**ADEQUAÇÃO NUTRICIONAL DO MEIO DE CULTURA PARA
CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE GEMAS DE *Eucalyptus saligna*
SMITH *IN VITRO*, PROCEDÊNCIA ITATINGA**

FERNANDO GROSSI

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

Junho - 1995

Dados internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Divisão de Biblioteca e Documentação - CAMPUS "LUIZ DE QUEIROZ"/USP

Grossi, Fernando

Adequação nutricional do meio de cultura para crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus saligna* Smith in vitro, procedência Itatinga. Piracicaba, 1995.

125p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Eucalipto - Cultivo "in vitro" - Itatinga 2. Eucalipto - Desenvolvimento - Itatinga 3. Nutriente em eucalipto - Avaliação - Itatinga
I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 634.9734

**ADEQUAÇÃO NUTRICIONAL DO MEIO DE CULTURA PARA
CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE GEMAS DE *Eucalyptus saligna*
SMITH *IN VITRO*, PROCEDÊNCIA ITATINGA**

FERNANDO GROSSI

Aprovada em 29/08/1995

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

ESALQ/USP

Prof. Dr. Marcílio de Almeida

ESALQ/USP

Dra. Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez

Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

Orientador

A meus pais,
Antonio e Lourdes,
pela possibilidade de chegar até aqui,

DEDICO

A Luciana, minha esposa,
por toda dedicação e amor,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves, pela orientação técnica.

Ao amigo Natal, pela orientação emocional e espiritual nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Hilton Thadeu Zarate do Couto, pelo apoio estatístico e dedicação durante muitos finais de semana e feriados.

Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida, à Dra. Adriana Pinheiro M. Rodriguez, ao Prof. Dr. Fábio Poggiani e Prof. Dr. Mário Ferreira, pelas sugestões valiosas.

Ao Prof. Dr. José Otávio Brito, pelo apoio do setor de Tecnologia da Madeira do LCF/ESALQ.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Estraviz Rodriguez, pelo apoio do CPD do LCF/ESALQ.

À Regina Buch, minha prima, pelo apoio técnico e amizade.

Ao Roberto Romanini, pelo apoio no Laboratório de Fisiologia das Árvores do LCF/ESALQ.

Ao Ricardo, meu primo, pela ajuda e amizade.

Ao Jefferson, pela computação dos dados.

À Maria Alice e Paulinho, pelo apoio na revisão bibliográfica.

Ao amigo José Augusto M. Taveira, pelo apoio fundamental na CLONETECH.

Ao IPEF, pelo fornecimento de sementes.

Ao CNPq, pela concessão das bolsas de aperfeiçoamento e mestrado entre 1988 e 1992.

Ao Instituto Florestal (IF/SMA), pela minha liberação para a conclusão deste trabalho.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	 3
2.1. <i>Eucalyptus saligna</i> SMITH.....	3
2.1.1. Aspectos ecológicos e silviculturais.....	3
2.1.2. Aspectos nutricionais.....	7
2.2. Micropropagação do <i>Eucalyptus</i> (Cultura de Tecidos e Órgãos).....	12
2.2.1. Considerações gerais.....	12
2.2.2. Estabelecimento, Indução e Multiplicação de Gemas.....	13
2.2.3. Alongamento das gemas.....	19
2.3. O Meio de Cultura.....	22
2.3.1. Considerações gerais.....	22
2.3.2. Concentração iônica total.....	25
2.3.3. Composição mineral.....	27
2.3.3.1. Macronutrientes.....	28
2.3.3.1.1. Nitrogênio.....	28
2.3.3.1.2. Fósforo.....	32
2.3.3.1.3. Potássio.....	33
2.3.3.1.4. Cálcio.....	35

2.3.3.1.5. Magnésio.....	36
2.3.3.1.6. Enxofre.....	37
2.3.3.2. Micronutrientes.....	37
2.3.3.2.1. Ferro.....	37
2.3.3.2.2. Cobre.....	38
2.3.3.2.3. Zinco.....	39
2.3.3.2.4. Manganês.....	39
2.3.3.2.5. Cobalto.....	40
2.3.3.2.6. Sódio.....	41
2.3.3.2.7. Boro.....	41
2.3.3.2.8. Molibdênio.....	43
2.3.3.2.9. Cloro.....	44
2.3.3.2.10. Iodo.....	45
2.3.4. Componentes orgânicos.....	47
2.3.4.1. Carboidratos.....	47
2.3.4.2. Reguladores de Crescimento.....	50
2.3.4.3. Aminoácidos.....	53
2.3.4.4. Vitaminas.....	55
2.3.5. Considerações finais.....	57
2.4. Avaliação do crescimento.....	58
2.5. Hiperhidria.....	62
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
3.1. Local da experimentação.....	64
3.2. Condições ambientais.....	64

3.3. Fonte de explantes e desinfecção.....	64
3.3.1. Progênies.....	64
3.3.2. Clone.....	66
3.4. Meios de cultura.....	66
3.5. Experimento I.....	68
3.6. Experimento II.....	71
3.7. Delineamento estatístico.....	72
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 73
4.1. Experimento I.....	73
4.1.1. Produção de matéria fresca (PMF), produção de matéria seca (PMS) e S%.....	 73
4.1.2. Ocorrência de hiperhidria.....	89
4.1.3. Número e tamanho das gemas.....	101
4.1.4. Observações.....	103
4.1.4.1. Senescência e hipertrofia.....	104
4.1.4.2. Formação de calo.....	104
4.1.4.3. Coloração do pecíolo.....	105
4.1. Experimento II.....	106
 5. CONCLUSÕES.....	 111
 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 112

ABREVIATURAS

PMF - produção de matéria fresca
PMS - produção de matéria seca
S% - porcentagem de matéria seca
TM - taxa de multiplicação
TG - tamanho das gemas
NG - número de gemas
Meio - meio de cultura
KIN - cinetina
BA - Benzil adenina
ABA - ácido abscísico
AIA - ácido indol-acético
CW - água de côco
MSA - meio de cultura para *E.saligna*
MSA-1 - Meio MSA modificado
ES - clone adulto de *E.saligna*
TCR - taxa de crescimento relativo
DAP - diâmetro a altura do peito
CA - carvão ativado
JADS - meio de cultura desenvolvido para *Eucalyptus grandis*
PVP - polivinil pirrolidona
2 ip - isopentil adenina
GA (GA₃) - ácido giberélico
AGV - L-a-(2-amino-etoxivinil)-glicina
AIBA - ácido a-amino-isobutírico
N - nitrogênio
P - fósforo
K - potássio
Ca - cálcio
Mg - magnésio
S - enxofre
Cl - cloro
Na - Sódio
B - boro
Cu - cobre
Co - cobalto
Fe - ferro
I - iodo
Mn - manganês
Mo - molibdênio
Zn - zinco

**ADEQUAÇÃO NUTRICIONAL DO MEIO DE CULTURA PARA
CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE GEMAS DE *Eucalyptus saligna*
SMITH *IN VITRO*, PROCEDÊNCIA ITATINGA**

Autor: FERNANDO GROSSI

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da composição de nutrientes minerais e da concentração de sacarose do meio de cultura, no crescimento e desenvolvimento de gemas de *E. saligna* (Smith).

Foram elaborados dois experimentos, utilizando um clone de material adulto e sete clones de progênies provenientes de matrizes do Horto de Itatinga/SP. Na primeira fase, foi comparada a PMF, PMS, S %, NG, TG e indução de hiperhidria de gemas cultivadas no meio de cultura MS e no meio de cultura ajustado para o *E. saligna* (MSA-1). Na segunda fase, foi comparada a PMS, NG, TG e TM de gemas cultivadas no meio de cultura MSA-1, em diferentes concentrações de sacarose (20 - 25 - 30 g/l).

A análise dos resultados permitiu concluir que: as diferenças entre os dois meios de cultura testados (MSA-1 e MS) só foram significativas para as variáveis

PMS e S%, a ocorrência de hiperhidria foi maior no meio MS, o genótipo dos explantes tiveram influência significativa sobre todas as variáveis analisadas, a interação genótipo x meio de cultura só foi significativa para as variáveis PMF x S%, as diferenças entre as concentrações de sacarose só foram significativas para a variável PMS e, que o meio de cultura MSA-1 foi mais adequado do que o MS para o cultivo das gemas de *Eucalyptus saligna* Smith.

NUTRITIONAL ADJUSTING OF THE CULTURE MEDIUM

FOR *Eucalyptus saligna* SMITH (ITATINGA)

SHOOT GROWTH AND DEVELOPMENT *IN VITRO*

Author: FERNANDO GROSSI

Adviser: Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

SUMMARY

The aim of this work was to study the effects of the mineral nutrient composition and the sucrose concentration of the tissue culture medium on the shoot growth and development of *Eucalyptus saligna* Smith.

Two trials were carried out with one clone from adult material and seven selected progeny clones from seeds collected from selected mother trees from the Horto de Itatinga (SP). On the first trial, the fresh (PMF) and the oven dry weights (PMS), the dry weight percentage (S%), the shoot number (NG) and height (TG) and hyperhydration induction were evaluated in shoot cultures on the MS and on the MSA-1, a culture medium adjusted to *E. saligna*. On the second trial, the PMS, NG, TG and multiplication rate (TM) were evaluated in shoot cultures on MSA-1 with different sucrose concentrations (20, 25 and 30 g/l).

The analysis of the results allowed to draw the following conclusions: the PMS and S% obtained on the MSA-1 cultures were significantly superior to those obtained on MS cultures, the PMF, the PMS, the S%, the shoot multiplication rate (TM), NG and TG were significantly affected by the explant genotype, there were significant interactions among genotypes and the tissue culture medium for PMF and S%., the MS medium was significantly more favorable to the hyperhydration induction in relation to the MSA-1, there were no significant differences for TM, NG and TG in relation to the different sucrose concentration (20, 25 and 30 g/l), there was significant difference for the PMS in relation to the different sucrose concentrations, and the MSA-1 culture medium was more adequate than MS to the shoot growth and development of *Eucalyptus saligna* Smith.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, as técnicas de cultura *in vitro* são utilizadas comercialmente com sucesso na propagação de muitas espécies de interesse agrícola, permitindo a produção de milhões de plantas geneticamente idênticas, livres de patógenos. Estas técnicas apresentam grande potencial de aplicação na propagação vegetativa de espécies arbóreas frutíferas, permitindo limpeza, revigoração, reversão à juvenilidade, rejuvenescimento e propagação massal de matrizes de grande valor comercial através da micropropagação e da microenxertia.

