**EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE
AMÔNIO NA MULTIPLICAÇÃO E NO ENRAIZAMENTO
"in vitro" DE CLONES *Eucalyptus cloeziana* F. MUELL E
Eucalyptus citriodora HOOK**

JÚLIO CÉZAR ROTUNDO
Engenheiro Florestal

Orientador: Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

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

Piracicaba
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro / 1993

**EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE
AMÔNIO NA MULTIPLICAÇÃO E NO ENRAIZAMENTO
"in vitro" DE CLONES *Eucalyptus cloeziana* F. MUELL E
Eucalyptus citriodora HOOK**

JÚLIO CÉZAR ROTUNDO

Aprovado em: 29/03/93

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

ESALQ/USP

Prof. Dr. Hilton Thadeu Zarate do Couto

ESALQ/USP

Prof. Dr. Maria Lúcia Carneiro Vieira

ESALQ/USP

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

Orientador

Dedico

Aos meus queridos

RAQUEL e ANDRÉ e à quem mais

chegar por aí.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho somente foi possível de ser realizado, pela colaboração de muitos amigos e principalmente por DEUS que me permite participar dessa incrível arte de viver.

Aos meus pais Arlindo (*in memorium*), Haroldo e Myrian, pela educação, amizade e incentivo, a minha mais profunda gratidão.

A minha querida Raquel pelo companheirismo e motivação durante a elaboração.

Ao amigo e orientador Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves, pelo apoio e estímulo na elaboração desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Hilton Tadeu Zarate do Couto pelo estímulo e pela participação nas horas mais difíceis.

Ao Milton Cezar Ribeiro pelas incansáveis e quase que intermináveis horas que passamos elaborando tabelas e gráficos: muitíssimo obrigado, valeu T. Jr.

Aos meus professores, por toda a formação acadêmica.

A CAF FLORESTAL LTDA e amigos por mostrarem que um profissional tem consigo um compromisso técnico e administrativo e, principalmente, pelo auxílio na fase experimental, o mais sincero agradecimento.

Aos amigos Paulo Macedo, Valéria, Francisco Donizete, Robert, Marcelo Eduardo e Augusto Valência, pelo apoio e incentivo.

Ao Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, pelo apoio prestado.

Ao Dr. Walter Suiter, pela amizade, sugestões e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Ernesto George Barrichelo pela amizade e pelas grandes ajudas prestadas.

Ao Prof. Dr. Mário Ferreira pelas colaborações e ensinamentos.

Aos amigos de Pós-graduação pela amizade, companherismo e carinho.

Ao Mestre Marcelo Polo pela minha iniciação científica e pelo incentivo.

Aos meus sogros Dr. Nicolau D^a. Iaiá, pelo apoio e voto de confiança.

Foram tantas as dificuldades, que só puderam ser vencidas com a ajuda de todos aqueles que me tem algum carinho. Àqueles que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração dessa dissertação, o mais carinhoso MUITO OBRIGADO.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO	xviii
SUMMARY	xx
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	04
3.1. Descrição das espécies	04
3.1.1. Classificação botânica.....	04
3.1.2. Região de ocorrência natural da espécies	04
3.1.2.1. <i>Eucalyptus cloeziana</i> F. MUELL	04
3.1.2.2. <i>Eucalyptus citriodora</i> HOOK.....	05
3.1.3. Importância econômica das espécies.....	06
3.1.3.1. <i>Eucalyptus citriodora</i>	06
3.1.3.2. <i>Eucalyptus cloeziana</i>	06
3.1.4. Os aspectos silviculturais	06
3.1.4.1. <i>Eucalyptus cloeziana</i>	06
3.1.4.2. <i>Eucalyptus citriodora</i>	07
3.2. Propagação " <i>in vitro</i> " de espécies vegetais.....	07
3.3. Nutrição dos explantes " <i>in vitro</i> "	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Local do experimento.....	17
4.2. As espécies estudadas	17
4.3. Local de coleta do material vegetal.....	17

4.4. Coleta de material vegetal	18
4.4.1. <i>Eucalyptus cloeziana</i>	18
4.4.2. <i>Eucalyptus citriodora</i>	18
4.5. Obtenção dos explantes.....	19
4.5.1. Desinfestação dos explantes	19
4.5.2. Inoculação dos explantes no meio de cultura	20
4.5.3. Número de explantes utilizados.....	20
4.6. Estabelecimento e manutenção das culturas	21
4.6.1. O meio de cultura	21
4.6.1.1. <i>Eucalyptus citriodora</i>	21
4.6.1.2. <i>Eucalyptus cloeziana</i>	21
4.6.2. O preparo dos meios de cultura	22
4.6.3. Correção do pH dos meios de cultura.....	22
4.6.4. Dissolução do agar	22
4.6.5. Distribuição do meio de cultura	23
4.6.6. Condições de cultura	23
4.7. Delineamento estatístico	23
4.8. O ensaio de multiplicação	24
4.8.1. Obtenção do material vegetal	24
4.8.1.1. <i>Eucalyptus citriodora</i>	24
4.8.1.2. <i>Eucalyptus cloeziana</i>	24
4.8.2. Os tratamentos	25
4.8.2.1. <i>Eucalyptus citriodora</i>	25
4.8.2.2. <i>Eucalyptus cloeziana</i>	25

4.8.3. Parâmetros de avaliação	26
4.8.3.1. Peso de massa seca inicial	26
4.8.3.2. Peso de massa seca final	26
4.8.3.3. Aspcto morfolgicos	27
4.9. O ensaio de enraizamento	27
4.9.1. O material utilizado	27
4.9.2. Os tratamentos	28
4.9.3. Parmetros de avaliao	28
5. RESULTADOS E DISCUSSO	29
5.1. Estabelecimento da cultura	29
5.1.1. Perdas por contaminao	29
5.1.1.1. Fungo	29
5.1.1.2. Bactria	31
5.1.2. Perdas por oxidao fenlica	31
5.1.3. Porcentagem de sobrevivncia dos explantes	32
5.1.4. Obteno de gemas	32
5.2. Multiplicao de gemas	33
5.2.1. Produo de massa seca	33
5.2.2. Nmero total de folhas e nmero de folhas por gemas .	33
5.2.3. Nmero de gemas	40
5.3. Enraizamento das gemas	42
5.3.1. Porcentagem de gemas enraizadas	42
5.3.2. Nmero de razes por gema	42
6. CONCLUSES	45
7. REFERNCIAS BIBLIOGRFICAS	46
8. APNDICES	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Porcentagem de perdas de explantes por contaminação com fungo e bactéria, oxidação fenólica, sobrevivência e emissão de gemas	30
Figura 02. Média do número total de folhas obtidas para os clones X-30, Y-05, X-02 e X-28, em função do período de cultura e concentração de NH_4NO_3	35
Figura 03. Efeito da concentração de NH_4NO_3 no número total de folhas, gemas e raízes para o clone X-30 de <i>Eucalyptus citriodora</i> em 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura	36
Figura 04. Efeito da concentração de NH_4NO_3 no número total de folhas, gemas e raízes para o clone Y-05 de <i>Eucalyptus citriodora</i> em 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura	37
Figura 05. Efeito da concentração de NH_4NO_3 no número total de folhas, gemas e raízes para o clone X-02 de <i>Eucalyptus citriodora</i> em 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura	38
Figura 06. Efeito da concentração de NH_4NO_3 no número total de folhas, gemas e raízes para o clone X-28 de <i>Eucalyptus cloeziana</i> em 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura	39
Figura 07. Média do número total de gemas obtidas para os clones X-30, Y-05, X-02 e X-28, em função do período de cultura e concentração de NH_4NO_3	41
Figura 08. Média do número total de raízes obtidas para os clones X-30, Y-05, X-02 e X-28, em função do período de cultura e concentração de NH_4NO_3	44

Figura 09. Clone X-28 <i>E. cloeziana</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 0,50 mM de NH_4NO_3	75
Figura 10. Clone X-28 <i>E. cloeziana</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 5,00 mM de NH_4NO_3	75
Figura 11. Clone X-28 <i>E. cloeziana</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 8,22 mM de NH_4NO_3	76
Figura 12. Clone X-28 <i>E. cloeziana</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 11,00 mM de NH_4NO_3	76
Figura 13. Clone X-28 <i>E. cloeziana</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 14,50 mM de NH_4NO_3	77
Figura 14. Clone X-28 <i>E. cloeziana</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 18,00 mM de NH_4NO_3	77
Figura 15. Clone X-28 <i>E. cloeziana</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 21,50 mM de NH_4NO_3	78
Figura 16. Clone X-28 <i>E. cloeziana</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 25,00 mM de NH_4NO_3	78
Figura 17. Clone X-02 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 0,50 mM de NH_4NO_3	79

Figura 18. Clone X-02 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 5,00 mM de NH_4NO_3	79
Figura 19. Clone X-02 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 8,22 mM de NH_4NO_3	80
Figura 20. Clone X-02 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 11,00 mM de NH_4NO_3	80
Figura 21. Clone X-02 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 14,50 mM de NH_4NO_3	81
Figura 22. Clone X-02 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 18,00 mM de NH_4NO_3	81
Figura 23. Clone X-02 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 21,50 mM de NH_4NO_3	82
Figura 24. Clone X-02 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 25,00 mM de NH_4NO_3	82
Figura 25. Clone X-30 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 0,50 mM de NH_4NO_3	83
Figura 26. Clone X-30 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 5,00 mM de NH_4NO_3	83

Figura 27. Clone X-30 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 8,22 mM de NH_4NO_3	84
Figura 28. Clone X-30 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 11,00 mM de NH_4NO_3	84
Figura 29. Clone X-30 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 14,50 mM de NH_4NO_3	85
Figura 30. Clone X-30 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 18,00 mM de NH_4NO_3	85
Figura 31. Clone X-30 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 21,50 mM de NH_4NO_3	86
Figura 32. Clone X-30 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 25,00 mM de NH_4NO_3	86
Figura 33. Clone Y-05 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 0,50 mM de NH_4NO_3	87
Figura 34. Clone Y-05 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 5,00 mM de NH_4NO_3	87
Figura 35. Clone Y-05 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 8,00 mM de NH_4NO_3	88

Figura 36. Clone Y-05 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 11,00 mM de NH_4NO_3	88
Figura 37. Clone Y-05 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 14,50 mM de NH_4NO_3	89
Figura 38. Clone Y-05 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 18,00 mM de NH_4NO_3	89
Figura 39. Clone Y-05 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 21,50 mM de NH_4NO_3	90
Figura 40. Clone Y-05 <i>E. citriodora</i> . Brotações em multiplicação com 20 dias de cultura sob tratamento de 25,00 mM de NH_4NO_3	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do meio de cultura utilizado no estabelecimento e manutenção da cultura de <i>Eucalyptus citriodora</i>	56
Tabela 2. Composição do meio de cultura utilizado no estabelecimento da cultura de <i>Eucalyptus cloeziana</i>	57
Tabela 3. Composição do meio de cultura utilizado para a manutenção da cultura de <i>Eucalyptus cloeziana</i>	58
Tabela 4. Composição do meio de cultura básico utilizado para o enraizamento de <i>Eucalyptus citriodora</i>	59
Tabela 5. Composição do meio de cultura básico utilizado para o enraizamento de <i>Eucalyptus cloeziana</i>	60
Tabela 6. Porcentagem de frascos contaminados por fungos em função do período de cultura e clone	61
Tabela 7. Porcentagem de frascos contaminados por bactérias em função do período de cultura e clone	62
Tabela 8. Porcentagem de frascos perdidos por oxidação em função do período de cultura e clone	63
Tabela 9. Porcentagem de sobrevivência dos explantes em função do período de cultura e clone	64
Tabela 10. Porcentagem de gemas, obtidas em função do período de cultura e clone	65
Tabela 11. Médias do peso de massa seca inicial e final para cada clone em função do tratamento	66

Tabela 12. Média do número total de folhas, média do número total de gemas e número de folhas por gema para cada tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone X-30	67
Tabela 13. Média do número total de folhas, média do número total de gemas e número de folhas por gema para cada tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone Y-05	68
Tabela 14. Média do número total de folhas, média do número total de gemas e número de folhas por gema para cada tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone X-02	69
Tabela 15. Média do número total de folhas, média do número total de gemas e número de folhas por gema para cada tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone X-28	70
Tabela 16. Porcentagem de enraizamento e número de raízes por gema, obtidos em função do tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone X-30	71
Tabela 17. Porcentagem de enraizamento e número de raízes por gema, obtidos em função do tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone Y-05	72
Tabela 18. Porcentagem de enraizamento e número de raízes por gema, obtidos em função do tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone X-02	73

Tabela 19. Porcentagem de enraizamento e número de raízes por gema, obtidos em função do tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone X-28	74

**EFEITOS DE CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE
AMÔNIO NA MULTIPLICAÇÃO E NO ENRAIZAMENTO
"in vitro" DE CLONES *Eucalyptus cloeziana* F. MUELL E
Eucalyptus citriodora HOOK**

Autor: Júlio Cezar Rotundo

Orientador: Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

RESUMO

Três clones de *Eucalyptus citriodora* e um clone de *Eucalyptus cloeziana*, provenientes de brotações de teste de progênie, foram utilizados para a obtenção de explantes nodais para o estabelecimento e a manutenção das culturas "in vitro".

