1	347,84	33,03	0,81	468,08	48,78	0,97	783,36	75,39	1,21
2	304,71	34,30	0,79	564,59	63,69	0,81	1014,73	87,07	1,29
3	411,48	39,58	0,83	460,91	50,87	0,95	839,94	87,07	1,11
4	358,81	37,32	0,82	568,01	68,98	0,83	835,78	100,44	1,11
5	342,15	34,19	0,79	642,87	80,11	0,81	677,46	88,96	0,94
6	462,61	42,33	0,79	652,86	80,78	0,66	670,27	101,67	0,83
7	396,47	34,93	0,79	759,29	83,82	0,59	884,00	120,08	0,62
8	456,66	41,69	0,83	795,43	95,94	0,60	866,14	123,18	0,68
9	467,13	36,19	0,76	947,60	86,86	0,68	1173,57	128,11	0,57
10	478,61	35,37	0,77	1183,33	103,69	0,76	1384,30	139,83	0,70
11	509,49	38,13	0,72	699,96	64,98	0,83	937,43	89,68	0,82

Apêndice 18. Valores médios de PMF (mg), PMS (mg) e C (cm) do clone 2 do híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas avaliadas a cada 7 dias durante 21 dias

TRATAMENTO	7			Dia 14			21		
	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)	PMF (mg)	PMS (mg)	C (cm)
1	205,51	24,23	1,05	220,92	29,83	1,08	400,53	54,56	1,35
2	223,63	23,98	1,12	385,08	46,99	1,10	444,40	57,28	1,34
3	196,24	26,35	1,04	252,48	38,92	1,09	534,65	63,71	1,11
4	182,35	26,81	1,00	344,73	50,92	1,01	489,16	72,27	1,10
5	207,18	29,41	0,93	299,28	43,67	0,96	549,59	81,22	1,01
6	211,07	26,52	0,91	428,90	64,17	0,81	719,96	106,88	0,93
7	217,61	25,56	0,84	454,34	58,44	0,68	901,01	124,18	0,76
8	209,83	26,13	0,94	393,54	53,63	0,70	887,38	125,10	0,81
9	249,56	27,49	1,02	511,60	54,76	0,68	1049,14	111,56	0,74
10	261,04	25,61	0,98	449,19	48,65	0,68	1034,43	108,74	0,68
11	184,91	19,74	0,91	526,95	59,12	1,01	620,98	71,81	1,02