No setor florestal, as técnicas de cultivo *in vitro* vem despertando grande interesse nos programas de melhoramento genético, principalmente de *Pinus* e *Eucalyptus*, devido à redução entre o período de seleção e a produção massal de clones geneticamente superiores. Entretanto, apesar do grande potencial para aplicação das técnicas de cultura *in vitro* no setor florestal, ainda existem problemas básicos que limitam sua aplicação com sucesso para todas as espécies e clones. Estes problemas estão relacionados com a falta de conhecimentos adequados sobre a fisiologia destas espécies, e consequente interação entre o ambiente de cultivo e os propágulos ou explantes.

Devido à falta de informações básicas sobre o comportamento das espécies de *Eucalyptus* em diferentes meios de cultura, grande parte dos trabalhos de micropropagação vem utilizando formulações clássicas desenvolvidas para espécies herbáceas, ou diluições destes meios de cultura. Entretanto, muitas vezes estes

procedimentos não são adequados devido ao desequilíbrio nutricional provocado pela diluição de alguns nutrientes a níveis inadequados para a espécie.

Com o objetivo de desenvolver alternativas para as soluções dos problemas de salinidade, causados pelas altas concentrações salinas dos meios de cultura utilizados para espécies herbáceas, foram desenvolvidas algumas formulações mais adequadas e específicas para o cultivo de espécies arbóreas em geral. Entretanto, estas formulações não tem se mostrado adequadas para o cultivo de muitas espécies de *Eucalyptus*, principalmente para a fase de multiplicação de gemas.

Considerando-se a necessidade de adequar a composição dos meios de cultura, para cada espécie ou clone em particular, este trabalho teve por objetivo:

1. Comparar a composição de nutrientes de meios de cultura, para o crescimento e o desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus saligna* Smith.
2. Avaliar o crescimento e o desenvolvimento de gemas de *E. saligna* Smith através da: PMF, PMS, S%, TM, NG, TG e ocorrência de hiperhidria.
3. Determinar a concentração de sacarose mais adequada para TM, NG, TG e PMS de gemas de *E. saligna* Smith.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Eucalyptus saligna* SMITH

2.1.1. Aspectos ecológicos e silviculturais

Eucalyptus saligna Smith é uma das espécies do gênero *Eucalyptus* mais plantada, juntamente com *E. grandis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. robusta* e outras (ALVARENGA, 1961).

Segundo FAO (1979), o complexo *E. saligna*/*E. grandis* é um dos mais plantados em todo o mundo. Na África do Sul, até o início da década de 60, ocupava cerca de dois terços da área total, havendo um maior interesse pelo *E. saligna* (GRUT, 1961).

No Brasil, o *E. saligna* chegou a ocupar 32% das áreas reflorestadas, contra 18% para o *E. alba*, 6% para o *E. citriodora* e 9% para o *E. grandis* (BASTOS, 1961, citado por CÂNDIDO, 1970). Com a evolução dos plantios de *E. grandis*, o *E. saligna* passou a ter interesse secundário (FERREIRA, 1991a).

Atualmente, a espécie voltou a despertar interesse nos programas de melhoramento florestal, principalmente devido aos problemas de brotação apresentado pelo *E. grandis*. Com o *E. urophylla*, é hoje uma das espécies mais plantadas no país (KIKUTI, 1988; RIBEIRO et al., 1990; FERREIRA, 1991a).

O *E. saligna* pertence ao grupo de espécies que formam "lignotuber" vigoroso, possuem grande dominância apical e rápido crescimento em altura (JACOBS,

1961). Comparada ao *E. grandis* apresenta maior capacidade de brotação, maior densidade básica e maior resistência à geadas leves (KIKUTI, 1990; RIBEIRO et al., 1990; FERREIRA, 1991a). Em Portugal, nos plantios realizados nos arboretos de Dango, a porcentagem de falhas aos doze anos foi de 17,3% para o *E. saligna* contra 30,7% para o *E. grandis* (SAMPAIO & FRADE, 1961).

A espécie possui grande capacidade de hibridação com outras espécies. Híbridos entre *E. botryoides* x *E. saligna* são menos exigentes quanto a fertilidade do solo em relação a indivíduos típicos de *E. saligna*. Híbridos entre *E. saligna* e *E. grandis* apresentam maior densidade básica da madeira do que *E. grandis* típico (FERREIRA & KAGEYAMA, 1978; RIBEIRO et al., 1990; FERREIRA, 1991a).

Em inventário recentemente realizado no Estado de São Paulo, verificou-se que a área plantada com *E. saligna* ocupa 143.472,26 ha, sendo a segunda espécie em área plantada. A maior região de plantio é a de Sorocaba (94.516,86 ha). Deste total, 22,8% estão em primeira rotação; 30,6% em segunda rotação; 21,1% em terceira rotação; 11,3% acima de terceira rotação e 0,1% sob regime de alto fuste (KRONKA et al., 1993).

Em relação as características ecológicas, é considerada uma espécie mais exigente que o *E. grandis* quanto a fertilidade do solo. Prefere solos profundos, bem drenados, com níveis mais altos em saturação de bases. Adapta-se melhor em climas mais amenos do tipo temperado, com chuvas bem distribuídas onde raramente ocorre deficit hídrico. No local de origem (Austrália), ocorre entre as latitudes 21° e 36° Sul, desde o nível do mar até aproximadamente 1000 metros, com precipitação uniforme ao sul de Nova Gales do Sul e chuvas de verão ao norte da mesma região. A temperatura média máxima, no mês mais quente, varia entre 28°C e 30°C e a mínima no mês mais frio entre 3°C e 4°C, suportando geadas leves (FAO, 1979). Porém, segundo BARROS et al. (1990), esta amplitude é um pouco maior indo de 24°C a 33°C no mês mais

quente e -2°C a 8°C no mês mais frio, podendo chegar a tolerar até -7°C (MENZIES et al., 1981).

No mapeamento feito por CHIPPENDALE & LUDEK (1981), o *E. saligna* e *E. grandis* ocorrem naturalmente, praticamente nas mesmas regiões. Entretanto, *E. saligna* prefere os locais mais altos, podendo também ocorrer nos vales em regiões onde ocorre queda de neve, sendo mais indicado para sítios frios úmidos e montanhosos (FAO, 1979).

A espécie porém, se adapta a diversas condições, podendo ser indicada para plantio em locais de clima semi-úmido de verão quente e seco com inverno chuvoso e precipitação anual entre 600 e 800 mm, sem temperaturas excessivas e mínima absoluta superior a 3°C, ou em clima úmido com verão ameno (máxima absoluta < 30°C) e precipitação entre 800 e 1500 mm, ou em clima tropical com verão quente e chuvoso (CANDIDO, 1970). Porém, em climas tropicais, esta espécie apresenta baixa resistência ao cancro (RIBEIRO et al., 1990).

Nos países de clima temperado, como a Nova Zelândia e Coréia, o *E. saligna* foi uma das espécie mais plantadas, principalmente nas áreas mais baixas (DIN, 1961). No Brasil, segundo Ferreira (1979), citado por RIBEIRO et al., (1990) a espécie se adapta melhor em climas sub-tropicais e temperados, predominantes na Região Sul do País.

Quanto às características silviculturais, é uma das espécies de maior crescimento na Austrália, chegando a atingir 65m de altura e 2,5m de DAP (RIBEIRO et al., 1990).

É considerada espécie de primeira classe para regime de rotação curta por talhadia, sendo excelente entre latitudes de 25° e 35°, ou locais mais altos em latitudes menores (FAO, 1979).

Na África do Sul, crescendo em região de clima sub-tropical, apresentou menor produção volumétrica em relação ao *E. grandis*, porém a diferença foi menor em região de clima temperado. Entretanto, considerando a madeira efetivamente produzida por hectare, a diferença foi ainda menor devido à maior densidade do *E. saligna* (DARROW, 1983).

A densidade básica da madeira pode apresentar pequenas variações em sítios diferentes, diminuindo nos de maior fertilidade onde o crescimento é mais rápido, e aumentando naqueles de menor fertilidade. Apesar das diferenças, *E. saligna* sempre apresentou maior densidade quando comparado ao *E. grandis*, independente do sítio (ALBINO & TOMAZELLO FILHO, 1984; DARROW, 1983; MIGLIORINI et al., 1988; BALLONI et al., 1980).

No Hawai, o *E. saligna* é provavelmente a espécie de madeira dura que chega a atingir as maiores alturas, produzindo grande quantidade de madeira num período relativamente curto (3 a 5 anos) em diferentes sítios. Quando plantada em solos profundos, bem drenados, pobre em bases, em espaçamento 4 x 4 m chegou a atingir DAP de 27 cm e altura média de 30 m em 10 anos. Em espaçamento 2 x 2 m o DAP foi de 19,3 cm e altura média de 27,43m. Oitenta por cento do crescimento em altura foi atingido nos cinco primeiros anos, chegando a crescer 4,26 m/ano (WALTERS, 1973). Na África do Sul, em solo de primeira qualidade, em espaçamento 2,4 x 2,4 m, o volume de madeira produzido pelo *E. saligna* foi de 395,5 m³/ha aos dez anos. Deste total 24,7% foi produzido nos cinco primeiros anos (GRUT, 1961).

CÁCERES (1983), na Colômbia, obteve resultados mais favoráveis ao *E. saligna* em relação ao *E. grandis* para DAP e área basal, quando avaliados aos nove anos. Em Angola, no planalto Central, apresentou rápido crescimento anual em volume até o início do oitavo ano, quando atingiu 173 m³/ha (AZEVEDO, 1961). Entretanto, a espécie não tolera espaçamento apertado como *E. grandis* (<7,5 m²/planta), podendo

haver um aumento na porcentagem de falhas (BALLONI et al., 1980; RIBEIRO et al., 1990).

No Brasil, a madeira do *E. saligna* é usada principalmente para a produção de celulose e papel (BUSNARDO et al., 1983; CANDIDO, 1970), podendo também ser usada para a fabricação de tacos, lenha e outros produtos (CANDIDO, 1970; GUIMARAES, 1961). Na produção de laminados, as toras apresentam menor problema de rachadura quando comparadas as de *E. grandis*, segundo GAIOTO¹.

AINTABLIAN & DIAS (1988) utilizaram madeira de *E. saligna* aos sete anos, como fonte adicional de matéria prima na fabricação de pasta termo/quimicomecânica, obtendo bons resultados. Porém, CASABONA & REPETTI (1983) não recomenda sua utilização para processos de alto rendimento devido a cor escura, alta densidade e grande quantidade de lignina; sendo mais indicada para o processo Kraft.

2.1.2. Aspectos nutricionais do *E.saligna*

O *E.saligna* é uma espécie mais exigente, nutricionalmente, quando comparada ao *E.grandis*. No quadro apresentado por CARMO et al. (1990), a média do C.U.B. (Coeficiente de Utilização Biológica) do *E.saligna* em relação ao *E.grandis*, indica valores menores para o primeiro em relação ao P e Mg e maiores em relação ao K e Ca. Porém, estes valores podem ter sido influenciados pelas diferenças ecológicas dos locais de plantio.