Após o estabelecimento das culturas, as gemas foram submetidas a adições ao meio de cultura de 0,50 mM; 5,00 mM; 8,22 mM; 11,00 mM; 14,50 mM; 18,00 mM; 21,50 mM e 25,00 mM de NH_4NO_3 , visando avaliar seus efeitos na multiplicação, no crescimento e no enraizamento.

A análise dos resultados, diante dos objetivos propostos, permitiu, para o presente trabalho, chegar as seguintes conclusões:

- 1 - Todas as adições de NH_4NO_3 proporcionaram acréscimo da média do número total de folhas, da média do número de folhas por gema e do número de gemas ao longo do período de cultura.
- 2 - As maiores taxas de crescimento relativo foram obtidas nas adições de 5,0, 11,0 e 25,0 mM de NH_4NO_3 após 25 dias de cultura.

- 3 - Adições de acima de 18,0 mM de NH_4NO_3 reduziram e atrasaram a porcentagem de gemas de clones de *Eucalyptus citriodora* e favoreceram o enraizamento de *Eucalyptus de cloeziana*.
- 4 - Adições de 11,0, 14,0 e 18,0 mM de NH_4NO_3 levaram ao aumento do número de raízes por gemas.
- 5 - Houve diferenças no comportamento entre clones das duas espécies para as características analisadas.

**EFFECT OF AMONIUM NITRATE CONCENTRATION
ON SHOOT MULTIPLICATION AND ROOT "*in vitro*"
OF *Eucalyptus cloeziana* F. MUELL AND
Eucalyptus citriodora HOOK CLONES**

Author: Júlio César Rotundo

Adviser: Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

SUMMARY

Three clones of *Eucalyptus citriodora* and one of *Eucalyptus cloeziana* obtained from coppices of progeny trial were utilized to get nodal explants to establish and maintain the cultures "*in vitro*".

After the culture establishment, the shoots were submitted to additions to the culture media of 0.5, 5.0, 8.22, 11.0, 14.5, 18.0, 21.5 and 25.0 mM of NH_4NO_3 to evaluate the effects on shoot multiplication, growth and rooting.

The analyses of the results allowed to draw the following conclusions:

- 1- All NH_4NO_3 additions increased the mean total leaves number, mean number of leaves per shoots and the mean number of shoots through the culture period;
- 2 - The highest relative growth rates were obtained on additions of NH_4NO_3 5.0 and 25.0 mM at the 25th day of culture;
- 3 - Additions above 18.0 mM of NH_4NO_3 reduced the percentage of and delayed the rooting of clones of *Eucalyptus citriodora* and promoted the rooting of *Eucalyptus cloeziana*;

- 4 - Additions of NH_4NO_3 11.0, 14.0 and 18.0 mM increased the number of roots per shoot.
- 5 - There were differences on behavior among clones of both species for the evaluated characteristics.

1. INTRODUÇÃO

Trabalhos de melhoramento genético florestal visando maior produtividade e qualidade das florestas vem sendo conduzidos por diversas empresas do setor florestal e instituições de pesquisa, variando o direcionamento da qualidade destas florestas de acordo com a finalidade da matéria prima produzida. Com o objetivo de abastecer o setor siderúrgico com o carvão vegetal, matéria prima utilizada na termo-redução em seus auto-fornos, para a produção de ferro-gusa, as florestas de *Eucalyptus* vem sendo direcionadas para gerar matéria-prima com características específicas (densidade básica, teor de lignina, etc.) ao carvoejamento e à qualidade do carvão vegetal produzido.

Dentre as espécies mais utilizadas para a produção de carvão vegetal, o *Eucalyptus citriodora* e o *Eucalyptus cloeziana*, são de grande relevância para a produção de carvão vegetal. Por outro lado, essas espécies apresentam altamente suscetíveis à algumas enfermidades que afetam o gênero *Eucalyptus*. Por exemplo, a seca de ponteiro do eucalipto do Vale do Rio Doce, atualmente chamada de SPEVRD, tem apresentado problemas com considerável perda na produção de madeira nas áreas de ocorrência. Os sintomas, épocas e locais de ocorrência foram descritos com detalhes por FERREIRA (1986 e 1989). Todas as espécies e procedências de *Eucalyptus* plantadas na região do Vale do Rio Doce, tem apresentado os sintomas com diferentes graus de tolerância. O *Eucalyptus citriodora* e algumas procedências de *Eucalyptus urophylla* são

reconhecidamente suscetíveis, o mesmo ocorrendo com *E. maculata*, *E. cloeziana*, *E. microcorys*, *E. paniculata* e *E. robusta*.

Alguns trabalhos de seleção de árvores de *E. citriodora*, tolerantes à SPEVRD, em plantios comerciais vem sendo conduzidos por algumas empresas florestais, com o objetivo de multiplicar vegetativamente esses genótipos, para plantios clonais e áreas de recombinação, para produção de sementes.

Outra enfermidade que incide sobre o *Eucalyptus* é a ferrugem causada pela *Puccinia psidii* uma das mais severas para algumas espécies em determinadas regiões do Brasil, principalmente na zona metalúrgica, Zona da Mata e vale do Rio Doce em Minas Gerais, litoral do Espírito Santo, sudeste e norte da Bahia, (ALFENAS *et alii*, 1991). Dentre as espécies suscetíveis, destaca-se o *E. cloeziana* e o *E. grandis* (FERREIRA e SILVA, 1982; FERREIRA, 1983).

Trabalhos de seleção de campo e a aplicação de técnicas como a eletroforese de proteínas e enzimas, vem sendo conduzidos para a identificação de genótipos de *E. cloeziana* resistentes à ferrugem, causada por *Puccinia psidii*.

Atualmente, a técnica da estaquia tem sido largamente utilizada, para a propagação de várias espécies de *Eucalyptus*, que satisfazem vários critérios de seleção e, entre eles, tolerância a determinadas doenças e pragas. Entretanto, tem sido observado que algumas espécies apresentam dificuldades no processo de enraizamento das estacas, como por exemplo *E. citriodora* (ANEJA e ATAL, 1969), e *E. cloeziana* (GOMES e ROTUNDO, 1990).

Nesse sentido, estudos que envolvem a técnica de cultura de tecidos de plantas, micropropagação, estão sendo conduzidos, para otimizar a multiplicação e o enraizamento de brotações de *E. citriodora* e *E. cloeziana*.

2. OBJETIVOS

A necessidade de se obter protocolos para otimizar a multiplicação e o enraizamento de brotações obtidas "*in vitro*" e reduzir o período de cultura em cada etapa do processo de micropropagação, é o principal objetivo do presente estudo, através de:

- Avaliação do efeito de diferentes concentrações de nitrato de amônio, na multiplicação e enraizamento "*in vitro*" de *E. cloeziana* e *E. citriodora*;
- Avaliação dos aspectos morfológicos e quantitativos das brotações e raízes obtidas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Descrição das espécies

3.1.1. Classificação botânica

Os materiais vegetais estudados são classificados botanicamente no sistema, definido por PRYOR & JOHNSTON (1971) como pertencentes à divisão Angiospermae, classe Dicotyledonae, subclasse Archichlamydae, ordem Myrtaceae, gênero *Eucalyptus*:

- a) Sub-gênero *Corymbia*, Secção *Ochraria*, Série *Maculatae*, Espécie *citriodora*;
- b) Sub-gênero *Idiogenes*, Secção *Gympiaria*, Série *Cloezianae*, Espécie *cloeziana*.

3.1.2. Região de ocorrência natural das espécies

3.1.2.1. *Eucalyptus cloeziana* F. MUELL

Esta espécie, segundo FERREIRA (1989), ocorre naturalmente nas regiões central e norte do estado de Queensland, na Austrália. Caracteriza-se por não ocorrer em populações contínuas, mas sim de forma esparsa. A área de distribuição está compreendida entre as latitudes de 16° a 26,5°S e altitudes de 60 a 900 m.

A precipitação pluviométrica média anual varia de 1000 a 1600 mm, concentrando-se no verão. A temperatura média no mês mais quente situa-se em torno de 29°C, e a média no mês mais frio, entre 8 a 12°C. O período de seca não ultrapassa de 3 a 4 meses. As geadas são raras e pouco severas.

3.1.2.2. *Eucalyptus citriodora* HOOK

Referindo-se às citações de Hillis & Brown (1978) e Mangieri & Dimitri (1971), PINEDO (1989) preconiza que o *Eucalyptus citriodora* tem sua distribuição natural na parte oriental do estado de Queensland-Austrália, entre as latitudes de 17° a 26° sul. Existem duas áreas principais de ocorrência, sendo situadas entre Mackay e Maryborough - 22° a 26° sul - e na região próxima à Atherton - 17° a 19° sul. A primeira população, de acordo com a preconização do autor, se encontra a uma altitude de 75 a 300 metros, e a segunda entre 600 a 800 metros.

PINEDO (1989), sequenciando as citações dos autores, ressalta aspectos de grande relevância quanto às exigências silviculturais da espécie, ocorrência em regimes tropicais com precipitação pluviométrica anual de 600 a 1000 mm. Os tipos de solos onde melhor se desenvolvem são argilo-arenosos, avermelhados, podzólicos e lateríticos bem drenados e profundos.

3.1.3. Importância econômica das espécies

3.1.3.1. *Eucalyptus citriodora*

O *E. citriodora* possui características importantes, tanto pela sua madeira como pelo seu óleo essencial. Sturion *et alii* (1987) citado por PINEDO (1989) estudou doze espécies de *Eucalyptus* e ressalta o *E. citriodora* como a que apresentou madeira de maior densidade básica, sendo a mais adequada para a produção de energia e para usos que requerem resistência mecânica das peças da madeira, e a construção de pontes, (HELLMEISTER, 1978).

3.1.3.2. *Eucalyptus cloeziana*

As avaliações preliminares da produtividade de madeira apta para a produção de carvão vegetal no sudeste da Bahia tem revelado que o *Eucalyptus cloeziana* F. Muell é uma das espécies florestais mais promissoras para o reflorestamento na região. Onde tem apresentado incremento médio anual de 50 m/ha/ano nos sete primeiros anos de idade (RUIZ *et. alii.*,1987).

3.1.4. Os aspectos silviculturas

3.1.4.1. *Eucalyptus cloeziana*

Tem-se verificado nos plantios de *E. cloeziana* no sul da Bahia, com até seis a oito meses de idade incidência severa de ferrugem causada por *Puccinia psidii* WINTER, acarretando elevada perda de crescimento e até mesmo

mortalidade de plantas (MORAES *et. alii.*, 1982). Em 1987, cerca de 122 ha de *E. cloeziana* plantados no sudeste da Bahia foram reformados em consequência da alta incidência da doença (RUIZ *et. alii.*, 1987).

3.1.4.2. *Eucalyptus citriodora*

No Vale do Rio Doce em Minas Gerais, região de atuação de várias empresas do setor florestal, verificou-se que 70% das áreas plantadas em baixadas com *Eucalyptus citriodora*, foram afetadas pela SPEVRD, (FERREIRA, 1989).