REIS & BARROS (1990), comparando a quantidade de nutrientes por tonelada de biomassa produzida obteve para *E.grandis* e *E.saligna* os seguintes resultados em kg/ton, respectivamente: N(2,92 x 3,19); P(0,12 x 0,16); K(1,68 x 1,82);

¹ GAIOTTO, M.R. (ESALQ, Depto. Ciências Florestais). Comunicação Pessoal, 1994.

Ca(1,73 x 1,76); Mg(0,77 x 0,78). Coletados em árvores de 8 anos, cultivadas na região de Viçosa, MG.

Comparando os sítios de ocorrência natural, do *E. saligna* e do *E. grandis*, nota-se a preferência do primeiro por solos mais férteis com boa retenção de umidade, mas bem drenados (BARROS et al., 1990) (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação entre os "sites" de ocorrência natural do *E. grandis* e *E. saligna*

Espécie	pH	P	K	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
		ppm		meq / 100 g		
<i>E. saligna</i>	6,0	29,6	320	0,00	9,12	3,04
<i>E. grandis</i>	5,2	2,3	141	1,77	2,95	1,89

Fonte: BARROS et al., 1990.

HAAG (1983) analisou as concentrações dos macronutrientes, em folhas recém maduras de cinco espécies de *Eucalyptus*, cultivadas em dois locais diferentes, obtendo os seguintes resultados para *E. grandis* e *E. saligna* em % respectivamente: K(2,12 x 1,77); P(0,12 x 0,10); N(0,48 x 0,43); Ca(0,39 x 0,29); Mg(0,15 x 0,15); S(0,25 x 0,18). Para os micronutrientes obteve, em ppm: B(23x 26); Cu(6 x 6); Fe(94 x 74); Mn(459 x 398); Zn(36 x 37).

Balloni (s/d), citado por HAAG (1983), observou que nas regiões de cerrado, a espécie menos sensível à deficiência de boro foi *E. saligna*. *E. grandis* e *E. citriodora* foram altamente sensíveis. Talvez esta característica do *E. saligna*, seja devido a maior capacidade de absorção de água desta espécie em condições de déficit hídrico, como observaram Kaul & Negi (1979), citados por BARROS et al. (1990).

CARVALHO et al. (1987) avaliando os efeitos da adubação mineral em *E. saligna*, na presença ou ausência de B, chegaram às seguintes conclusões:

- Adição de P atenuaram os sintomas de deficiência de B
- O B teve efeito significativo no crescimento em altura
- A adição de K na ausência de B apresentou efeito depressivo
- Na ausência de P o acréscimo de N resultou em redução do volume
- A adição de K só apresentou efeito positivo na presença de B
- Teores de B solúvel em água menores que 0,45 ppm são inadequados ao crescimento do *E. saligna*. Os níveis ideais estão entre 0,45 e 0,75 ppm
- Os teores de B nas folhas com sintoma de deficiência ficaram entre 24 e 30 ppm
- A adição de N, K e B resultaram em menor concentração de Ca nas folhas
- O acréscimo de B reduziu os níveis de Mn nas folhas
- A aplicação de K aumentou os níveis de Fe nas folhas. E a adição de B sem K, reduziu
- Adição de K aumentou a concentração de Zn nas folhas. A adição de P diminuiu
- A adição de K aumentou os níveis de Cu nas folhas somente na ausência de B. A adição de P reduziu.

FERREIRA & DA CRUZ (1991) apresentam uma comparação entre o índice de eficiência de utilização de micronutrientes para a produção de tronco (lenho + casca) em cinco espécies de *Eucalyptus*, obtendo os seguintes resultados (kg de biomassa/kg de nutriente) para *E. grandis* e *E. saligna*, respectivamente: Cu (459,000 x 230,250); Fe (52,46 x 34,111); Mn (2,23 x 2,30); Zn (306,000 x 263,142).

TEIXEIRA (1987), fazendo uma comparação da influência topográfica e química do solo, entre *E. saligna* e *E. citriodora*, observou que o primeiro foi mais eficiente na utilização de Ca e Mg para a produção de tronco. As concentrações de N, P, K e Ca nas folhas e a eficiência de conversão foram maiores no *E. saligna*, ocorrendo o inverso no caso do Mg. O coeficiente de utilização de P foi menor para o *E. saligna*. Porém, o autor observa que no solo onde foi plantado *E. citriodora*, a quantidade total de nutrientes era bem superior aos locais onde foi plantado *E. saligna*. A maior produção de Biomassa para o *E. saligna*, ocorreu no topo dos morros e a maior concentração de nutrientes nas folhas, ocorreu nas baixadas. Não houve diferença significativa nas quantidades de K nas folhas, embora os teores deste elemento nos locais de baixada fossem bem superiores. As relações K/Ca/Mg no solo, foram as seguintes: 1/5,2/1 (baixada); 1/6,3/1 (meia encosta); 2,9/3,0/1,0 (topo).

MIYASAKA et al. (1987) utilizaram árvores superiores de *E. saligna* para obter valores-padrão para computação dos índices da DRIS (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores padrão usado na computação dos índices DRIS para *E.saligna* aos 24 meses.

Elemento	Valor Médio %	Mínimo %	Máximo %
N	1,22	1,03	1,52
P	0,14	0,12	0,16
K	1,09	0,95	1,28
Ca	0,57	0,51	0,67
Mg	0,27	0,22	0,33
S	0,12	0,10	0,15
RELAÇÕES			
N/P	8,72	7,93	10,13
N/K	1,13	0,87	1,55
N/Ca	2,13	1,85	2,57
N/Mg	4,56	3,36	6,08
N/S	9,55	8,46	11,69
P/K	0,12	0,10	0,15
P/Ca	0,24	0,21	0,29
P/Mg	0,52	0,39	0,68
P/S	1,09	1,00	1,20
K/Ca	1,90	1,66	2,28
K/Mg	4,01	3,57	4,31
K/S	8,60	6,86	10,08
Ca/Mg	2,12	1,76	2,44
Ca/S	4,51	3,92	5,40
Mg/S	2,15	1,66	2,60

Obs: Os dados são baseados na % de matéria seca

Fonte: MIYASAKA et al., 1987.

2.2. Micropropagação do *Eucalyptus* (cultura de tecidos e órgãos)

2.2.1. Considerações gerais

Nos últimos trinta anos, muitas espécies de *Eucalyptus* têm sido propagadas por diferentes métodos de micropropagação, tanto pelos de morfogênese direta (cultura de gemas apicais e axilares) como pelos de morfogênese indireta (cultura de calo ou células).

Os trabalhos iniciais concentravam-se na obtenção de calo a partir de "seedlings" e regeneração de órgãos a partir destes calos. Porém, trabalhos mais recentes tem procurado usar segmentos nodais de "seedlings" e material adulto rejuvenescido, induzir a multiplicação das gemas e estimular o enraizamento destas gemas acima dos níveis obtidos com a estaquia (BONGA & DURZAN, 1985; BAJAJ, 1986; HARTNEY, 1980). A micropropagação de material proveniente de "seedlings", segundo FURZE & CRESSWELL (1985) pode ser vantajosa nos programas de melhoramento pelo fato de permitir a produção de genótipos selecionados em grande escala em um ou dois anos, contra 4 ou 5 anos pelos métodos tradicionais e pela possibilidade de obter novos genótipos.

Segundo MAC COMB & BENNETT (1986); HARTNEY (1980) e CRESSWELL et al. (1985), o objetivo principal da micropropagação do *Eucalyptus*, é a obtenção de clones de híbridos com maiores taxas de crescimento, resistentes a geadas, tolerantes a estresse salino e resistentes a pragas e doenças.

Embora a micropropagação seja viável através da cultura de meristemas e gemas axilares, a organogênese e a embriogênese somática, a partir de cultura de calo, foi pouco estudada (BONGA & DURZAN, 1987).

A regeneração de plantas ou órgãos, a partir de calo de *Eucalyptus* selecionados, não foram relatados até 1981, quando foi induzido calo sobre embriões

zigóticos excisados de "seedlings" de árvores selecionadas de *E. leichow*. Milhares de "embrióides", formados a partir destes calos, desenvolveram-se de forma homogênea (CRESSWELL et al., 1985). A regeneração de brotos, a partir da cultura de calos e suspensão celular, é necessária para a aplicação da seleção *in vitro*, variação somaclonal e técnicas de engenharia genética (SUBBAIAH & MINOCHA, 1990).

Apesar da possibilidade de multiplicação, a partir da cultura de calo, o número de espécies de *Eucalyptus* que tem sido propagadas pela cultura de órgãos (folha, raiz, segmentos nodais, etc), tem aumentado ano a ano, possibilitando altas taxas de multiplicação. Experimentos preliminares realizados na década de 70, não apresentaram muito sucesso devido a problemas de contaminação com material adulto. Entretanto, os progressos atuais obtidos com a cultura de órgãos, a partir de "seedlings" de muitas espécies, tem possibilitado a obtenção de clones resistentes ao frio (CRESSWELL et al., 1985).

A cultura de segmentos nodais, onde os brotos se desenvolvem a partir de gemas axilares ou acessórias, apesar de apresentar muitos problemas de contaminação, possui a vantagem de ser mais favorável ao enraizamento para algumas espécies, como *E. grandis* (CRESSWELL et al., 1985). Além de apresentar grande potencial para contornar os problemas de plagiotropismo que ocorrem nos métodos tradicionais de propagação vegetativa (DE FOSSARD, 1974a; CRESSWELL & DE FOSSARD, 1974). Gemas cultivadas a partir de "seedlings" parecem formar plantas com crescimento ortotrópico independente de serem laterais ou apicais. Porém, plântulas formadas a partir da copa de árvores adultas de *E. marginata* cresceram plagiotropicamente no início, mas ao atingirem um metro e meio de comprimento reassumiram um crescimento ortotrópico (MAC COMB & WROTH, 1986).

2.2.2. Estabelecimento, Indução e Multiplicação de Gemas

PINEDO et al. (1990) utilizaram o meio de cultura MS como meio básico para a micropropagação de segmentos nodais de *E. citriodora* e *E. tereticornis*, mais 2%

de sacarose e 0,8% de agar. Foram testadas, diferentes combinações de BA (0,1 mg ou 0,25 mg) e AIA (0,01 ou 0,1 mg/l). Para o *E. citriodora*, não houve diferença entre os tratamentos e a testemunha (sem reguladores), talvez devido as baixas doses de BA que foram utilizadas no experimento. Na indução de brotações, *E. tereticornis* mostrou diferenças significativas entre a testemunha e os tratamentos sendo ambos superiores aos resultados obtidos com o *E. citriodora*. O melhor resultado foi obtido com 0,25 mg/l de BA e 0,01 mg/l de AIA. Na fase de multiplicação, aos 30 dias, *E. citriodora* apresentou melhor resultado no meio com 0,5 mg/l de BA e 0,1 mg/l de AIA (6,0/ broto). Porém aos 60 dias, o melhor resultado (24,0/broto) foi obtido com 1,0 mg/l BA e 0,1 mg/l de AIA. Acima de 2,0 mg/l de BA foi prejudicial tanto aos 30 como 60 dias. Para *E. tereticornis*, o melhor resultado foi obtido com 0,5 mg/l de BA, independente da presença de AIA. Porém esta taxa foi baixa (2,62/explante).

GUPTA et al. (1981) trabalhando com *E. citriodora*, utilizaram, na fase de indução, meio de cultura MS + 2% de sacarose + 0,1 mg/l de pantotenato de cálcio e 0,1 mg/l de biotina + 0,2 mg/l de KIN. Porém, os resultados não foram apresentados. Em outro trabalho, com material adulto de *E. citriodora*, *E. camaldulensis*, *E. globosus* e *E. torelliana*, GUPTA & MASCARENHAS (1988), utilizaram o mesmo meio de indução utilizado para *E. citriodora* em trabalho anterior com material juvenil. Para as outras espécies, utilizaram o mesmo meio acrescido de 0,3 mg/l de BA. A indução de gemas, ocorreu entre 30 e 35 dias em 40% dos explantes. E, quando transferidas para meio fresco de igual constituição, produziram de 5 a 8 gemas.

WARRAG et al. (1991) utilizaram meio de cultura MS para indução de gemas, em segmentos nodais de *E. grandis*. Foram produzidas de 5 a 12 gemas em 6 semanas. Na fase de multiplicação, utilizaram várias combinações de BA e ANA. O melhor resultado foi obtido com 0,6 mg/l de BA, na ausência de ANA. Quando a concentração de BA subiu para 1,0 mg/l, o número de gemas produzidas caiu 40%.

DAS & MITRA (1990), utilizaram meio de cultura MS com redução na concentração de cloreto de cálcio para 146 mg/l, 2,5 mg/l de tiamina-HCl e 2,5 mg/l de Piridoxina HCl como meio básico, mais 3% de sacarose e 0,7% agar, para as fases de indução e multiplicação de segmentos nodais de *E. tereticornis*. Quando foram utilizados BA e ANA na combinação de 1,0 mg/l cada um, obteve-se a maior taxa de indução de gemas (18-22). Entretanto, as gemas não se diferenciaram, o que dificultou a manipulação posterior. O melhor resultado, foi obtido na combinação de 0,5 mg/l de BA e 0,1 mg/l de ANA onde se obteve uma taxa menor de multiplicação (14-16) mas com gemas diferenciadas. Taxa esta, bem maior que nos trabalhos citados anteriormente com a mesma espécie. Houve também, formação de gemas com morfologia diferente, dependendo das concentrações de ANA e BA, e formação de calo na base dos explantes com aumento das concentrações de ANA. MAC COMB (1986a), trabalhando com a micropropagação do eucalipto, também menciona o efeito hormonal sobre a morfologia das folhas na cultura de gemas, as quais podem apresentar-se mais lanceoladas ou orbiculares que os progenitores, dependendo do nível de citocinina utilizado.

CHANG et al. (1992) utilizaram como meio básico 1/2 da concentração dos macronutrientes do meio de cultura MS, micronutrientes e compostos orgânicos do MS completo e 0,4 mg/l de tiamina HCl, para cultura de segmentos nodais de *E. radiata*. A utilização de BA, somente, produziu menos brotos do que em combinação com ANA. Quando se utilizou KIN, como fonte de citocinina, houve oxidação dos explantes cujo efeito foi revertido com a transferência dos explantes para o meio com BA e ANA. A KIN também não apresentou bons resultados para outras espécies (SITA & SHOBHA RANI, 1985; RAO, 1988). Foram obtidos de 50 a 70 brotos a partir de um segmento nodal, em três meses de cultivo.

CRESSWELL et al. (1985), trabalhando com *E. grandis*, sugerem os sais do meio de cultura MS, vitaminas de De Fossard (1978), 0,1 mg/l de BA e 0,1 mg/l de ANA para a multiplicação do *E. grandis*, sendo que, para materiais muito jovens, talvez

nem seja necessária a presença de citocinina. Quando o material foi subcultivado por diversas vezes neste mesmo meio, os tecidos tornaram-se translúcidos com caules e folhas frágeis. As folhas tornaram-se pequenas com morfologia cotiledonar, cor púrpura na página inferior e internódios curtos. Porém, quando a concentração de BA foi reduzida ocorreu queda na taxa de multiplicação, mas houve maior estabilidade fisiológica do material. Com subcultivos mensais obteve-se uma taxa de multiplicação superior a 10, considerando-se apenas as "colônias" de gemas. Considerando cada gema individualmente, a taxa de multiplicação chegou a 30.

RAO (1988), trabalhando com segmentos nodais de *E. tereticornis*, utilizou como meio básico o MS, 2% de sacarose e 800 mg/l de PVP, para estabelecimento da cultura. A utilização de KIN + ANA resultou em oxidação dos explantes, enquanto que a associação de AIA e KIN ou AIA e 2ip resultou na formação de calo e brotos cloróticos. A melhor combinação na fase de indução de gemas, entre BA e ANA, produziu de 4 a 5 gemas primárias por explante. Na fase de multiplicação, as gemas induzidas foram transferidas para o meio de cultura MS com menor concentração de BA e ANA. O subcultivo neste mesmo meio, manteve constante a taxa de multiplicação.

Para a cultura de segmentos nodais de *E. grandis*, SITA & SHOBA RANI (1985) utilizaram como meio básico o MS com 2% de sacarose, 800 mg/l de PVP, 4 mg/l de tiamina e 0,8% de agar. Na fase de multiplicação a combinação de KIN e ANA resultou em oxidação e inibição do crescimento das gemas. A transferência destas gemas para o meio contendo BA e ANA, recuperou o aspecto saudável.

MEHRA-PALTA (1982) testou várias combinações de reguladores de crescimento para cultura de segmentos nodais de *E. nova-angelica* e *E. viminalis*, tendo como meio básico o GD (GRESSHOFF and DOY). Na fase de multiplicação, o melhor resultado foi obtido com o meio GD + 1 mg/l de Zeatina + 0,01 mg/l de AIB. Obteve-se uma média de 5 gemas, a partir da gema inicial, entre 3 e 4 semanas de cultivo. A

transferência neste mesmo meio, por nove vezes não resultou em alteração na taxa de multiplicação.

RAO & VENKATESWARA (1985) utilizaram o mesmo meio básico para a fase de indução e multiplicação de gemas de *E. grandis*. O meio foi o MS mais 4 mg/l de tiamina, 2% de sacarose e 800 mg/l de PVP. O melhor resultado foi obtido com 100 μ M de BA + 50 μ M de ANA, produzindo de 8 a 10 brotos por segmento nodal. Nesta combinação, a formação de calo foi mínima.

CHENG et al. (1992) trabalharam com segmentos nodais de *E. sideroxylon* e utilizaram para a fase de indução sais do MS reduzidos pela metade, mais vitaminas do meio B-5, 2% de sacarose e 0,6% de "phitigel". As culturas foram mantidas a 25°C $\pm$ 1°C sob fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro) à 100 μ E/m²/s. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem.

LE ROUX & STADEN (1991) utilizaram para o *E. macarthurii*, *E. smithii* e *E. saligna*, meio MS mais 1 g/l de PVP + 20 g/l de sacarose, 0,1 mg/l de BA e "gelryght" como agente gelificante, na fase de indução de gemas. Na fase de multiplicação de gemas, o meio MS foi modificado com 0,1 mg/l de pantotenato de cálcio mais 0,1 mg/l de biotina, 0,1 mg/l de meso-inositol. O melhor resultado foi obtido com 0,2 mg/l de BA e 0,01 mg/l de ANA. Porém, houve vitrificação ao longo dos subcultivos.

Em trabalho realizado com *E. gunnii*, foi utilizado na fase de multiplicação de gemas, o meio de De Fossard (1974) mais BA. Porém, não foram fornecidos maiores detalhes, pois o objetivo maior estava voltada para a fase de enraizamento (CURIR, 1992).

BENNETT & MAC COMB (1982) compararam diferentes meios na fase de indução de gemas de *E. marginata*. No meio de De Fossard et al. (1977), mais 2,5

$\mu\text{M/l}$ de BA e $2,5 \mu\text{M/l}$ de ANA os brotos deterioraram após 3 semanas de cultivo. O melhor resultado foi obtido no MS com 60 mM/l de sacarose e 10 g/l de agar, em pH 5,8 nas mesmas concentrações hormonais.

FANTINI & GRAÇA (1990) adotaram os sais do meio MS mais 2% de sacarose, 0,5% de agar e vitaminas do B-5, para fase de indução e multiplicação de segmentos nodais de *E. saligna*. Para a multiplicação de gemas, foram testadas combinações de AIB e BA no mesmo meio básico, sendo que o melhor resultado foi obtido na ausência de AIB com $0,1 \text{ mg/l}$ de BA. Concentrações elevadas de BA ($1,0 \text{ mg/l}$), produziram gemas compactas, pouco desenvolvidas e formação de calosidade nas folhas.

WIECHETECH (1990) utilizou segmentos nodais de material juvenil de *E. viminalis*, cultivado em meio básico MS com 2% sacaroses, 0,8% de agar e vitaminas de GAMBORG & WETTER (1975). Os melhores resultados foram obtidos com $0,2 \text{ mg/l}$ de BA + $0,5$ ou $1,0 \text{ mg/l}$ de ANA, obtendo-se 5 brotações/ explante. Quando se utilizou ANA, abaixo de $0,5 \text{ mg/l}$ ou BA acima de $0,2 \text{ mg/l}$ o número de brotações diminuiu. O fato do ANA acima de $0,5 \text{ mg/l}$, ter favorecido a indução de gemas se deveu ao fato de permitir uma maior diferenciação das gemas, permitindo que estas tenham sido contadas. O efeito contrário, foi obtido com BA acima de $0,2 \text{ mg/l}$. A avaliação foi feita após 8 semanas de cultivo e foram contadas apenas gemas acima de $0,5 \text{ cm}$. No segundo subcultivo, as concentrações de BA foram mantidas constantes e as de ANA foram alteradas. O melhor resultado foi obtido com $0,1 \text{ mg/l}$ de BA e $0,5 \text{ mg/l}$ de ANA resultando uma média de 6,2 brotações/explante. Porém, o *E. viminalis* é uma espécie que apresenta taxa de multiplicação baixa, quando comparada com outras espécies.