3.2. Propagação *in vitro* de espécies vegetais

O aperfeiçoamento de plantas pelos métodos tradicionais de seleção e hibridação tem sido costumeiramente praticado. Os métodos de seleção evoluíram graças aos conhecimentos recentes da genética e da fisiologia vegetal. Nas últimas décadas, surgiram novas técnicas. Algumas destas já apresentam resultados práticos e outras ainda estão em fase de testes. Dentre as técnicas que já vem apresentando resultados econômicos promissores, encontra-se a multiplicação vegetativa *in vitro* ou a micropropagação através por cultura de meristemas, gemas axilares e outros tecidos vegetais (FAGUNDES, 1990).

GIACOMETTI (1990) preconiza que a tecnologia da cultura de células, protoplastos e tecidos de plantas constitui uma das áreas de maior êxito da biotecnologia de plantas. Após quase meio século de progresso, esta tecnologia conquistou destacada posição na propagação comercial e industrial de plantas, no melhoramento genético, no manejo, no intercâmbio e na conservação de

germoplasma, bem como em outras aplicações como as pesquisas em fisiologia vegetal e produção *in vitro* de compostos secundários.

De comum acordo com GIACOMETI (1990), GRATTAPAGLIA e MACHADO (1990) enfatizam que a cultura de tecidos de plantas tem sido considerada uma grande promessa para agricultura. A micropropagação, em função do tamanho dos propágulos utilizados, é, indiscutivelmente, a aplicação mais concreta e de maior impacto da cultura de tecidos.

É oportuno citar a definição dada por GROUT & SHORT (1979), onde os autores preconizam o fato de que a cultura de tecidos vegetais é uma técnica através da qual pequenos pedaços de planta selecionada, denominados de explantes, são cultivados em meio artificial, cientificamente definido, contendo os nutrientes orgânicos e inorgânicos necessários ao crescimento e desenvolvimento vegetal, sob condições assépticas. Esta técnica se baseia na totipotência ou competência celular, que é a capacidade que as células possuem de regenerar a planta inteira.

As árvores são organismos multicelulares, de tecidos estrutural e funcionalmente complexos. Suas células exibem considerável variação em tamanho, forma e capacidade funcional, mascarando o fato de que todas as células possuem uma origem comum:- célula ovo ou zigoto. As subseqüentes divisões mitóticas deste zigoto, produzem um embrião na semente, que ao completar seu desenvolvimento é dotado de ápices caulinar e radicular diferenciados, (SILVA, 1989). Segundo a citação do autor, as divisões celulares, dentro destas regimes especializadas, produzem as células necessárias para a reprodução da planta inteira e funcional. Assim, fica evidente que a original célula única do zigoto contém todas as informações requeridas, para a produção de uma planta completa. Esta informação está contida no DNA cromossômico dos núcleos celulares, e

cópias precisas delas, foram transmitidas para as células filhas durante a divisão celular mitótica. Assim, como cada célula vegetativa da planta adulta foi efetivamente derivada por mitoses de células do embrião jovem, é evidente que cada uma destas células contém todas as informações necessárias ao crescimento e desenvolvimento do organismo completo. À esta capacidade de transferência de informações é que se dá o nome de totipotência.

No entanto, o sucesso de um sistema de micropropagação depende, segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), do controle de um grande número de variáveis. Ao contrário do que frequentemente se acredita, por exemplo, a composição do meio de cultura, não é a variável determinante do sucesso da micropropagação. A função dos vários componentes utilizados nos meios de cultura é suficientemente conhecida e a repetibilidade de uma determinada formulação é praticamente absoluta.

Nos tecidos em cultura, o controle da organogênese é feito através da introdução de sinais e substratos diversos. A retirada de um fragmento de tecidos de um organismo íntegro e sua colocação em um meio de cultura que contém nutrientes e reguladores de crescimento traz como consequência a liberação de suas células do controle a que estavam submetidos nesse organismo, expondo-as a uma nova condição, onde a capacidade de divisão pode ser readquirida (desdiferenciação) e o genoma pode expressar-se de novas formas, conduzindo-as a novos padrões de diferenciação. Esses eventos podem, de diversas maneiras, levar à formação de novas estruturas organizadas, num processo morfogenético ou organogenético, (HANDRO & FLOH, 1990).

Uma vez que cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos, as necessidades para seu cultivo *in vitro* também tendem a ser únicas. A capacidade de regeneração *in vitro* parece

estar associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica na planta matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos. O verdadeiro desafio, está no material vegetal em si e na manipulação deste antes de se isolar o explante inicial até o transplante da planta produzida. Esta manipulação inclui o manejo da planta matriz, as características do explante utilizado, o procedimento de subcultura adotado, as condições ambientais e microambientais dentro do frasco de cultura e o transplante. O estado fisiológico e fitossanitário da planta, cujos explantes serão retirados, tem grande influência no posterior comportamento das culturas. Por exemplo, no caso das espécies lenhosas, a passagem do estado juvenil para o adulto ocorre uma série de alterações na capacidade morfogenética dos tecidos. A influência destas alterações é marcante na reatividade inicial dos explantes, uma vez isolados, e, principalmente, na fase de enraizamento das plantas. No caso do *Eucalyptus*, a literatura tem ilustrado que quando se utiliza segmentos nodais de ramos adultos das árvores, os explantes mostram-se com formações de calos com posterior necrose e morte dos tecidos, sem que ocorra qualquer inoculação de brotações de gemas axilares (HACKETT, 1987; BONGA, 1987; GEORGE & SHERRINGTON, 1984).

ANEJA & ATAL (1969), trabalhando com lignotuber de *E. citriodora*, relataram o êxito de suas experimentações na regeneração de plantas da espécie em sistemas de cultura de tecidos.

GUPTA *et alii* (1981) trabalhando com *E. citriodora*, utilizaram o meio de cultura de MURASHIGE & SKOOG (MS) acrescido de 2,0 mg/l de ácido naftaleno acético (NAA), e verificaram uma baixa porcentagem de gemas enraizadas, em torno de 35% . Os autores observaram que as gemas enraizadas haviam sido subcultivadas por quatro vezes, indicando a necessidade de se

reverter os tecidos à juvenilidade, para o êxito do enraizamento da espécie *in vitro*.

GONCALVES (1982; 1983); DE FOSSARD (1976), relatam os trabalhos com rejuvenescimento de diferentes espécies do gênero *Eucalyptus*, ressaltando o êxito nos processos de clonagem das espécies, em função das diferentes variáveis envolvidas no processo *in vitro*, como por exemplo, segundo os autores, a necessidade de reversão à juvenilidade.

Por outro lado, PINEDO (1989) trabalhando com a micropropagação de *E. citriodora*, utilizou o meio de cultura MS acrescido de 0,5 mg/l de ácido indol-butírico (IBA) e observou um percentual máximo de enraizamento *in vitro* em torno de 86,70% no décimo quarto dia de cultivo. Já no vigésimo primeiro dia de cultivo, o autor não verificou nenhum aumento significativo na porcentagem de gemas enraizadas.

CARVALHO (1988), trabalhando com segmentos nodais de *Eucalyptus grandis*, verificou que as maiores taxas de multiplicação, foram obtidas quando se utilizou o meio de cultura de DE FOSSARD (1976) acrescido de 0,5 a 1,0 mg/l de BAP, na ausência de ANA e nas concentrações de 0,1 e 0,2 mg/l de ANA. O balanço hormonal, segundo o autor, de GA3 0,1 mg/l e ANA 0,01 mg/l foi o que proporcionou um maior número de plântulas e uma melhor formação do sistema radicular.

3.3. Nutrição de explantes "*in vitro*"

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos de plantas, fornecem as substâncias essenciais, para o crescimento e

controle, em grande parte, do padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS *et alii.*, 1990).

BUTCHER & INGRAM (1977); MURASHIGE (1974) e GEORGE & SHERRINGTON (1984), citam que as plantas intactas, células e órgãos cultivados, requerem os íons N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, B, Cu, Mo e Zn, para crescerem, e que esses elementos são usualmente adicionados ao meio de cultura na forma de sais minerais, existindo também a exigência de oxigênio e hidrogênio, sob a forma de água e oxigênio como gás. Por outro lado, segundo os mesmos autores, diferente das plantas intactas que crescem na presença de luz, culturas de plantas também necessitam de carbono, que é fornecido na forma orgânica como um açúcar. Além disso, frequentemente são requeridos aminoácidos, vitaminas B e reguladores de crescimento, ou extratos complexos, como água de côco.

As mesmas vias bioquímicas e metabólicas, que funcionam nas plantas intactas são conservadas nas células cultuvidas, embora alguns processos, como a fotossíntese, podem ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células. Por isso os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas intactas, quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações, para atender às necessidades específicas *in vitro*. Complementando as sussubstâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados ao meio de cultura, para suprir às necessidades metabólicas e estruturais das células (CALDAS *et alii.*, 1990).

HARTMANN & KESTER (1974), ressaltam que os nutrientes requeridos no meio de cultura variam com o tipo de planta e com o propósito da cultura.

A adição de fitorreguladores ao meio de cultura, tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, que se encontram isolados das regimes produtoras na planta matriz (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990). Os fitorreguladores, segundo FELLIPE (1979) e CASTRO (1985), são compostos orgânicos que em pequenas quantidades promovem, modificam ou inibem processos fisiológicos, como crescimento e alongamento ou multiplicação da parte aérea e raízes (ALTMAN & GOREN, 1977).

Referindo-se à preconização de Castro (1985), citado por SILVA (1989), menciona que o mecanismo de ação das auxinas, no processo de alongamento celular, pode atuar na síntese de RNA mensageiro, induzindo à formação de enzimas, ou ativando enzimas pré-formadas, que atuariam nas ligações entre as microfibrilas de celulose da parede celular. Este rompimento, promoveria um aumento na plasticidade e deformação irreversível da parede celular, causando diminuição do coeficiente de reflexão e na pressão potencial, acarretando no influxo de água e consequente aumento nas dimensões celulares, devido ao baixo potencial osmótico no interior do vacúolo.

O nitrogênio é um elemento altamente móvel e suas concentrações nos tecidos vegetais variam com a idade, tipo de tecido, estágio de desenvolvimento e estação do ano. As mais altas concentrações de nitrogênio são encontradas nos tecidos de maior atividade fisiológica, como as folhas e os tecidos meristemáticos. É um elemento essencial na constituição dos aminoácidos e proteínas, ocorrendo em uma grande variedade de compostos, como as enzimas, a clorofila, as membranas celulares, etc (SILVA, 1983).

Coerentemente com a citação de SILVA (1983), GONCALVES (1984) menciona a preconização de Dougall (1980), onde o autor enfatiza que a

utilização de compostos nitrogenados inorgânicos (ou orgânicos), na síntese de aminoácidos, proteínas, purinas e pirimidinas, bem como outros compostos, é uma característica essencial do metabolismo das plantas.

O nitrogênio difere dos demais macronutrientes pelo fato de apresentar-se na forma de cátion (amônio) e ânion (nitrato e nitrito). O efeito destas diferentes formas inorgânicas sobre o crescimento e desenvolvimento de culturas de tecidos é marcante: O nitrato, como única fonte de nitrogênio, sustenta uma boa taxa de crescimento em muitas espécies (CALDAS *et alii*, 1990). Segundo o autor a fonte de nitrogênio utilizada e o balanço entre os íons nitrato e amônio, são aspectos que tem merecido maior atenção. A utilização do nitrato pelas células depende da atividade da enzima redutase do nitrato, que reduz o nitrato à nitrito, composto que, em seguida, se reduz à amônia, através da atividade de redutase do nitrito.

Em geral, as células vegetais apresentam um crescimento considerado ótimo em meio contendo amônio e nitrato, sendo que a concentração ideal de nitrogênio total varia de cultura para cultura (GONÇALVES, 1984). Quando o nitrogênio é fornecido apenas como sais inorgânicos de amônio, geralmente as células de tecidos cultivados *in vitro* apresentam sintomas de toxidez, sendo que quando se utiliza a combinação de duas formas de nitrogênio inorgânico, como o nitrato e o amônio, o crescimento de muitas espécies *in vitro* é estimulado (Heller 1965; Yatazawa & Furuhashi, 1968; Gamborg, 1970; Gamborg & Shyluk, 1970) citados por CALDAS *et alii* (1990). Para uma mesma concentração de amônio que inibe o crescimento dos tecidos, quando se trabalha com uma baixa concentração de nitrato no meio de cultura, proporciona um bom crescimento destes tecidos, quando se aumenta a concentração do nitrato fornecido *in vitro* (CALDAS & CALDAS, 1976).