CORREIA (1993) realizou diversos experimentos para avaliar a produção de matéria fresca (PMF) e matéria seca (PMS) em clones de *E. grandis* e híbridos. No

experimento I, com clones de *E. grandis*, foi obtida maior PMF, PMS no meio de cultura JADS (1989) líquido, em relação ao meio solidificado com ágar. Fato atribuído pela autora a maior facilidade de difusão dos elementos no meio líquido. Entretanto, ocorreu a formação de tecido vítreo, atribuído a maior absorção de BA e consequentemente estímulo do metabolismo do nitrogênio, levando a formação endógena de AIA e etileno. No meio sólido, foram observados sintomas de deficiência aos 28 dias de cultura, ocorrendo amarelecimento e queda das folhas. No experimento II foram avaliadas a PMF e PMS de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* no mesmo meio de cultura. Ao contrário do primeiro experimento, a PMF e PMS foi maior no meio sólido. Fato atribuído a menor exigência nutricional dos híbridos.

2.2.3. Alongamento de gemas

Na micropropagação de plantas herbáceas, esta fase normalmente ocorre juntamente com a fase de multiplicação e por isso raramente é mencionada (GROSSI²). Entretanto, para a maior parte das espécies arbóreas esta fase é indispensável para que ocorra um bom enraizamento (CORREIA, 1993).

MEHRA-PALTA (1982) reduziu pela metade a concentração do meio básico GD e acrescentou 1 % de carvão e 0,25% de sacarose para o alongamento das gemas de *E. nova-angelica* e *E. viminalis*, obtendo 78% dos brotos com mais de 5 cm.

CRESSWELL et al. (1985) obtiveram excelente alongamento das gemas de eucalipto, as quais atingiram de 3 a 4 cm, no meio com sais do MS e vitaminas de DE FOSSARD (1978). SITA & SHOBNA RANI (1985) utilizaram para o alongamento de gemas de *E. grandis*, o meio básico MS mais 2 % de sacarose, 800 mg/l de PVP, 4 mg/l de tiamina e 0,8% de ágar na presença de GA3. RAO & VENKATESWARA (1985), trabalhando com *E. grandis*, obtiveram brotos de 0,8 a 1,3 cm, em seis semanas,

² GROSSI, F. (Laboratório de Fisiologia das Árvores-ESALQ). Testes preliminares, 1993.

quando utilizaram o meio MS com 2% de sacarose e 4 mg/l de tiamina, na presença de GA3.

GUPTA & MASCARENHAS (1988), não precisaram de condições especiais para o alongamento das gemas de *E. citriodora*, cultivado no meio MS sólido com 0,2 mg/l de KIN, 0,3 mg/l de BA, 0,1 mg/l de pantotenato de cálcio e 0,1 mg/l de biotina. Entretanto, *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. torelliana* e *E. tereticornis* necessitaram de níveis mais reduzidos de KIN (0,05 mg/l) e BA (0,1 mg/l), no mesmo meio básico. RAO (1988) obteve indução e alongamento das gemas de *E. tereticornis*, simultaneamente, quando acrescentou 1,1 μ M/l de AIA ao meio de indução MS mais 2% de sacarose, 800 mg/l de PVP, 5,3 μ M/l de ANA e 4,4 μ M/l de BA.

FANTINI & GRAÇA (1990) testaram, para *E. saligna*, o meio MS completo e metade da concentração usual. O meio MS completo, produziu gemas mais longas e folhas com melhor morfologia que a meia concentração. Porém, ocorreu grande interação entre meio de cultura e os reguladores de crescimento. No MS x 1/2 as gemas mais longas foram obtidas quando a relação BA/AIB foi igual a 1/5. Na relação de BA/AIB (5/1), inversa à anterior, as gemas alongaram mais quando se utilizou o MS completo.

PINEDO et al. (1990) observaram que não houve necessidade de fase de alongamento para o *E. citriodora*, quando cultivado no MS mais 2% sacarose, 0,8% de agar, 1,0 mg/l de BA e 0,1 mg/l de AIA, em pH 5,8. Porém, para o *E. tereticornis* pré-cultivado no mesmo meio básico, com 0,1 mg/l de BA e 0,1 mg/l de ANA, foi necessária a transferência das gemas para o meio básico com 0,1 mg/l de GA3, sem a presença de C.A. Porém, as gemas apresentaram estiolamento. A combinação de GA3 e C.A. resultou em morte das gemas.

WIECHETECH (1990) fez comparações entre os meios de cultura MS x MSx1/2 com ou sem suplementação de N-NH₄ (20,61 mmol/l) para o alongamento do

E. viminalis, na ausência ou presença de luz. Os resultados mostraram que a suplementação com $N-NH_4$ foi muito favorável para os explantes cultivados no MS completo. Quando houve suplementação com N, as gemas alongaram 0,56 cm a mais que no meio sem N suplementar, atingindo 1,30 cm após 4 semanas. Porém, no MS x 1/2 a suplementação com $N-NH_4$ foi prejudicial. Apesar do efeito positivo apresentado pela suplementação com $N-NH_4$ no meio MS completo, as gemas não atingiram o tamanho adequado para passarem para a fase de enraizamento.

WARRAG et al. (1990) mantiveram as gemas de *E. grandis* no escuro, por dois dias no meio básico utilizado na fase de multiplicação acrescido de AIB e Zeatina. O melhor resultado foi obtido com a combinação de 2,5 mg/l de AIB e 1,0 mg/l de Zeatina produzindo uma média de 27 brotos acima de 1,5 cm, por tufo.

DAS & MITRA (1990), utilizaram o MS + 0,01 mg/l de ANA + 0,1 mg/l de BA + 1,0 mg/l de GA e 0,2% de C.A. e obtiveram de 7 a 10 gemas alongadas de *E. tereticornis* por explante após o terceiro subcultivo.

CHANG et al. (1992), obtiveram alongamento das gemas de *E. radiata*, em meio MS, com metade da concentração de macroelementos + 0,4 mg/l de tiamina, quando a concentração de BA foi reduzida para 0,1 mg/l e a de ANA foi elevada para 0,1 mg/l. LUBRANO (1992) obteve com a mesma espécie gemas de 2 a 3 cm quando os explantes foram mantidos no escuro com 0,05 mg/l de BA no meio básico MS modificado.

CORREIA (1993) em seu trabalho com meio de cultura bifásico, observou que o acréscimo de meio de cultura líquido proporcionou uniformidade no tamanho das gemas. Foram consideradas apenas gemas de comprimento entre 0,5 cm e 4,0 cm. Ficaram evidentes os efeitos da composição genética do material, no alongamento das gemas.

2.3. O meio de cultura

2.3.1. Considerações gerais

A composição química adequada, de um meio de cultura é um dos aspectos mais importantes na micropropagação em geral, pelo fato de influenciar diretamente no processo de morfogênese, e também por ser o fator de mais fácil manipulação no processo de micropropagação. A escolha do meio de cultura, mais adequado para determinada técnica e fase da micropropagação, irá influir diretamente na otimização da micropropagação de um determinado genótipo (GEORGE, 1984; GEORGE et al., 1987; TEASDALE, 1987).

Os componentes do meio de cultura podem ser divididos em: 1) macronutrientes; 2) micronutrientes; 3) vitaminas; 4) aminoácidos; 5) açúcares; 6) ácidos orgânicos, sais de ácidos orgânicos e os chamados "Tampões"; 7) reguladores de crescimento; 8) agente gelificante (no caso de meio sólido); 9) suplementos indefinidos. Porém, para efeito de composição básica são considerados apenas os itens de 1 a 5 (GEORGE, 1984; GEORGE et al., 1987).

Uma ampla formulação de meios para a cultura de plantas arbóreas, tem aparecido na literatura. Porém, se todas as diferenças nas formulações tem significado biológico não se sabe. Aproximadamente onze meios de cultura diferentes são comumente usados para espécies arbóreas, ou derivações a partir de formulações padrão. Estes meios, são: Litvay (1981); MS (1962); Anderson (1975); Quoirin-Lepoivre (1977); Durzan (1973); Gamborg - B5 (1968); WPM (Lloyd and McCown, 1981); Gresshoff-Doy (GD, 1982); Zimmerman (1980); SCR (1985) e White (1943), dispostos em ordem decrescente em relação à concentração iônica total (MCCOWN & SELLMER, 1987).

Embora, a composição dos macroelementos do meio MS tenha sido desenvolvida para a cultura de calo de tabaco, tem sido utilizada satisfatoriamente para a cultura de tecidos de muitas outras plantas, ou servido de base para a formulação de outros meios (GEORGE, 1984). É, sem dúvida, o meio mais amplamente utilizado na micropropagação de diferentes espécies.

O meio de cultura revisado por Murashige e Skoog em 1962, resultou em 40 mM de NO_3^- e 20 mM de NH_4^+ , quantidade esta 5, 15 e 19 vezes maior que o N-total utilizado nos primeiros meios de cultura, respectivamente, Miller et al. (1956), Hildebrandt et al. (1946) e White (1943). O nível de K foi elevado, aproximadamente 11 vezes e o de P 13 vezes em relação aos níveis utilizados em 1956 por MURASHIGE e SKOOG, atingindo 20 mM e 1,25 mM, respectivamente. Os níveis dos outros macronutrientes também foram elevados, mas por fatores menores, os quais serão detalhados posteriormente. Este meio revisado, aumentou 167% o peso seco dos calos de tabaco em relação ao meio de Hildebrandt et al. (1946) (MURASHIGE & SKOOG, 1962).

Posteriormente, observou-se que para algumas situações era necessário modificar as fórmulas dos sais de MS e aumentar a concentração de fosfato pela adição de 170 mg/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Em alguns casos, níveis acima de 340 mg/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ tem se mostrado benéficos (SIGMA, 1990).

O meio B5, foi desenvolvido por Gamborg et al. (1968) para a cultura de suspensão celular de soja e foi melhorado em investigações subsequentes. Este meio, difere do meio de cultura utilizado em 1966 principalmente pelos altos níveis de NO_3^- e K (24,7 mM para ambos). A concentração de NH_4^+ , no meio B5, é baixa e semelhante a utilizada em 1966 (2,02 mM), porque as células de soja não suportam níveis acima de 2 mM. Foram testadas variações na concentração de Ca e Mg, de 1 - 4 mM e 0,5 a 3 mM, respectivamente, sem alteração na produção de matéria seca. Foi então adotado 1 mM para ambos. O nível de 1 mM de P foi o mais adequado

(GEORGE, 1984). Em relação ao meio MS, os níveis de NH_4^+ e NO_3^- são 10 e 1,6 vezes menores, respectivamente. A concentração de K é 1,2 vezes maior e a de P praticamente a mesma. Para os íons Ca e Mg, as concentrações são, aproximadamente, 3 e 15 vezes menores, respectivamente. A concentração de S é 1,2 vezes superior ao do meio MS.