As formas orgânicas de nitrogênio utilizadas em cultura de tecidos incluem misturas complexas de compostos nitrogenados, como extrato de levedura e caseína hidrolisada, mistura de aminoácidos e amidas isoladas, uréia e alantoína (White, 1937; Yatzawa & Furuhashi, 1968; White, 1939; Reinert & White, 1956; Steinhart *et alii*, 1961 e Skokut & Filner, 1980) citados por CALDAS *et alii* (1990). O autor enfatiza que a glutamina tem sido utilizada com muito sucesso na complementação das fontes inorgânicas de nitrogênio, bem como fonte única de nitrogênio estimulando o crescimento de tecidos diversos *in vitro*.

A formação da glutamina nos tecidos vegetais está intimamente associada à presença de amoníaco. Normalmente ocorre a formação desta amida, sempre que o sistema radicular está a absorver quantidades razoáveis de íons amônio. As amidas são muito importantes no metabolismo do nitrogênio, em virtude de a sua síntese evitar o acúmulo de amoníaco livre nos tecidos, o que acarreta danos à estes (MEYER *et alii*, 1973).

KIRBY *et alii* (1987) relacionaram as concentrações de nitrogênio mais frequentemente utilizadas nos meios de cultura, para as espécies florestais e verificaram que as concentrações de nitrogênio total variam de 8,1 a 60,0 mM. Esses autores sugerem que para a cultura de tecidos de coníferas e outras espécies florestais, a presença de nitrato e amônio no meio de cultura é necessário para um bom crescimento dos tecidos.

OJIMA & OHIRA (1978) estudaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio em arroz. As células cresceram em meio líquido contendo nitrato (40 mM), como única fonte de nitrogênio, mas a adição de amônio aumentou o crescimento.

TEXIER & FAUCHER (1985) trabalhando com ápices caulinares de *Eucalyptus parvifolia* Camb. "*in vitro*", observaram uma organização satisfatória dos tecidos, quando cultivados em meio de cultura com $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1 μM) e em NH_4NO_3 (5,0 mM).

MONTEUVIS & BON (1985) estudando o processo de micropropagação de sequóia gigante, utilizaram 4 (quatro meios de cultura) variando a concentração de nitrogênio inorgânico total em 125 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l e 1775 mg/l no meio de cultura e observaram que as folhas novas formadas, foram bem menores nas três primeiras concentrações de nitrogênio, do que na última, respectivamente. Os autores observaram também, que a concentração de 500 mg/l de nitrogênio inorgânico total, proporcionou um maior alongamento das brotações em relação as obtidas no meio de cultura contendo 250 mg/l de nitrogênio inorgânico total. Por outro lado, um abaixamento elevado da concentração do nitrogênio de 250 mg/l para 125 mg/l foi prejudicial para a porcentagem de enraizamento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do experimento

Os ensaios conduzidos no Laboratório de Biotecnologia de Plantas, do Centro de Pesquisa Florestal da CAF Florestal LTDA, em Bom Despacho- M.G., desde março de 1991.

4.2. As espécies estudadas

Foram utilizados no presente estudo, três clones de *Eucalyptus citriodora* (X-30, X-02, Y-05) e um clone de *Eucalyptus cloeziana* (X-28).

4.3. Local de coleta do material vegetal

O local onde foi realizada a coleta do material vegetal, está situado em Ibitira, distrito pertencente ao município de Martinho Campos-M.G., com altitude de 703 metros, temperatura média anual de 20°C e precipitação pluviométrica média anual de 1400 mm; 19°35' S de latitude e 45°17' W de longitude. O solo predominante é Latossolo vermelho-amarelo (LVa).

4.4. Coleta e transporte do material vegetal

Para os clones estudados foram utilizadas brotações laterais de touças com 75 (setenta e cinco) dias de idade, com cerca de 60 (sessenta) cm de altura, provenientes de um ensaio de progênie com idade de 108 (cento e oito) meses de idade. As touças eleitas para a coleta do material vegetal, originam-se do desbaste sistemático necessário para as finalidades do ensaio inicial.

4.4.1. *Eucalyptus cloeziana*

Para o *E. cloeziana* foi utilizada uma progênie, sendo que dentro desta, escolheu-se uma árvore como matriz, para a remoção das brotações.

4.4.2.. *Eucalyptus citriodora*

Para esta espécie, utilizou-se 3 (três) progênies, sendo que dentro de cada progênie foi escolhida uma árvore como matriz, igualmente selecionadas por suas características de desenvolvimento.

As brotações foram colhidas simultaneamente, por um único operador e transportadas em recipientes plásticos até o laboratório. Para o transporte, as bases dos ramos foram imersas em solução de fungicida benomyl concentrado em 400 mg/litro de água bidestilada e deionizada.

4.5. Obtenção dos explantes

No estabelecimento das culturas utilizou-se os segmentos nodais das touças brotadas. Para tanto, as brotações foram removidas tomando-se como estratégia a manutenção de pelo menos uma brotação por touça, objetivando a sobrevivência desta.

Removeu-se o material vegetal das touças com o auxílio de tesouras de poda entre 4:00 hs e 6:00 hs com um tempo de transporte até o laboratório em torno de 40 minutos aproximadamente.

4.5.1. Desinfestação dos explantes

No processo de desinfestação dos explantes seguiu-se o método direto utilizado por GONCALVES (1982) modificado, obedecendo as seguintes etapas:

- a. Coleta das brotações das touças;
- b. Transporte do material vegetal coletado ao Laboratório de Biotecnologia do CPF/CAF Florestal LTDA, com as respectivas bases mergulhadas em solução de fungicida benomyl com concentração de 400 mg/l H₂O em recipientes de plásticos;
- c. No laboratório, realizou-se o desfolhamento dos ramos e remoção dos segmentos nodais. Essa operação foi executada com o auxílio de tesouras previamente esterilizadas em autoclave, sob temperatura de 120°C por 30 (trinta) minutos;
- d. Tratamento dos segmentos nodais com detergente comercial, aproximadamente 0,5 ml/100 explantes;

- e. Lavagem dos segmentos nodais com água destilada e deionizada;
- f. Imersão dos explantes em solução de fungicida benomyl com concentração de 400 mg/l H₂O por 60 minutos;
- g. Transferência dos explantes para solução de bicloreto de mercúrio, 300 mg/l por 10 minutos dentro da câmara de fluxo contínuo e sob agitação manual contínua;
- h. Lavagem dos explantes por 4 vezes, com água destilada, deionizada e esterelizada.

4.5.2. Inoculação dos explantes no meio de cultura

Após passar pelo processo de desinfestação, os segmentos nodais foram individualmente inoculados nos recipientes de vidro, com o auxílio de pinças previamente submetidas ao processo de esterilização em autoclave 120°C por 30 minutos e imersas em etanol 95%, flambadas em bico de BUNSEN no interior da câmara de fluxo contínuo.

Os recipientes foram identificados individualmente, tanto por espécie como por progênie fornecedora dos explantes.

Os recipientes contendo os explantes foram acondicionados em raques com capacidade para 24 frascos e distribuídos aleatoriamente na sala de crescimento.

4.5.3. Número de explantes utilizados

Para todas as espécies e progênies estudadas, padronizou-se o número de explantes utilizados no processo de indução das gemas.

Foram inoculados 168 (cento e sessenta e oito) segmentos nodais em seus respectivos meios de cultura, para a obtenção de gemas "*in vitro*" e estabelecimento das culturas.

4.6. Estabelecimento e manutenção das culturas

4.6.1. O meio de cultura

Estes meios de cultura foram formulados à partir de dados coletados da literatura, para teores de nutrientes minerais adequados para crescimento ótimo de material juvenil. As concentrações dos nutrientes para o cultivo "*in vitro*", foram calculados para a produção de quinze (15) gramas de matéria seca, por litro de meio de cultura.

4.6.1.1. *Eucalyptus citriodora*

A composição do meio de cultura utilizado, para o estabelecimento da cultura, foi a mesma utilizado para a manutenção e se encontra na Tabela 1.

4.6.1.2. *Eucalyptus cloeziana*

A composição dos meios de cultura utilizados para o estabelecimento e manutenção da cultura se encontram nas Tabelas 2 e 3 respectivamente.

4.6.2. O preparo dos meios de cultura

Para todas as etapas da experimentação, foi utilizado o sistema de soluções estoques cinquenta vezes mais concentradas do que o requerido pelo meio de cultura, para cada elemento químico utilizado. Estas soluções foram armazenadas em recipientes escuros com capacidade de 1000 ml cada e mantidos em refrigeradores à aproximadamente 5°C.

Com o auxílio de pipetas graduadas, alíquotas de vinte (20) mililitros (ml) foram removidas de cada solução estoque, para suprir as concentrações necessárias dos elementos minerais ao meio de cultura.

Somente no caso da sacarose e do agar, não se utilizou o sistema de solução estoque. Neste caso, as pesagens foram realizadas de acordo com a necessidade, para o preparo de um litro de meio de cultura de cada vez.

4.6.3. Correção do pH dos meios de cultura

Para fazer a leitura e correção do pH do meio de cultura utilizou-se o pH metro. Utilizados soluções de HCl e KOH 0,1 normal (0,1 N), para corrigir o pH em 5,6 quando necessário. Com o auxílio de um conta-gotas, adicionou-se ao meio de cultura as alíquotas necessárias, para atingir o pH pré-estabelecido.

4.6.4. Dissolução do agar

Para a total solubilização do agar acrescido ao meio de cultura, utilizou-se a chama obtida através do bico de BUNSEN, sob uma tela de amianto

apoiada por um suporte de ferro. Sobre o sistema, foi colocado um ERLEMEYER de 2000 ml contendo 1000 ml de meio de cultura. Esta metodologia foi empregada para satisfazer às necessidades de todas as fases experimentais. Durante o processo, o meio de cultura foi agitado manualmente com um bastão de vidro objetivando a não aglutinação das partículas de agar durante a dissolução.

4.6.4. Distribuição do meio de cultura

Finalizado o processo de dissolução, o meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaios com dimensões de 20 mm x 150 mm, dosando-se 10 ml em cada um, com o auxílio de uma pipeta graduada. Os recipientes foram vedados com tampões de algodão e gase, levados ao autoclave e mantidos sob uma temperatura de 120°C por 20 minutos. Após o resfriamento do meio de cultura, os frascos foram transferidos para a sala de inoculação.

4.6.6. Condições de cultura

O material vegetal foi mantido, durante a fase experimental, sob intensidade luminosa em torno de 1000 lux, fotoperíodo de 16/8 horas e temperatura média de 25°C, com variação de 2,5°C (luz fluorescente).

4.7. Delineamento estatístico

O delineamento estatístico utilizado em todas etapas da experimentação foi inteiramente casualizado com 168 repetições por clone, para a

fase de estabelecimento da cultura; 48 repetições para o ensaio de multiplicação; e 48 repetições para o ensaio de enraizamento, para cada clone de cada espécie.

4.8. O ensaio de multiplicação

4.8.1. Obtenção do material vegetal

O material vegetal obtido, para esta etapa da experimentação, foi proveniente da cultura de manutenção estabelecida para cada clone e espécie.

4.8.1.1. *Eucalyptus citriodora*

As gemas obtidas dos segmentos nodais foram transferidas quando atingiram um tamanho aproximado de 15 mm para o meio de cultura de manutenção, com o objetivo de obter maior número de gemas para a aplicação dos tratamentos.

Quinzenalmente, as gemas obtidas das culturas iniciais foram repicadas e subcultivadas no meio de manutenção até atingir um número satisfatório de gemas para se ministrar os tratamentos aos três clones utilizados.

4.8.1.2. *Eucalyptus cloeziana*

Manteve-se a mesma metodologia que foi utilizada para *Eucalyptus citriodora*. Porém, apenas um clone foi estudado em função da disponibilidade de material vegetal.

4.8.2. Os tratamentos

4.8.2.1. *Eucalyptus citriodora*

O meio de cultura básico utilizado encontra-se na Tabela 2, onde a concentração de NH_4NO_3 foi alterada de acordo com a especificação de cada tratamento, mostrados no Quadro 1.

Quadro 1. Concentração de NH_4NO_3 utilizados sob a forma de tratamentos nas etapas de multiplicação e enraizamento "*in vitro*" de *Eucalyptus cloeziana* e *Eucalyptus citriodora*.