O meio WPM, de LOYD e MCCOWN (1981), tem como característica principal a baixa concentração iônica total, quando comparado ao MS; fato este consistente com outros meios usados para espécies arbóreas. Porém, o nível de S está acima das concentrações médias normalmente utilizadas (7,44 mM). Em relação ao meio MS, os níveis de NH_4^+ e NO_3^- são, aproximadamente 4 vezes menores, e o de K, 1,5 vez menor. A concentração de P foi mantida a mesma, assim como os níveis de Ca e Mg. No meio WPM, não é utilizado Co nem I (MCCOWN & SELLMER, 1987).

O meio de Durzan et al. (1973), foi desenvolvido a partir de modificações no MS para a cultura de células de couve-de-Bruxelas. Houve uma redução nos níveis de NO_3^- e K de 1,3 e 7 vezes, respectivamente. O nível de Ca foi elevado 1,4, e os de S e Mg foram mantidos iguais, assim como o nível de P. Neste meio, não foi incorporado Na nem Cl (GEORGE, 1984).

O meio de White (1943), foi desenvolvido para a cultura de segmentos isolados de raiz. Porém, tem se mostrado eficiente para a indução de raiz em gemas de espécies arbóreas. Tem como característica, a mais baixa concentração iônica total em relação aos anteriormente citados, especialmente em K e NO_3^+ . Não possui NH_4^+ e nem qualquer fonte de Co, Cu e Mo (MCCOWN & SELLMER, 1987).

Embora os níveis de macronutrientes do meio MS sejam um bom ponto de partida para desenvolvimento de novos meios de cultura, soluções mais diluídas tem apresentado melhores resultados em algumas circunstâncias. Muitos trabalhos têm

mostrado que pode haver formação de precipitados no meio MS, que não são identificados na presença de agar. Estes precipitados, são formados principalmente por fosfatos e ferro, com menores quantidades de Ca, K, N, Zr, Mn e traços de C, Mg, H, Si, Mo, S, Cu e Co. Após 7 dias, acima de 50% de ferro e 13% de fósforo são removidos da solução (GEORGE, 1984). Alguns trabalhos recomendam a manutenção do pH em torno de 5,3 ou abaixo, quando possível, para evitar a formação de precipitados. Outros recomendam a redução em 1/3 nos níveis de ferro do MS original (GEORGE, 1984). Porém, em trabalhos realizados com *Eucalyptus saligna* a redução nos níveis de ferro resultou em sintomas de deficiência nutricional (GROSSI³). Ao contrário dessas recomendações o meio de cultura JADS, utilizado por CORREIA (1993), com o dobro dos níveis de fósforo e ferro do MS tem resultado em excelente desenvolvimento de clones de *Eucalyptus grandis* e seus híbridos.

Muitos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de se obter novos meios de cultura à partir de modificações empíricas de poucas formulações básicas. Porém, as necessidades das plantas variam amplamente entre os genótipos e sistemas de cultivo, não sendo ainda possível prever as necessidades minerais de espécies não testadas. Outras questões importantes devem ser melhor compreendidas, como: quanto do meio esta disponível para o explante, quanto é utilizável e, até que ponto a absorção e assimilação dos elementos pelo explante depende do suprimento ou do sistema de transporte e como a disponibilidade dos elementos muda ao longo do período de cultivo (WILLIAMS, 1993, BUTENKO, 1964).

2.3.2. Concentração iônica total

Tornou-se evidente, ao longo dos anos, que a cultura de gemas de grande parte das espécies arbóreas não se desenvolve adequadamente nas formulações

³ GROSSI, F. (Laboratório de Fisiologia das Árvores-ESALQ). Testes preliminares, 1993.

desenvolvidas para plantas herbáceas. Uma das principais razões é a alta concentração salina destes meios (MCCOWN & SELLMER, 1987).

Para a micropropagação do *Eucalyptus*, os meios mais utilizados têm sido o MS completo ou em concentração reduzida; White (1943), De Fossard (1974), B-5 completo ou diluído, entre outros.

Muitos trabalhos têm indicado que as culturas de espécies arbóreas devem ser iniciadas em meios de menor concentração para depois determinar a quantidade mais adequada de cada elemento pois, em baixas concentrações raramente os efeitos são inibitórios (MCCOWN & SELLMER, 1987; GEORGE, 1984). Um dos processos que pode ser prejudicado pela alta concentração iônica é o de absorção dos íons pelos explantes (MENGEL & KIRKBY, 1987). Principalmente o processo de absorção passiva (GEORGE et al., 1988).

Apesar de grande parte dos trabalhos, utilizando espécies arbóreas, apresentarem melhores resultados em meios de cultura menos concentrados, outros trabalhos contradizem estes resultados. TREMBLY et al. (1986) testaram os meios de Blaydes (1966), MS, WPM e B5 para o crescimento de *Alnus glutinosa* e *A. crispa* e constataram que o meio mais concentrado (MS) apresentou resultados iguais ou superiores para ambas as espécies. Este resultado, porém, deve ser avaliado também com relação à influência do explante no processo, pois, tecidos juvenis toleraram altas concentrações dos macronutrientes melhor que tecidos adultos.

Em outro trabalho com *A. glutinosa*, o meio Heller (1953) apresentou melhores resultados que o MS (EVERS, 1988). SITA & SHOBHA RANI (1986), também obtiveram melhores resultados com meios mais diluídos na cultura de *Santalum album*.

Em geral, segundo VON ARNOLD & ERIKSSON (1986), o cultivo de tecidos organizados requer meio de cultura mais diluído, em relação a tecidos não organizados. Entretanto, pode ser vantajoso modificar a composição do meio de cultura durante as diferentes fases de desenvolvimento, pois as condições que são ótimas para a divisão podem não ser para o desenvolvimento e crescimento das gemas (KARNOSKY & MICKLER, 1986).

Na escolha da composição mineral e orgânica do meio de cultura, os nutrientes para diferenciação e crescimento dos explantes devem estar presentes em quantidade suficiente para suportar o crescimento durante o período desejado. Porém, devido ao pouco conhecimento das correlações entre os explantes e o meio de cultura nas diferentes fases, os subcultivos ocorrem mensalmente ou em intervalos mais curtos, caso a proliferação e o crescimento diminuam (MEZZETTI, 1991).

2.3.3. Composição Mineral

A concentração iônica, do meio de cultura, tem grande influência no desenvolvimento dos explantes, e a necessidade de um meio mais ou menos concentrado irá depender do genótipo, do tipo de tecido e do objetivo desejado. Porém, quando se fala em alteração na concentração iônica total, necessariamente haverá uma alteração na concentração dos macronutrientes que são os componentes minerais utilizados em maior quantidade nos meios de cultura (MCCOWN & SELLMER, 1987).

Muitos autores, por questões de simplicidade, têm adotado a prática de aumentar ou diminuir a concentração dos meios de cultura através da diminuição ou acréscimo na quantidade final de água. Entretanto, a concentração individual final dos íons não é considerada, podendo muitas vezes vir a ocasionar desequilíbrio nutricional nos explantes, segundo GONÇALVES⁴.

⁴ GONÇALVES, A.N. (ESALQ, Depto. Ciências Florestais). Comunicação Pessoal, 1994.

Com relação aos micronutrientes, os estudos efetuados até o momento, são bastante escassos e restritos a uns poucos elementos. O que se nota, é a tendência de testar combinações entre as composições de macro e micronutrientes desenvolvida para meios clássicos, ou composições diluídas da mesma maneira que para os macronutrientes.

2.3.3.1. Macronutrientes

Os sais de macronutrientes, fornecem os seis maiores elementos indispensáveis ao crescimento das plantas superiores que são N, P, K, Ca, Mg e S. Estes sais, normalmente também fornecem Na e Cl cujas funções nas plantas superiores ainda não são bem definidas. Embora o sódio não seja considerado um elemento essencial, é utilizado em pequenas quantidades, produzindo efeitos benéficos em algumas espécies. O Cl, em pequenas quantidades, é essencial para o crescimento das plantas, mas muitas vezes é absorvido em quantidades muito maiores sem causar problemas (GEORGE et al., 1988, MENGEL & KIRKBY, 1987).

Embora não seja problemático para grande parte das plantas herbáceas, os meios de cultura utilizados para plantas arbóreas procuram reduzir os níveis de Cl, através da utilização de sulfatos e nitratos, devido à sensibilidade ao Cl apresentada por muitas espécies (MCCOWN & SELLMER, 1987).

2.3.3.1.1. Nitrogênio (N)

O crescimento e a morfogênese, na micropropagação, é extremamente influenciado pela disponibilidade e pela forma como o nitrogênio é fornecido. A forma de nitrato é geralmente considerada a mais importante na micropropagação. Mas, em muitos casos, formas reduzidas de nitrogênio mostram-se necessárias, pois a converção enzimática do N-NO_3^- para N-NH_4^+ é um processo ativo que envolve consumo de energia (GEORGE, 1984, GEORGE et al., 1987).

Muitos meios de cultura, utilizados para espécies florestais, contém tanto N-NO_3^- como N-NH_4^+ , como fonte de nitrogênio (MCCOWN & SELLMER, 1987). Os íons de NH_4 podem ser incorporados aos aminoácidos sem a necessidade do processo de redução, assim como suprimentos externos de aminoácidos também podem ser incorporados diretamente aos processos de biosíntese. A absorção das formas reduzidas de nitrogênio também estimula a atividade da redutase nitrato, facilitando o metabolismo do nitrato (GEORGE, 1984; GEORGE et al., 1988).

A utilização de relações adequadas entre $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, tem mostrado ser muito importante para um desenvolvimento equilibrado dos explantes, pois quando se utiliza NO_3^- como única fonte de nitrogênio pode haver um acúmulo de nitrito a níveis tóxicos no meio de cultura. No caso da embriogênese somática, a presença de NH_4^+ é essencial (GEORGE, 1984).

O crescimento, em meio de cultura contendo somente NH_4^+ é possível mas, geralmente é lento, ou não ocorre a menos que o meio seja tamponado. A absorção de NO_3^- requer um pH ácido, tornando o meio gradualmente menos ácido durante a absorção. Ao contrário, a absorção de NH_4^+ resulta na excreção de H^+ para o meio, tornando-o mais ácido. Conforme o pH cai, a absorção de NH_4^+ é inibida. Portanto, a combinação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ forma um sistema tampão no meio de cultura, aumentando a absorção total de N (GEORGE, 1984; GEORGE et al., 1988).

Uma desvantagem que tem sido atribuída à utilização de altas concentrações de NH_4^+ ou sua utilização como única fonte de N, é a indução da vitrificação principalmente em espécies arbóreas. Ao contrário, o suprimento de fontes reduzidas de N tem se mostrado importante para a formação direta de gemas em algumas espécies (GEORGE, 1984). David (1972), citado por GEORGE (1984), chegou à conclusão que o principal ingrediente que favorecia a diferenciação em explantes de "*Maritime pine*" era o NH_4NO_3 .

EVERS (1988), concluiu que a relação de 1:5, para $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ foi a que proporcionou melhor resultado na indução de gemas de *Alnus glutinosa*. Porém, o melhor resultado na fase de alongamento foi obtido na relação 1:8. Em outro trabalho, realizado com *Salix alba*, o autor observou que na fase inicial a relação $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ do meio MS foi mais favorável à indução de gemas do que a do meio de Heller. MOHAMMED & DUSTAN (1986) observaram que o meio contendo níveis intermediários de NH_4^+ (9,56mM) foi mais favorável ao crescimento de *Picea glauca* do que os níveis de 2,61 μM e 20,61 μM , produzindo 23,7 brotações por explante contra 9,2 e 13,1 respectivamente.

Em trabalho utilizando diferentes fontes de N, LEE & KIRKBY (1986), observaram que o NH_4SO_3 nas concentrações acima de 10 mM/l resultou em decréscimo gradual do peso seco de *Pseudotsuga menziessi*, devido à morte celular. A adição de KNO_3 (10 mM e 30 mM) como única fonte de N, proporcionou um aumento de 116% e 120% respectivamente na produção de matéria seca, contra 90% do meio MS completo. O NH_4^+ , nos níveis do MS, como única fonte de N, inibiu o crescimento celular. Neste trabalho, o autor correlaciona os resultados apenas com as variações na forma e quantidade de nitrogênio sem considerar o efeito do íon acompanhante.

BUTENKO (1964), comenta que a substituição de 10% do nitrato por sais de amônio, em meio com água de coco, proporcionou melhores resultados para a cultura *in vitro* de cenoura e batata. Este efeito benéfico, foi correlacionado ao rápido crescimento proporcionado pela água de côco e a necessidade imediata de N reduzido para a síntese de proteínas.

Segundo GEORGE (1984), o maior avanço que ocorreu na composição dos meios de cultura foi a introdução de nitrogênio na forma de NH_4^+ , juntamente com a utilização de altas concentrações de NO_3^- e K. Estas mudanças permitiram, não apenas um melhor crescimento na cultura de calo, mas possibilitou a formação direta e indireta

de gemas e embriões em diferentes tipos de tecidos. O trabalho que talvez tenha mais contribuído para isso foi o de Murashige e Skoog em 1962.

Em seu trabalho clássico, MURASHIGE e SKOOG (1962), partiram de uma solução de White modificada e procuraram estabelecer as relações mais adequadas de macro e micronutrientes para a cultura de calo de tabaco. Com relação ao nitrogênio, observaram que o aumento em sua concentração aumentava consideravelmente a produção de matéria seca sendo que o nível ótimo foi de 50 mM. Acima de 80 mM foi prejudicial. Desta forma, o nível selecionado como satisfatório foi de 60 mM de N, dos quais 20,61 na forma de NH_4^+ .

Como se observa no trabalho de MURASHIGE e SKOOG (1962), também existe uma grande interação entre os macronutrientes *in vitro*. Isso torna importante não só a relação entre NO_3^- e NH_4^+ , mas a quantidade total de N fornecida em relação aos outros íons. DE-EKNAMKUL & ELLIS (1985), trabalhando com suspensão celular de *Anchusa officinallis*, em meio B-5, obtiveram um aumento de 10-50% no crescimento celular quando os macroelementos foram utilizados separadamente nas maiores concentrações favoráveis. Porém, quando todos foram elevados para as maiores concentrações favoráveis, ao mesmo tempo, não houve aumento no crescimento celular.

Em muitos casos, as formulações de baixa concentração salina não são capazes de suportar o crescimento adequado dos brotos e o crescimento é reduzido, quando comparado com outras formulações mais concentradas, como no caso de clones de *Populus nigra* crescendo em meio MS e WPM. No meio MS, a produção de matéria fresca foi 3 vezes maior que no meio WPM. Porém, quando o meio WPM foi suplementado com $\text{NH}_4^+\text{NO}_3^-$ nos níveis do meio MS, a produção foi praticamente a mesma do meio MS (MCCOWN & SELLMER, 1987), mostrando a necessidade de um balanço mineral adequado e não a simples diluição dos meios mais concentrados.

A indução direta de gemas adventícias, em explantes de pedúnculo de espécies cauliflorais, dependem da quantidade total de nitrogênio no meio de cultura (Margara, 1969 citado por GEORGE, 1984). Em *Crysanthemum*, a concentração total de N também teve efeito similar, onde alguns cultivares foram favorecidos em níveis acima do encontrado no MS (60 mM) e outros preferiram níveis menores (Roest, 1975, citado por GEORGE 1984).

Com base na análise de 615 diferentes formulações de macro e micronutrientes GEORGE et al. (1988) definiram, em seu trabalho de análise de meios de cultura para plantas, os níveis considerados altos, médios e baixos para cada íon em particular. De acordo com esta análise, os níveis de NH_4^+ e NO_3^- são classificados da seguinte forma: NH_4^+ - 1,79 mM (baixo), 6,56 mM (médio), 11,32 mM (alto), NO_3^- - 8,72 mM (baixo), 17,65 mM (médio), 26,57 mM (alto).

2.3.3.1.2. Fósforo (P)

Muito pouco se sabe a respeito da dinâmica do fósforo nos meios de cultura utilizados na micropropagação, assim como sobre as concentrações mais indicadas.

O fósforo é absorvido pelas plantas na forma de fosfato através de um processo ativo. A velocidade de absorção é bastante influenciada pelo pH do meio (MENGEL & KIRKBY, 1987). Geralmente, as concentrações de fosfato utilizadas nos meios de cultura, são relativamente baixas. Altas concentrações de fosfato dissolvido podem reduzir o crescimento pelo decréscimo na absorção ou precipitação de alguns micronutrientes como Fe, Zn e Cu (GEORGE et al., 1988; MENGEL & KIEKBY, 1987). Ou pela formação de precipitados insolúveis de cálcio (GEORGE et al., 1988).

Apesar de grande parte dos meios de cultura utilizarem baixos níveis de fosfato, em alguns casos a elevação destes níveis tem sido benéfica. CORREIA (1993)

utilizou com sucesso 3 mM de fósforo para a cultura de segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* e híbridos, aumentando porém os níveis de ferro para aproximadamente 200 μM . Estes níveis são duas vezes maiores que os do meio MS, contrariando portanto, os resultados encontrados por MURASHIGE E SKOOG (1962) para calo de Tabaco. Murashige (1974), citado por GEORGE (1988), encontrou efeito benéfico para algumas culturas quando elevou os níveis de fósforo para 2,7 mM aproximadamente. Em outros casos estes níveis chegaram a quase 4 mM.

MEZZETTI et al. (1991) avaliaram a absorção mineral e crescimento de *Actinidia deliciosa* no meio MS sólido. Com relação ao fósforo, concluíram que a quantidade no meio de cultura não era suficiente para dois meses de cultivo, estando quase completamente exaurida após 30 dias.

Os sintomas de deficiência de fósforo *in vivo* aparecem normalmente nas folhas mais velhas, as quais tornam-se verde escuro. Os caules de muitas plantas apresentam coloração avermelhada devido a um aumento na produção de antocianina. A quantidade de P em plantas deficientes é geralmente 0,1 % ou menos na matéria seca. Os teores adequados geralmente estão entre 0,3 e 0,4%. Normalmente, a quantidade de P é maior nas plantas ou órgãos mais jovens (MENGEL & KIRKBY, 1988). Segundo MURASHIGE & SKOOG (1962), os níveis adequados de P, no meio de cultura dependem da concentração de potássio, pois quando ambos foram elevados os resultados foram melhores. Quanto a classificação dos meios de cultura, em relação ao P a divisão é a seguinte: 0,73 mM (baixa); 1,72 mM (média); 2,7 mM (alta) (GEORGE et al., 1988).

2.3.3.1.3. Potássio (K)

Como o fósforo, o potássio é relativamente pouco estudado nos sistemas de cultura *in vitro* para diferentes espécies.

Em seu trabalho clássico, MURASHIGE & SKOOG (1962), constataram que o aumento na concentração de K, acima de 15 mM, aumentou consideravelmente a produção da matéria seca em calo de tabaco. O nível ideal selecionado, foi de 20 mM. Segundo BUTENKO (1964), tecidos jovens em crescimento ativo requerem grandes quantidades de K, enquanto os mais velhos requerem mais Ca.

MEZZETTI et al. (1991) constataram que a concentração de potássio no MS foi adequada para a cultura de *Actinia deliciosa* por um período de dois meses. Este resultado pode indicar talvez que, para um período de subcultivo de 30 dias, esta concentração seja excessiva, pois 15% do potássio ainda permanecia no meio após 60 dias de cultivo.

O potássio é o cátion em maior quantidade dentro dos tecidos das plantas, contrabalanceando os ânions orgânicos e inorgânicos. Sua principal função é regular o pH e o potencial osmótico do meio ambiente da célula. Deficiência de potássio pode resultar na perda da turgescência dos tecidos, tornando-os flácidos, assim como diminuir a resistência dos tecidos às condições de excesso de sais e redução do crescimento celular (GEORGE et al., 1987; MENGEL & KIRKBY, 1987).

Plantas cultivadas *in vivo*, apresentam menor perda de água quando bem supridas com potássio devido a uma redução na taxa transpiratoria. Esta indução se dá através do controle do potencial osmótico das células do mesófilo e, conseqüentemente, pelo controle dos estômatos (MENGEL & KIRKBY, 1988).

Os sintomas de deficiência de potássio, *in vivo*, não são visíveis imediatamente. Em primeiro lugar, há uma redução no crescimento, e só posteriormente ocorre clorose e necrose. Estes sintomas geralmente, surgem nas folhas mais velhas. Pode também ocorrer um desenvolvimento anormal dos tecidos resultando em um crescimento reduzido e restrição na formação de xilema e floema (MENGEL & KIRKBY, 1988).