Tratamento	mM	mg/l	Nitrogênio inorgânico total mM	$\text{NH}_4 / \text{NO}_3$
1	0,50	40,02	13,00	0,0385 / 0,0400
2	5,00	400,20	20,00	0,2500 / 0,3333
3	8,22	657,80	28,44	0,2890 / 0,4065
4	11,00	880,44	34,00	0,3235 / 0,4783
5	14,50	1160,58	41,00	0,3537 / 0,5472
6	18,00	1440,72	48,00	0,3750 / 0,6000
7	21,50	1720,86	55,00	0,3909 / 0,6418
8	25,00	2001,00	62,00	0,4032 / 0,6757

4.8.2.2. *Eucalyptus cloeziana*

As mesmas concentrações de NH_4NO_3 (tratamentos) utilizados para *E. citriodora*, foram ministrados ao *E. cloeziana*. Entretanto, o meio de cultura básico utilizado para esta espécie se encontra na Tabela 3.

4.8.3. Parâmetros de avaliação

4.8.3.1. Pesos de massa seca inicial

Para todos os clones de ambas as espécies estudadas, realizou-se uma amostragem prévia dos explantes antes de serem submetidos aos tratamentos, para obter os pesos médios de matéria seca dos explantes.

4.8.3.2. Pesos de massa seca final

Os explantes foram então submetidos aos tratamentos e avaliados aos 25 dias de cultura. A avaliação foi realizada amostrando-se 10 recipientes de cada tratamento.

As gemas obtidas foram pesadas em balança analítica, imediatamente após a retirada do meio de cultura, para a obtenção do peso de matéria fresca produzida. Após a metodologia mencionada, o material foi transferido para uma estufa mantido sob uma temperatura de 105°C, até atingir um peso constante. Individualmente, cada aglomerado de gemas (por recipiente) formado, foi pesado na mesma balança analítica, para a obtenção do peso de matéria seca. A porcentagem de umidade foi calculada segundo a mesma metodologia utilizada no momento inicial.

4.8.3.3. Aspectos morfológicos

As avaliações foram realizadas em 10 (dez) recipientes amostrados aleatoriamente em cada tratamento e clone. As observações foram realizadas aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias. Os parâmetros utilizados foram:

- Número de folhas formadas por época de avaliação;
- Número de gemas formadas por época de avaliação;
- Número de folhas por gema;
- Taxa de crescimento relativo, segundo HUNT (1982).

$$R = \frac{\ln P2 - \ln P1}{T2 - T1} \times 100$$

onde:

R = Taxa de crescimento relativo (%)

P1 = Peso da massa seca inicial

P2 = Peso da massa seca final

T1 = Tempo inicial

T2 = Tempo final

4.9. O ensaio de enraizamento

4.9.1 O material utilizado

Nesta fase da experimentação, foram utilizadas as gemas obtidas do ensaio de multiplicação, sendo considerados os explantes oriundos dos tratamentos ministrados para a fase de multiplicação.

4.9.2. Os tratamentos

Os tratamentos ministrados aos explantes, durante esta fase experimental, se encontram nas tabelas 4 / quadro 1 e 5 / quadro 1, tanto para *E. citriodora*, como *E. cloeziana*, respectivamente.

A metodologia aplicada neste ensaio foi a mesma do ensaio de multiplicação, considerando-se 48 frascos sob avaliação por espécie e por clone.

4.9.3. Parâmetros de avaliação

Tomou-se os seguintes critérios de avaliação aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias:

- Número de gemas enraizadas por espécie e por clone;
- Número médio de raízes por gema;
- Porcentagem de enraizamento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estabelecimento da cultura

A Figura 01 ilustra os resultados percentuais obtidos nesta etapa da experimentação, os quais serão discutidos separadamente, em função do clone, época de avaliação e tratamento.

5.1.1. Perdas por contaminação

5.1.1.1. Fungo

O clone Y-05 foi o que apresentou menor percentual de perda (11,31% dos explantes) em relação ao número inicial, por contaminação com fungos, seguido pelo clone X-02 com 13,69%, X-30 com 16,07% e X-28 com 21,43% de explantes perdidos, como apresentado na Tabela 6.

Em relação à estabilização das médias percentuais de perdas por contaminação por fungos, observou-se que a partir do 38º dia de cultura, não ocorreram perdas de explantes do clone Y-05, seguido dos clones X-28 aos 66 dias, X-02 ao 78 dias, X-30 ao 85 dias de cultura.

Figura 01. Porcentagem de perdas de explantes por contaminação com fungo e bactérias, oxidação fenólica, sobrevivência e emissão de gemas.

Esses resultados indicam que a metodologia utilizada por GONCALVES (1982) modificada, pode ter sido mais eficiente, para o clone Y-05 em relação aos demais clones estudados, uma vez as mesmas concentrações de benomyl e de bicloreto de mercúrio, foram ministradas aos explantes por um mesmo operador.

5.1.1.2. Bactéria

Foi observado um percentual de perdas menor por contaminação por bactérias do que por fungos. O clone Y-05 apresentando 6,55% dos explantes perdidos, como mostra a Tabela 7. Os clones X-28, X-02 e X-30 atingiram percentuais maiores de contaminação por bactéria, 8,33%, 14,29% e 20,24% respectivamente. A Figura 01 demonstra a estabilização do percentual de contaminação dos explantes por bactérias, em função do período de cultura. A Tabela 7 mostra que a partir do 31º dia de cultura, o percentual de perda do clone Y-05 se estabilizou, seguido pelos clones X-30, X-28 e X-02 aos 45, 52 e 78 dias de cultura, respectivamente.

5.1.2. Perdas por oxidação fenólica

Os resultados obtidos apontam que todos os clones, utilizados no presente estudo, apresentaram perdas por oxidação fenólica. Entretanto, o percentual de explantes oxidados e o momento de estabilização, variou entre clones, como mostra a Tabela 8. O menor percentual de explantes perdidos por oxidação foi observado no clone X-30 (29,76% dos explantes perdidos), seguido pelos clones X-28, Y-05 e X-02 com 34,52%, 35,71% e 48,83%, respectivamente.

No entanto, pode-se observar na Figura 01, que a oxidação fenólica dos explantes, ocorreu em todas as épocas de avaliação, com excessão do clone Y-05, que se estabilizou no 78º dia de cultura.

5.1.3. Porcentagem de sobrevivência dos explantes

Na Tabela 09 pode-se observar o decréscimo do percentual de explantes vivos, devido às perdas ocorridas por contaminações e oxidação fenólicas dos explantes. O decréscimo de sobrevivência ocorreu mais rápido no clone Y-05, seguido pelos clones X-30, X-02 e X-28. A Figura 01 ilustra a diminuição dos explantes vivos, em função do período de cultura.

5.1.4. Obtenção de gemas

Os três clones de *Eucalyptus citriodora* (X-30, X-02 e Y-05), emitiram as gemas a partir do 31º dia de cultura, enquanto que, o clone X-28 de *Eucalyptus cloeziana*, iniciou a emissão de gemas somente no 85º dia de cultura, como mostra a Tabela 10. Foi observado uma variação entre clones de *Eucalyptus citriodora*. Uma variação percentual também foi observada entre clones das espécies em estudo, o que pode ser atribuído ao meio de cultura previamente formulado para o estabelecimento das culturas, ou ao próprio material genético, o que está de acordo com HACKETT, 1987; BONGA, 1987; GEORGE & SHERRINGTON, 1984. A Figura 01 ilustra o comportamento de cada clone, para a porcentagem de gemas obtidas dos segmentos nodais, em função do período de cultura. Os clones X-30 iniciaram o processo de emissão das gemas 51 dias antecipados ao clone X-28.

5.2. Multiplicação de gemas

5.2.1. Produção de massa seca

De uma forma geral, o clone X-02 foi o que apresentou o maior ganho em massa seca (53,8 mg), quando submetido ao tratamento de 5,00 mM de NH_4NO_3 . Aparentemente, os clones Y-05 e X-02 de *Eucalyptus citriodora* mostraram um comportamento diferente ao nitrogênio total, para o seu crescimento, em relação ao clone X-30 de *Eucalyptus citriodora*, que mostrou maior produção de massa seca com o aumento da concentração de nitrogênio, como mostra os resultados apresentados na Tabela 11. Esses resultados reforçam citações de CALDAS *et alii* (1990); KIRBY *et alii* (1987) e OJIMA & OHIRA (1978), sugerindo que o nitrato, o amônio ou a relação dos dois elementos proporcionaram ganhos em crescimento, porém com concentrações diferenciadas e até mesmo iguais para os clones estudados.

As maiores taxas de crescimento relativo foram obtidas abaixo de 11,00 mM de NH_4NO_3 , para o clone Y-05 como mostra a Tabela 13. Para os demais clones, foi observado uma grande variação entre tratamentos, como mostram as Tabelas 12, 14 e 15.

5.2.2. Número total de folhas e número de folhas por gemas

Nas Tabelas de 12 a 15 observa-se que todas as concentrações de NH_4NO_3 , proporcionaram um acréscimo no número total de folhas ao longo do período de cultura, para todos os clones estudados. A Figura 02 mostra a evolução da média do número total de folhas nos clones em função do período de cultura e

concentração de NH_4NO_3 . Os resultados obtidos mostram que todos os clones apresentaram maior produção de folhas por gema aos 10 dias de cultura. A concentração de 11,00 mM de NH_4NO_3 favoreceu uma maior produção de folhas em todos os clones, como observado por MONTEUVIS & BON (1985), quando trabalhando com micropropagação de sequóia gigante. As melhores respostas para a produção de folhas foram obtidas em torno de 30 mM de nitrogênio inorgânico total no meio de cultura, com exceção ao clone X-30, que apresentou uma resposta melhor a concentração de 8,22 mM de NH_4NO_3 . De uma maneira geral, o clone X-30 foi o que apresentou maior número de folhas por gema e o clone X-28 a menor produção. As Figuras 03 a 06 ilustram o comportamento dos clones X-30, Y-05, X-02 e X-28, respectivamente para o número de folhas em função da concentração de NH_4NO_3 .

Figura 02. Médias do número total de folhas obtidas para os clones X-30, Y-05, X-02 e X-28, em função do período de cultura e concentração de NH_4NO_3 .

CLONE X-30

5 dias

10 dias

15 dias

20 dias

25 dias

Figura 03. Efeito da concentração de NH_4NO_3 no número total de folhas, gemas e raízes para o clone X-30 de *Eucalyptus citriodora* em 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura.

CLONE Y-05

5 dias

10 dias

15 dias

20 dias

25 dias

Figura 04. Efeito da concentração de NH_4NO_3 no número total de folhas e gemas para o clone Y-05 de *Eucalyptus citriodora* em 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura.

CLONE X-02

Figura 05. Efeito da concentração de NH_4NO_3 no número total de folhas e gemas para o clone X-02 de *Eucalyptus citriodora* em 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura.

CLONE X-28

5 dias

10 dias

15 dias

20 dias

25 dias

Figura 06. Efeito da concentração de NH_4NO_3 no número total de folhas e gemas para o clone X-28 de *Eucalyptus cloeziana* em 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura.

5.2.3. Número de gemas

Da mesma forma que foi observado para o número de folhas, o aumento do número de gemas pode ser constatado para todos os clones, quando submetidos a tratamentos com doses crescentes de NH_4NO_3 e ao longo do período de cultura, como ilustra a Figura 07. Esses resultados podem ser observados nas Tabelas de 12 a 15. As melhores respostas podem ser observadas aos 25 dias de cultura, para todos os clones, conforme a concentração de NH_4NO_3 . Os clones X-30 e X-02 apresentaram a maior produção de gemas, quando submetidas ao tratamento 04 (11,00 mM de NH_4NO_3). Por outro lado, os clones Y-05 e X-28 apresentaram respostas diferentes com maior produção de gemas, quando submetidos aos tratamentos 07 (21,50 mM de NH_4NO_3) e 03 (8,22 mM de NH_4NO_3), respectivamente. As Figuras 03 a 06 ilustra o comportamento dos clones X-30, Y-05, X-02 e X-28, respectivamente, para o número de gemas em função da concentração de NH_4NO_3 . Esses resultados confirmam a variação existente entre genótipos diferentes, quanto aos aspectos nutricionais, conforme descrito por HACKETT (1987); BONGA (1987); GEORGE & SHERRINGTON (1984); TEXIER & FAUCHER (1985).

Figura 07. Médias do número de gemas obtidas para os clones X-30, Y-05, X-02 e X-28, em função do período de cultura e concentração de NH_4NO_3 .

5.3. Enraizamento das gemas

5.3.1. Porcentagem de gemas enraizadas

O clone X-30 foi o que apresentou os melhores resultados percentuais de enraizamento das gemas. A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos para porcentagem de enraizamento do clone X-30 em função do período de cultura e tratamento. Os melhores resultados foram obtidos a partir do 10º dia de cultura, havendo uma tendência das maiores porcentagens de enraizamento estar entre 5,00 mM de NH_4NO_3 e 18,00 mM de NH_4NO_3 . De uma maneira geral, as concentrações de NH_4NO_3 acima de 18,00 mM influenciaram negativamente na porcentagem de gemas enraizadas dos clones X-30, Y-05 e X-02, como mostram as Tabelas 16, 17 e 18, respectivamente o abaixamento e elevação excessivos do nitrogênio inorgânico interferiram negativamente na porcentagem de gemas enraizadas, como observado por MOTEUVIS & BON (1985).

Apenas para o clone X-28 de *E. cloeziana*, foram observados resultados positivos, para porcentagem de gemas enraizadas, acima de 18,00 mM de NH_4NO_3 . Contudo, os valores foram observados nos períodos mais avançados de cultura, como mostra a Tabela 19. Nesse caso, houve uma tendência para atrasar a indução de raízes com o aumento da concentração de nitrogênio.

5.3.2. Número de raízes por gema

A Figura 08 ilustra a evolução da média do número total de raízes nos clones em função do período de cultura e concentração de NH_4NO_3 como observado para porcentagem de gemas enraizadas, o clone X-30 de *E. citriodora*

foi o que apresentou o maior número de raízes por gema, entretanto a concentração de 18,00 mM de NH_4NO_3 , foi a que melhor favoreceu o número de raízes aos 10 dias de cultura como apresentado na Tabela 16. Nota-se que somente o clone X-30 emitiu raízes aos 5 dias de cultura. Por outro lado, os clones Y-05, X-02 e X-28, emitiram raízes somente a partir do 10 dia de cultura, como apresentado nas Tabelas 17, 18 e 19, respectivamente. A melhor resposta observada, para o clone Y-05, foi quando submetida a concentração de 11,00 mM de NH_4NO_3 a partir do 10 dia de cultura. O clone X-02 apresentou uma variação entre concentrações de NH_4NO_3 , apresentado na Tabela 18, sugerindo que uma concentração de 11,00 ou 14,50 mM de NH_4NO_3 pode favorecer o número de raízes por gema. Finalmente, o clone X-28 mostrou maior número de raízes por gema conforme o aumento da concentração de nitrogênio como mostra a Tabela 19. Esses resultados sugerem que concentrações acima de 18,00 mM de NH_4NO_3 pode apresentar resultados positivos para o número de raízes por gemas.

Figura 08. Médias do número total de raízes obtidas para os clones X-30, Y-05, X-02 e X-28, em função do período de cultura e concentração de NH_4NO_3 .

6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados, diante dos objetivos propostos, permitiu, para o presente trabalho, chegar as seguintes conclusões:

- 1ª Todas as adições de NH_4NO_3 proporcionaram acréscimo da média do número total de folhas, da média do número de folhas por gema e do número de gemas ao longo do período de cultura.
- 2ª As maiores taxas de crescimento relativo foram obtidas nas adições de 5,0, 11,0 e 25,0 mM de NH_4NO_3 após 25 dias de cultura.
- 3ª Adições de acima de 18,0 mM de NH_4NO_3 reduziram e atrasaram a porcentagem de gemas de clones de *Eucalyptus citriodora* e favoreceram o enraizamento de *Eucalyptus de cloeziana*.
- 4ª Adições de 11,0, 14,0 e 18,0 mM de NH_4NO_3 levaram ao aumento do número de raízes por gemas.
- 5ª Houve diferenças no comportamento entre clones das duas espécies para as características analisadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C. *et. alii*. Controle integrado da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, no sudeste da Bahia. Viçosa, UFV, 1991.

ALTMAN, A. & GOREN, R. Growth and dormancy cycles in citrus bud cultures and their hormonal control. *Physiol. plant*, 30:240-245, 1974.

ANEJA, D. & ATAL, C. Plantlet formation in tissue culture from lignotubers of *Eucalyptus citriodora* HOOK. *Current science*, Bangalore, 38:69-70, 1969.

BUTCHER, D.N. & INGRAM, D.S. Plant tissue culture. New York, Edvard Arnold, 1977. 67p.

BONGA, J.M. Clonal propagation of mature trees: Problems and possible solutions. In: Cell and tissue culture in forestry. Vol.1. General principles and biotechnology. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, p.249-271, 1987.

CALDAS, R.A. & CALDAS, L.S. Nitrate, Amonium and Kinetin effects on growth and enzyme activities of Paul's Scarlet Rose callus. *Physiol. Plant*, 37:111-116, 1976.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P. & FERREIRA, E.F. Meios nutritivos. In: técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. ABCTP EMBRAPA/CNPH, Brasília, p.37-70, 1990.

CARVALHO, D. de. Micropropagação de *Eucalyptus grandis* HILL ex MAIDEN, através da cultura "*in vitro*" de segmentos nodais. Dissertação de mestrado. Lavras, M.G., ESAL, 1988. 79p.

CASTRO, P.R.C. Reguladores vegetais: Ação e aplicações à agro-horticultura. In: Bandel, G. Desenvolvimento e diferenciação de plantas. Piracicaba, ESALQ/USP, 1985. 10 p.

DE FOSSARD, R.A. Tissue culture propagation of *Eucalyptus ficifolia* F.MUELL. In: Proceedings of the symposium on plant tissue culture. Peking Science Press, p.425-38, 1976.

FAGUNDES, S.R.F. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. BCTP, EMBRAPA/CNPH, Brasília, 1990.

FELIPE, G.M. Desenvolvimento. In: Fisiologia vegetal 2. São Paulo, EDUSP, p.1-37, 1979.

FERREIRA, F.A. Principais doenças do eucalipto no estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, EPAMIG, 1986. 32p. (Boletim técnico, 23).

FERREIRA, F.A. Patologia Florestal. Viçosa, Sociedade de Investigações Florestais, 1989. 570p.

FERREIRA, F.A. Ferrugem de eucalipto. Revista Árvore, 7(2):91-109.1983.

FERREIRA, F.A. e SILVA, A.R. Comportamento de procedências de *Eucalyptus grandis* e de *Eucalyptus saligna* à ferrugem (*Puccinia psidii*). Fitopatologia Brasileira, 7(1):23-28. 1982.

FERREIRA, M. Silvicultura intensiva na Bahia. Relatório, IPEF, DCF-ESALQ/USP, p.14-22, 1989.

GAMBORG, O. L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. Plant Physiol., 45:372-375, 1970.

GAMBORG, O.L. & SHYLUK, J. The culture of plant cell with ammonium salts as the sole nitrogen source. Plant Physiol., 45:598-600, 1970.

GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture. asingstake, Eastern Press, 1984. 640p.

GIACOMETTI, D.C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. ABCTP, EMBRAPA/CNPH, Brasília, p.19-25, 1990.

- GOMES, G.M. & ROTUNDO, J.C. Efeito do boro e auxinas no enraizamento de estacas de *E. cloeziana*. Resultados preliminares. Boletim de Pesquisa 001, CAF Florestal Ltda. 1990. 5p.
- GONCALVES, A.N. Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE "in vitro". Tese de doutorado. Piracicaba, ESALQ/USP, 1982. 97p.
- GONCALVES, A.N. Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE, em sistemas de cultura de células e tecidos. Sivicultura, Piracicaba, 4(32):786-7, set./out., 1983.
- GONCALVES, C.H.R.P. Efeitos da nutrição nitrogenada no crescimento e diferenciação de calos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp, var. IAC 48-65). Tese de doutorado. Piracicaba, ESALQ/USP, 1984). 75p.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação. In: técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. ABCTP, EMBRAPA/CNPH, Brasília, p.99-169, 1990.
- GREWAL, S.; AHUJA, A. & ATAL, C.K. "In vitro" proliferation of shoot apices of *Eucalyptus citriodora* HOOK. Indian Journal Biol., 18:775-777, 1980.
- GROUT, B. & SHORT, K. Fundamentals of plant tissue culture. Standon, ne plant ltd., 1979. 46p.

- GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F. & JAGANNATHAN, V. Tissue culture of forest trees - clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* HOOK, by tissue culture. Plant Science Letters, p.195-201, 1981.
- HACKETT, W.P. Juvenility and maturity. In: Cell and tissue culture in forestry. Vol.1. General principles and biotechnology. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, p.216-231, 1987.
- HANDRO, W & FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogenese "*in vitro*". In: Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. EMBRAPA/CNPH, Brasília, p.203-212, 1990.
- HARTMANN, H.T. & KESTER, D.E. Propagacion de plantas: principios y prácticas. México, Compañia Editorial Continental, 1974. 810p.
- HELLER, R. Some aspects of the inorganic nutrition of plant tissue cultures. In: Proceedings of an international conference on plant tissue culture. Berkeley, McCutchan Publ. Comp., p.1-17, 1965.
- HELLMEISTER, J.C. Pontes de *Eucalyptus citriodora*. Tese de livre docência. São Carlos, 1978. 85p.
- HILLIS, W.E. & BROWN, A.G. Eucaltptus for wood production. Australian, CSIRO, 1978. 434p.

- HUNR, R. Concepts in plant growth analysis. In: EDWARD ARNOLD (ed).
Plant Growth curvis: The functional approach to plant growth analysis.
1982. p.14-16.
- KIRBY,E.G.; LEUSTEK,T. & LEE,M.S. Nitrogen nutrition. In: Cell and tissue
culture in forestry, vol.1. J.M.Bonga and Don J. Dursan editors. P.67-
88.1987.
- KUNIIHIKO,O. & OHIRA, K. Nutricional Requeriments of Callus and Cell
Suspension Cultures. In: Fontiers of Plant Tissue Culture. P. 265-74. 1978.
- MANGIERI, H.R. & DIMITRI, M.J. Los Eucaliptos en la silviculture. Buenos
Aires, ACME, 1971. 226p.
- MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. P. 195-267. 1986.
- MEYER, B.; ANDERSON, D.; BOHNING, R.; FRATIANE, D. Introdução à
fisiologia vegetal, 2a ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1973.
710p.
- MONTEUVIS, O. & BON,M.C. Microbouturage du sequoia géant. AFOCEL.
P.50-87. 1985.

- MORAES, T.S.A.; GONCALVES, E.L.; REZENDE, G.C.; MENDES, J. & SUITER, F.W. Evolução da ferrugem causada pela *Puccinia psidii* WINTER, em *Eucalyptus* spp. Dados preliminares. Piracicaba, IPEF, Circular Técnica, 144, 1982. 12p.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. An Rev. Physiol., 25:135-66, 1974.
- PINEDO, D.N.H. Micropropagação de *E. citriodora* e *E. tereticornis*. Dissertação de mestrado, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, Curitiba, 1989. 63p.
- PRYOR, L.D. & JOHNSTON, L.A.S. A classification of the Eucalypts. Aust. National University, Canberra.
- REINERT, J. & WHITE, P.R. The cultivation *in vitro* of tumor tissues and normal tissues of *picea glauca*. Physiol. plant. 9:177-189, 1956.
- RUIZ, R.A.R.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, F.A. & ZAMBOLIM, L. Fungicidas protetores e sistêmicos, para o controle da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*. Revista Árvore, 11(1):56-65, 1987.
- SILVA, A.A.da. Mofogênese "*in vitro*" de diferentes tipos de explantes em progênies de *Pinus caribea* MORELET var. *hondurensis* BARR. et Golf. Dissertação de mestrado. Piracicaba, ESALQ/USP, 1989. 149p.

- SILVA da, H.D. Biomassa e aspectos nutricionais de cinco espécies do gênero *Eucalyptus*, plantadas em solo de baixa fertilidade. Dissertação de mestrado. Piracicaba, ESALQ/USP, 1983. 91p.
- SKOKUT, T.A. & FILNER, P. Slow adaptative changes in ureasa levels of tabaco cells cultured on urea and other nitrogen sources. *Plant physiol.*, 65:995-1003, 1980.
- STEINHART, C.E.; STANDIFER JR., L.C. & SKOOG, F. Nutrient requeriments for *in vitro* growth of spruce tissue. *Amer. Jour. Bot.*, 48:465-472, 1961.
- STURION, J.A.; PEREIRA, J.C.D.; ALBINO, J.C. & MORITA, M. Variação de densidade básica de doze espécies de *Eucalyptus*, plantadas em Uberaba, M.G.. Curitiba, EMBRAPA/CNPQ, Boletim de Pesquisa Florestal, 14, 28-38, 1987.
- TEXIER, F. & FAUCHER, M. Culture *in vitro* D'Apex D'*Eucalyptus* Agé - *Eucalyptus parvifolia* Camb.-. AFOCEL. P.7-23. 1985.
- YATAZAWA, M. & FURUHASHI, K. Nitrogen sources for the growth of rice callus tissue. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 14:73-79, 1968.
- WHITE, P.R. Glycine in the nutrition of excised tomato roots. *Plant Physiol.*, 14:527-538, 1939.

WHITE, P.R. Separation from yeast of materials essential for growth of excised tomato roots. *Plant Physiol.*, 12:777-791, 1973.

APÊNDICES

Tabela 1. Composição do meio de cultura utilizado no estabelecimento e manutenção da cultura de *Eucalyptus citriodora*.

Componentes	Concentração	
	mM	mg / l
NH ₄ NO ₃	7,50	657,80
KH ₂ PO ₄	1,40	190,52
KNO ₃	7,00	707,77
Ca(NO ₃) ₂ • 4H ₂ O	2,50	590,38
MgSO ₄ • 7H ₂ O	2,00	492,96
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,25	36,80
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0,10	27,80
Na ₂ EDTA	0,10	37,30
MnSO ₄ • 4H ₂ O	0,075	12,69
H ₃ BO ₃	0,05	3,10
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0,02	6,46
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,005	1,25
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0,003	0,73
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0,001	0,024
KI	0,001	0,166
L-cisteína		2,50
L-glutamina		150,00
L-arginina		7,80
Ácido nicotínico		5,00
Pantotenato de cálcio		2,50
Tiamina		1,00
Piridoxina		0,50
Meso-inositol		100,00
Sacarose		30,00 g/l
Agar		6,00 g/l
AIA		1,50
6BAP		0,30
pH = 5,6		

Tabela 2. Composição do meio de cultura utilizado no estabelecimento e manutenção da cultura de *Eucalyptus cloeziana*.

Componentes	Concentração	
	mM	mg / l
NH ₄ NO ₃	7,50	657,80
KH ₂ PO ₄	1,40	190,52
KNO ₃	7,00	707,77
Ca(NO ₃) ₂ • 4H ₂ O	2,50	590,38
MgSO ₄ • 7H ₂ O	2,00	492,96
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0,10	27,80
Na ₂ EDTA	0,10	37,30
MnSO ₄ • 4H ₂ O	0,075	12,69
H ₃ BO ₃	0,05	3,10
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0,02	6,46
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,005	1,25
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0,003	0,73
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0,001	0,024
KI	0,001	0,166
L-cisteína		2,50
L-glutamina		150,00
L-arginina		7,80
Ácido nicotínico		5,00
Pantotenato de cálcio		2,50
Tiamina HCl		1,00
Piridoxina HCl		0,50
Meso-inositol		100,00
Sacarose		30,00 g/l
Agar		6,00 g/l
AIA		0,30
6BAP		1,00
pH = 5,6		

Tabela 3. Composição do meio de cultura utilizado para a manutenção da cultura de *Eucalyptus cloeziana*.

Componentes	Concentração	
	mM	mg / l
NH ₄ NO ₃	3,75	328,90
KH ₂ PO ₄	0,70	95,26
KNO ₃	3,50	353,88
Ca(NO ₃) ₂ • 4H ₂ O	1,25	295,19
MgSO ₄ • 7H ₂ O	1,00	246,48
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,125	18,40
FeSO ₄ • 7H ₂ O	0,05	13,90
Na ₂ EDTA	0,05	18,65
MnSO ₄ • 4H ₂ O	0,0375	6,35
H ₃ BO ₃	0,0250	1,55
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0,0100	3,23
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,0025	0,63
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0,0015	0,37
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0,0005	0,012
KI	0,0005	0,083
L-cisteína		1,25
L-glutamina		75,00
L-arginina		3,90
Ácido nicotínico		2,50
Pantotenato de cálcio		1,25
Tiamina HCl		0,50
Piridoxina HCl		0,25
Meso-inositol		50,00
Sacarose		30,00 g/l
Agar		6,00 g/l
AIA		1,20
6BAP		0,08
pH = 5,6		

Tabela 4. Composição do meio de cultura básico utilizado para o enraizamento de *Eucalyptus citriodora*.

Componentes	Concentração	
	mM	mg / l
KH_2PO_4	1,40	190,52
KNO_3	7,00	707,77
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,50	590,38
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,00	492,96
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	36,80
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10	27,80
$\text{Na}_2 \text{ EDTA}$	0,10	37,30
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,075	12,69
H_3BO_3	0,050	3,10
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,020	6,46
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,005	1,25
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,003	0,73
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,001	0,024
KI	0,001	0,166
L-cisteína		2,50
L-glutamina		150,00
L-arginina		7,80
Ácido nicotínico		5,00
Pantotenato de cálcio		2,50
Tiamina HCl		1,00
Piridoxina HCl		0,50
Meso-inositol		100,00
Sacarose		30,00 g/l
Agar		6,00 g/l
AIB		0,50
pH = 5,6		

Tabela 5. Composição do meio de cultura básico utilizado para o enraizamento de *Eucalyptus cloeziana*.

Componentes	Concentração	
	mM	mg / l
KH_2PO_4	0,70	95,26
KNO_3	3,50	353,88
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,25	295,19
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,00	246,48
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,125	18,40
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05	13,90
$\text{Na}_2 \text{EDTA}$	0,05	18,65
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0375	6,35
H_3BO_3	0,025	1,55
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,010	3,23
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0025	0,63
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0015	0,37
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0005	0,012
KI	0,0005	0,083
L-cisteína		1,25
L-glutamina		75,00
L-arginina		3,90
Ácido nicotínico		2,50
Pantotenato de cálcio		1,25
Tiamina HCl		0,50
Piridoxina HCl		0,25
Meso-inositol		50,00
Sacarose		30,00 g/l
Agar		6,00 g/l
AIB		0,50
pH = 5,6		

Tabela 6. Porcentagem de frascos contaminados por fungos em função do período de cultura e clone.

Dias de Cultura	<i>E. citriodora</i>			<i>E. cloeziana</i>
	X-30	Y-05	X-02	X-28
10	1,79	4,76	1,79	1,79
17	3,57	8,33	6,55	4,76
24	9,52	10,12	7,74	9,52
31	11,90	10,71	10,71	15,48
38	11,90	11,31	10,71	16,67
45	11,90	11,31	12,50	17,26
52	13,69	11,31	13,10	19,05
59	14,29	11,31	13,10	20,83
66	14,29	11,31	13,10	21,43
71	14,88	11,31	13,10	21,43
78	15,48	11,31	13,69	21,43
85	16,07	11,31	13,69	21,43
92	16,07	—	13,69	21,43
99	16,07	—	13,69	21,43
106	16,07	—	13,69	21,43
113	—	—	—	—
120	—	—	—	—

Tabela 7. Porcentagem de frascos contaminados por bactérias em função do período de cultura e clone.

Dias de Cultura	<i>E. citriodora</i>			<i>E. cloeziana</i>
	X-30	Y-05	X-02	X-28
10	2,98	5,95	5,95	1,19
17	7,14	5,95	6,55	4,76
24	10,12	5,95	7,74	4,76
31	14,29	6,55	7,74	4,76
38	16,67	6,55	10,71	5,36
45	20,24	6,55	10,71	7,74
52	20,24	6,55	11,31	8,33
59	20,24	6,55	11,31	8,33
66	20,24	6,55	11,31	8,33
71	20,24	6,55	13,69	8,33
78	20,24	6,55	14,29	8,33
85	20,24	6,55	14,29	8,33
92	20,24	—	14,29	8,33
99	20,24	—	14,29	8,33
106	20,24	—	14,29	8,33
113	—	—	—	—
120	—	—	—	—

Tabela 8. Porcentagem de frascos contaminados por oxidação em função do período de cultura e clone.

Dias de Cultura	<i>E. citriodora</i>			<i>E. cloeziana</i>
	X-30	Y-05	X-02	X-28
10	—	—	1,19	1,19
17	4,17	7,74	5,36	7,74
24	4,17	9,52	5,36	8,33
31	4,17	14,29	5,36	10,71
38	4,17	15,48	5,36	11,31
45	4,17	21,43	5,36	11,31
52	4,76	25,00	6,55	12,50
59	5,36	32,14	9,52	21,43
66	5,95	33,33	14,29	25,00
71	7,74	34,52	22,62	26,19
78	10,71	35,71	27,38	28,57
85	16,07	35,71	36,90	31,55
92	23,21	—	38,69	31,55
99	29,17	—	39,29	31,55
106	29,76	—	48,83	34,52
113	—	—	—	—
120	—	—	—	—

Tabela 9. Porcentagem de sobrevivência dos explantes em função do período de cultura e clone.

Dias de Cultura	<i>E. citriodora</i>			<i>E. cloeziana</i>
	X-30	Y-05	X-02	X-28
10	95,24	89,28	91,07	95,83
17	85,12	77,98	81,55	82,74
24	76,19	74,40	79,17	77,38
31	69,64	68,45	76,19	69,05
38	50,60	39,00	64,88	66,67
45	37,50	17,80	50,00	63,69
52	35,12	14,29	46,43	60,12
59	33,93	7,14	43,45	49,91
66	33,33	5,95	38,69	45,29
71	30,95	2,98	27,98	44,05
78	16,64	0,60	22,02	41,67
85	13,69	0,00	12,50	38,69
92	6,55	—	10,71	31,55
99	0,60	—	10,12	15,48
106	0,00	—	0,00	0,00
113	—	—	—	—
120	—	—	—	—

Tabela 10. Porcentagem de gemas, obtidas em função do período de cultura e clone.

Dias de Cultura	<i>E. citriodora</i>			<i>E. cloeziana</i>
	X-30	Y-05	X-02	X-28
10	—	—	—	—
17	—	—	—	—
24	—	—	—	—
31	16,67	28,57	9,52	—
38	26,19	42,86	22,62	—
45	26,19	42,86	22,62	—
52	26,19	42,86	22,62	—
59	26,19	42,86	22,62	—
66	26,19	42,86	22,62	—
71	33,93	42,86	23,21	—
78	33,93	44,05	23,21	—
85	33,93	44,05	23,21	7,14
92	33,93	44,64	23,21	23,21
99	33,93	—	23,21	35,71
106	33,93	—	23,21	35,71
113	—	—	—	—
120	—	—	—	—

Tabela 11. Médias do peso de massa seca inicial e final para cada clone em função do tratamento.

Tratamento	E. citriodora						E. cloeziana	
	X-30		Y-05		X-02		X-28	
	Peso (mg)							
	inicial	final	inicial	final	inicial	final	inicial	final
1	2,01	18,4	1,61	43,7	2,09	39,9	3,44	41,7
2	2,01	30,3	1,61	46,3	2,09	53,8	3,44	43,3
3	2,01	25,1	1,61	46,2	2,09	43,6	3,44	19,2
4	2,01	44,7	1,61	40,0	2,09	39,2	3,44	29,2
5	2,01	31,4	1,61	31,1	2,09	26,6	3,44	27,0
6	2,01	40,1	1,61	39,4	2,09	28,8	3,44	24,5
7	2,01	49,1	1,61	37,8	2,09	44,2	3,44	32,9
8	2,01	45,0	1,61	31,2	2,09	26,4	3,44	47,2

Tabela 12. Médias do número total de folhas, médias do número total de gemas e número de folhas por gema para cada tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone X-30.

Dias	Tratamentos	Número folhas	Número gemas	Número folhas/gemas	R (%)
5	1	9,49	1,35	7,03	—
	2	9,66	1,40	6,90	—
	3	8,28	1,04	7,96	—
	4	9,11	1,10	8,28	—
	5	9,87	1,67	5,91	—
	6	10,89	1,63	6,68	—
	7	10,87	1,50	7,25	—
	8	12,04	1,50	8,03	—
10	1	12,43	1,75	7,10	—
	2	13,57	1,88	7,22	—
	3	11,53	1,10	10,48	—
	4	11,57	1,50	7,71	—
	5	10,85	2,50	4,34	—
	6	11,92	2,27	5,25	—
	7	11,19	1,96	5,71	—
	8	12,66	3,25	3,90	—
15	1	16,11	2,23	7,22	—
	2	15,43	2,85	5,41	—
	3	15,64	3,17	4,93	—
	4	18,55	4,88	3,80	—
	5	13,57	3,81	3,56	—
	6	14,43	3,56	4,05	—
	7	14,79	4,50	3,29	—
	8	19,04	4,98	3,82	—
20	1	21,36	4,17	5,12	—
	2	22,34	6,19	3,61	—
	3	17,81	5,11	3,49	—
	4	23,92	7,60	3,15	—
	5	17,40	5,13	3,39	—
	6	16,43	4,63	3,55	—
	7	20,17	7,04	2,87	—
	8	23,96	7,10	3,37	—
25	1	25,77	5,96	4,32	8,86
	2	32,75	8,87	3,69	10,85
	3	24,79	7,47	3,32	10,10
	4	39,23	10,68	3,67	12,41
	5	21,64	6,64	3,26	11,00
	6	19,32	5,70	3,39	11,97
	7	39,60	9,70	4,08	12,78
	8	40,30	8,75	4,61	12,43

R = Taxa de crescimento relativo

Tabela 13. Médias do número total de folhas, médias do número total de gemas e número de folhas por gema para cada tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone Y-05.

Dias	Tratamentos	Número folhas	Número gemas	Número folhas/gemas	R (%)
5	1	6,62	1,17	5,66	—
	2	7,62	1,27	6,00	—
	3	6,77	1,45	4,67	—
	4	5,98	1,00	5,98	—
	5	8,77	2,19	4,00	—
	6	10,02	1,69	5,93	—
	7	8,81	1,60	5,51	—
	8	8,47	1,46	5,80	—
10	1	8,36	1,45	5,77	—
	2	9,47	1,50	6,31	—
	3	8,51	1,27	6,70	—
	4	8,23	1,00	8,23	—
	5	10,02	2,65	3,78	—
	6	11,29	2,33	4,85	—
	7	10,94	2,19	5,00	—
	8	11,13	2,42	4,60	—
15	1	14,85	2,69	5,52	—
	2	14,51	2,90	5,00	—
	3	12,64	2,46	5,14	—
	4	11,51	2,31	4,98	—
	5	14,30	3,92	3,65	—
	6	14,40	3,60	4,00	—
	7	15,70	3,90	4,03	—
	8	15,11	4,38	3,45	—
20	1	18,57	4,17	4,45	—
	2	17,60	4,83	3,64	—
	3	14,30	3,40	4,21	—
	4	16,66	4,02	4,14	—
	5	15,38	4,98	3,09	—
	6	15,46	4,56	3,39	—
	7	18,85	6,21	3,04	—
	8	18,72	5,79	3,23	—
25	1	25,02	6,21	4,03	13,20
	2	27,32	8,02	3,41	13,44
	3	27,00	7,96	3,39	13,43
	4	27,17	8,32	3,27	12,85
	5	18,17	6,53	2,78	11,84
	6	19,42	6,49	2,99	12,79
	7	27,06	9,64	2,81	12,62
	8	25,89	8,92	2,90	11,86

R = Taxa de crescimento relativo

Tabela 14. Médias do número total de folhas, médias do número total de gemas e número de folhas por gema para cada tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone X-02.

Dias	Tratamentos	Número folhas	Número gemas	Número folhas/gemas	R (%)
5	1	7,38	1,04	7,10	—
	2	7,62	1,06	7,19	—
	3	7,43	1,25	5,94	—
	4	7,64	1,08	7,07	—
	5	10,79	1,88	5,74	—
	6	10,98	2,10	5,23	—
	7	11,44	2,50	4,58	—
	8	10,17	2,42	4,20	—
10	1	11,77	1,56	7,54	—
	2	11,45	1,77	6,47	—
	3	11,15	1,79	6,23	—
	4	11,87	1,44	8,24	—
	5	10,79	1,88	5,74	—
	6	10,98	2,10	5,23	—
	7	11,52	2,50	4,61	—
	8	10,17	2,42	4,20	—
15	1	13,87	2,21	6,28	—
	2	13,09	2,71	4,83	—
	3	12,81	2,31	5,55	—
	4	14,45	2,10	6,88	—
	5	13,17	2,35	5,60	—
	6	13,87	4,10	3,38	—
	7	13,57	4,23	3,21	—
	8	12,96	3,85	3,37	—
20	1	18,21	4,55	4,00	—
	2	15,49	4,19	3,70	—
	3	14,49	3,98	3,64	—
	4	17,17	5,53	3,10	—
	5	13,54	3,88	3,49	—
	6	15,21	4,54	3,35	—
	7	16,28	5,51	2,95	—
	8	14,83	4,65	3,19	—
25	1	27,06	7,23	3,74	11,80
	2	29,96	8,68	3,45	12,99
	3	25,04	8,70	2,88	12,15
	4	31,51	9,72	3,24	11,73
	5	15,02	4,28	3,51	10,18
	6	18,34	5,72	3,21	10,49
	7	22,94	7,39	3,10	12,21
	8	18,79	5,50	3,42	10,15

R = Taxa de crescimento relativo

Tabela 15. Médias do número total de folhas, médias do número total de gemas e número de folhas por gema para cada tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone X-28.

Dias	Tratamentos	Número folhas	Número gemas	Número folhas/gemas	R (%)
5	1	5,66	1,25	4,53	—
	2	5,96	1,25	4,77	—
	3	5,96	1,44	4,14	—
	4	5,49	1,11	4,95	—
	5	5,98	1,17	5,11	—
	6	5,34	1,04	5,13	—
	7	6,00	1,40	4,29	—
	8	6,23	1,56	3,99	—
10	1	5,85	1,35	4,33	—
	2	6,57	1,33	4,94	—
	3	7,17	1,63	4,40	—
	4	6,36	1,21	5,26	—
	5	6,53	1,42	4,60	—
	6	6,23	1,29	4,83	—
	7	7,25	1,94	3,74	—
	8	8,04	2,08	3,87	—
15	1	9,00	1,85	4,86	—
	2	9,15	2,04	4,49	—
	3	9,89	2,27	4,36	—
	4	9,70	1,89	5,13	—
	5	7,77	2,08	3,74	—
	6	7,38	1,69	4,37	—
	7	9,15	2,65	3,45	—
	8	11,04	3,13	3,53	—
20	1	15,26	4,35	3,51	—
	2	15,17	4,33	3,50	—
	3	13,72	3,60	3,81	—
	4	13,32	3,54	3,76	—
	5	8,85	2,52	3,51	—
	6	8,02	1,77	4,53	—
	7	11,66	3,65	3,19	—
	8	13,66	4,08	3,35	—
25	1	21,48	4,98	4,31	9,98
	2	21,53	6,55	3,29	10,13
	3	19,66	5,70	3,45	6,88
	4	18,34	4,98	3,68	8,56
	5	10,66	3,04	3,51	8,24
	6	8,75	2,02	4,33	7,85
	7	15,23	4,32	3,53	9,03
	8	18,36	4,87	3,77	10,48

R = Taxa de crescimento relativo

Tabela 16. Porcentagem de enraizamento e número de raízes por gema, obtidos em função do tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone X-30.

Dias	Tratamentos	% de enraizamento	Número de raízes/gema
5	1	2,08	1,00
	2	37,5	1,67
	3	18,75	2,29
	4	31,25	1,60
	5	25,00	2,25
	6	29,17	3,00
	7	2,08	1,00
	8	0,00	0,00
10	1	16,67	1,37
	2	54,17	2,35
	3	41,67	2,26
	4	52,08	2,28
	5	60,48	2,69
	6	58,33	3,30
	7	29,17	2,29
	8	8,33	2,00
15	1	20,83	1,40
	2	64,58	2,48
	3	58,33	2,26
	4	60,42	2,45
	5	64,58	3,57
	6	66,67	3,42
	7	37,50	2,20
	8	16,67	1,88
20	1	27,08	1,38
	2	68,75	2,80
	3	60,42	2,39
	4	60,42	2,52
	5	64,58	3,60
	6	66,67	3,48
	7	37,50	2,39
	8	25,00	2,00
25	1	29,17	1,43
	2	70,83	2,79
	3	60,42	2,43
	4	60,42	2,55
	5	66,67	3,58
	6	66,67	3,58
	7	37,50	2,39
	8	25,00	2,08

Tabela 17. Porcentagem de enraizamento e número de raízes por gema, obtidos em função do tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone Y-05.

Dias	Tratamentos	% de enraizamento	Número de raízes/gema
5	0,50	0,00	0,00
	5,00	0,00	0,00
	8,22	0,00	0,00
	11,00	0,00	0,00
	14,50	0,00	0,00
	18,00	0,00	0,00
	21,50	0,00	0,00
	25,00	0,00	0,00
10	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
	3	0,00	0,00
	4	2,08	1,00
	5	0,00	0,00
	6	0,00	0,00
	7	0,00	0,00
	8	0,00	0,00
15	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
	3	0,00	0,00
	4	2,08	1,00
	5	0,00	0,00
	6	0,00	0,00
	7	0,00	0,00
	8	0,00	0,00
20	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
	3	0,00	0,00
	4	2,08	1,00
	5	0,00	0,00
	6	0,00	0,00
	7	0,00	0,00
	8	0,00	0,00
25	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
	3	0,00	0,00
	4	2,08	1,00
	5	0,00	0,00
	6	0,00	0,00
	7	0,00	0,00
	8	0,00	0,00

Tabela 18. Porcentagem de enraizamento e número de raízes por gema, obtidos em função do tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone X-02.

Dias	Tratamentos	% de enraizamento	Número de raízes/gema
5	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
	3	0,00	0,00
	4	0,00	0,00
	5	0,00	0,00
	6	0,00	0,00
	7	0,00	0,00
	8	0,00	0,00
10	1	0,00	0,00
	2	8,33	1,00
	3	0,00	0,00
	4	4,17	1,00
	5	2,08	1,00
	6	2,08	1,00
	7	0,00	0,00
	8	0,00	0,00
15	1	0,00	0,00
	2	10,42	1,20
	3	0,00	0,00
	4	8,33	1,00
	5	4,17	1,00
	6	2,08	1,00
	7	0,00	0,00
	8	0,00	0,00
20	1	0,00	0,00
	2	14,48	1,14
	3	2,08	1,00
	4	10,42	1,00
	5	6,25	1,00
	6	2,08	1,00
	7	4,17	1,50
	8	0,00	0,00
25	1	0,00	0,00
	2	14,58	1,14
	3	10,42	1,20
	4	10,42	1,00
	5	6,25	1,00
	6	2,08	1,00
	7	4,17	1,50
	8	0,00	0,00

Tabela 19. Porcentagem de enraizamento e número de raízes por gema, obtidos em função do tratamento aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias de cultura, para o clone X-28.

Dias	Tratamentos	% de enraizamento	Número de raízes/gema
5	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
	3	0,00	0,00
	4	0,00	0,00
	5	0,00	0,00
	6	0,00	0,00
	7	0,00	0,00
	8	0,00	0,00
10	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
	3	0,00	0,00
	4	0,00	0,00
	5	0,00	0,00
	6	2,08	1,00
	7	0,00	0,00
	8	0,00	0,00
15	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
	3	0,00	0,00
	4	0,00	0,00
	5	2,08	1,00
	6	6,25	1,00
	7	0,00	0,00
	8	0,00	0,00
20	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
	3	0,00	0,00
	4	0,00	0,00
	5	2,08	1,00
	6	6,25	1,00
	7	2,08	1,00
	8	8,33	1,50
25	1	0,00	0,00
	2	0,00	0,00
	3	0,00	0,00
	4	0,00	0,00
	5	2,08	1,00
	6	6,25	1,00
	7	2,08	1,00
	8	8,33	1,50