Em relação a outros íons, a absorção de K parece ser estimulada na presença de Ca e inibida na presença de Mg (MARSCHNER, 1986). A utilização eficiente do Nitrogênio depende de uma disponibilidade adequada de potássio. O nível de K, considerado adequado nas plantas, é de 250 μ moles/grama de matéria seca (EPSTEIN, 1975). Segundo GEORGE et al. (1988), os níveis encontrados nos meios de cultura são: 7,10 mM (baixo); 13,54 mM (médio); 20,00 mM (alto).

2.3.3.1.4. Cálcio (Ca)

O cálcio apresenta um papel importante na morfogênese, devido à interação com substâncias reguladoras do crescimento. Parece haver uma associação entre o cálcio e as citocininas, principalmente nas áreas onde esta ocorrendo a diferenciação em gemas. A formação de protocomos, a partir de calo de *Dendrobium fibriatum*, foi pobre na ausência de cálcio (GEORGE et al., 1988). MENGEL & KIRKBY (1987) comentam que altas doses de cálcio no meio de cultura, retardaram a abscisão de folhas de trigo e a senescência em folhas de milho, sendo também requerido para divisão e alongamento celular.

Pelo fato do cálcio ser um elemento pouco móvel dentro da planta e devido à maior exigência dos tecidos mais jovens por este elemento, sua importância na cultura *in vitro* assume um caráter particular. É um elemento transportado basicamente por processos passivos, os quais são extremamente influenciados pela taxa transpiratória. Desta forma, muitas vezes ocorrem sintomas de necrose nas gemas terminais devido à baixa atividade transpiratória dos explantes cultivados *in vitro*. Estes sintomas podem ser prevenidos pela diminuição das taxas de crescimento, pela modificação do ambiente de cultura ou pelo aumento dos níveis de cálcio no meio de cultura (MCCOWN & SELLMER, 1987).

Os níveis de cálcio não devem ultrapassar 30 mM, pois metade desta concentração é adequada para o crescimento de muitas plantas. Os níveis nos tecidos,

considerados adequados, estão por volta de 125 $\mu\text{moles/g}$ de matéria seca (EPSTEIN, 1975; MCCOWN & SELLMER, 1987). Segundo GEORGE et al. (1988), os níveis de cálcio nos meios de cultura são classificados como baixo (1,1 mM); médio (2,57 mM) e alto (4,04 mM).

2.3.3.1.5. Magnésio (Mg)

O magnésio é um constituinte estrutural da clorofila, sendo necessário para a atividade de muitas enzimas. Como o potássio, o Mg é móvel e difunde-se facilmente dentro da planta, servindo portanto para balancear e neutralizar ânions inorgânicos e ácidos orgânicos (MENGEL & KIRKBY, 1987). Mas, quantidades relativamente pequenas são suficientes no meio de cultura (GEORGE, 1984). Nos tecidos, segundo EPSTEIN (1975), o nível adequado de Mg está por volta de 80 $\mu\text{moles/g}$ de matéria seca.

No solo, apesar de sua concentração ser maior do que a de potássio, sua absorção pelas raízes é bem menor. Esta característica parece não estar restrita apenas aos tecidos de raiz, ocorrendo também em outras partes da planta (MENGEL & KIRKBY, 1987). O transporte do Mg é passivo, através de um gradiente eletroquímico. Neste tipo de transporte a competição com outros cátions tem um papel importante. Cátions como K^+ , NH_4^+ e Ca^{2+} em excesso, podem afetar a absorção do Mg^{2+} (MENGEL & KIRKBY, 1987). A presença de NO_3^- no meio de cultura, favorece a absorção do Mg^{2+} (MENGEL & KIRKBY, 1987).

A deficiência de Magnésio aparece primeiro nas folhas mais velhas, devido a boa mobilidade deste elemento dentro da planta, através da formação de clorose internerval. Em casos mais extremos pode haver necrose (MENGEL & KIRKBY, 1987). Segundo GEORGE et al. (1988), os níveis de Mg nos meios de cultura são divididos em: 0,58 mM (baixo); 1,43 mM (médio); 2,10 mM (alto).

2.3.3.1.6. Enxofre (S)

O Enxofre é absorvido na forma de SO_4^{2-} e é pouco influenciado pelas variações no pH. A falta de enxofre resulta em redução na síntese de proteínas. As plantas deficientes tornam-se rígidas, com ramos finos e quebradiços, e com folhas cloróticas, como na deficiência de nitrogênio. Normalmente, as plantas não são sensíveis aos altos níveis de S, mostrando alterações no crescimento somente em níveis em torno de 50 mM (GEORGE et al., 1988; MENGEL & KIRKBY, 1987).

Os níveis de S, utilizados nos meios de cultura, variam de 0,90 mM (baixo); 2,33 mM (médio); 3,75 mM (alto) (GEORGE et al., 1988). Normalmente, os meios mais utilizados para cultura de espécies arbóreas possuem níveis mais altos do que o MS.

2.3.3.2. Micronutrientes

O estudo sobre a dinâmica dos micronutrientes no solo e em meios de cultura, tem começado a receber atenção há pouco tempo. Porém, BUTENKO (1964), já havia notado que uma passagem (30 a 40 dias, aproximadamente) em meio de cultura sem micronutrientes, resultava na redução de 40% no crescimento. Uma segunda passagem sobre o mesmo meio resultava na morte dos explantes.

2.3.3.2.1. Ferro (Fe)

A concentração média de Fe nas folhas varia normalmente entre 50 e 300 $\mu\text{g/g}$ de matéria seca. Porém, em "seedlings" pode chegar até 690 $\mu\text{g/g}$ (TEASDALE, 1987). O sintoma mais aparente de deficiência é a clorose das folhas jovens, enquanto as folhas mais velhas permanecem verdes e a divisão meristemática pára. A precipitação de Fe como fosfato é marcadamente influenciada pelo pH, ocorrendo com maior frequência em pH mais alcalino (MENGEL & KIRKBY, 1987). Além do pH, o excesso de fósforo, cálcio e metais pesados ($\text{Cu} > \text{Co} > \text{Zn} > \text{Mn}$) podem prejudicar a

absorção de Fe. A toxicidade de Fe ocorre, no solo, quando os níveis passam de 0,1 ppm para 50 - 100 ppm, os sintomas são manchas marrons que vão aumentando de tamanho (FERREIRA & DA CRUZ, 1991). Os níveis utilizados nos meios de cultura são classificados como: 32,88 μM (baixo); 74,87 μM (médio) e 116,86 μM (alto) (GEORGE et al., 1988).

2.3.3.2.2. Cobre (Cu)

O Cobre é um elemento que possui um limite bastante estreito entre os níveis adequados e os níveis tóxicos (FERREIRA & DA CRUZ, 1991; MENGEL & KIRKBY, 1987; TEASDALE, 1987). Esta característica tem dificultado a identificação dos sintomas de deficiência e toxidez. A quantidade de cobre encontrada nos tecidos das plantas pode variar de 2 a 20 ppm na matéria seca, aproximadamente 1/10 dos níveis de Mn (MENGEL & KIRKBY, 1987). A concentração crítica mais baixa encontrada nas folhas de *Pinus*, está em torno de 3 a 4 $\mu\text{g/g}$ de matéria seca (TEASDALE, 1987), porém mesmo com suprimento de luxo as quantidades não aumentam muito acima deste valor. A absorção de Cu é bastante inibida pela absorção de Zn e vice-versa. A elevação do pH também tende a diminuir a absorção de Cu. No solo, os níveis disponíveis estão em torno de 0,1 a 10 ppm. Os sintomas de deficiência aparecem primeiro nas folhas dos ponteiros, os quais se tornam brancos e as folhas ficam estreitas e retorcidas. O crescimento dos internódios é reduzido. Algumas vezes, as folhas tornam-se verde-azuladas (TEASDALE, 1987; MENGEL & KIRKBY, 1987; FERREIRA & DA CRUZ, 1991).

Para muitas plantas, as quantidades de Cu no meio de cultura podem ser tóxicas. O efeito parece estar relacionado em parte à capacidade do Cu deslocar outros metais, em particular o Fe. O sintoma mais característico é o de clorose nas folhas jovens como na deficiência de Fe. Os níveis utilizados nos meios de cultura são classificados como: 0,031 μM (baixo); 0,331 μM (médio); 0,630 μM (alto) (GEORGE et al., 1988).

2.3.3.2.3. Zinco (Zn)

Os níveis foliares típicos variam de 15 a 70 $\mu\text{g/g}$ de matéria seca, embora as coníferas apresentem níveis de 50 a 80 $\mu\text{g/g}$ de matéria seca. Em folhas de citros, os níveis adequados estão na faixa de 26 a 80 ppm. Os sintomas característicos de deficiência são folhas pequenas e formação de roseta. Em *Pinus* a deficiência ocorre quando níveis foliares encontram-se abaixo de 20 $\mu\text{g/g}$ de matéria seca, levando ao secamento dos ponteiros. A presença de Cu inibe a absorção de Zn, assim como o Fe e o Mn. Em condições mais alcalinas Mg e Ca também podem inibir a absorção de Zn. Em plantas deficientes o transporte de Zn para os tecidos mais jovens é reduzido (TEASDALE, 1987).

A interação entre Zn e P tem demonstrado que altos níveis de P podem induzir deficiência de Zn. O NH_4^+ pode favorecer a absorção de Zn devido a acidificação que provoca no meio de cultura. O aumento da disponibilidade de K diminuiu o efeito depressivo provocado pelo P (MENGEL & KIRKBY, 1987).

Geralmente, as concentrações consideradas tóxicas nos tecidos, variam da ordem de 150 a 200 $\mu\text{g/g}$ de matéria seca. Entretanto, algumas espécies toleram níveis entre 600 e 7800 ppm. A toxicidade de Zn resulta em redução do sistema radicular e expansão foliar seguida de clorose. Altas concentrações de Zn podem diminuir a absorção de P e Fe (FERREIRA & DA CRUZ, 1991; MENGEL & KIRKBY, 1987). Os níveis utilizados nos meios de cultura são classificados como 5,72 μM (baixo); 15,54 μM (médio) e 25,36 μM (alto) (GEORGE et al., 1988).

2.3.3.2.4. Manganês (Mn)

Os níveis foliares variam entre 30 e 500 $\mu\text{g/g}$ de matéria seca, com valores de 307 $\mu\text{g/g}$ encontrados em *Pinus radiata*. Os níveis de deficiência em pinus (5 a 10 $\mu\text{g/g}$ de matéria seca) sugerem que muito do Mn presente na folha não é essencial. Há

muita semelhança entre o Mn e o Mg em relação as funções bioquímicas (TEASDALE, 1987).

Em condições de deficiência, ocorre clorose internerval semelhante aos sintomas de deficiência de Mg porém, ao contrário do Mg, os sintomas aparecem primeiro nas folhas mais jovens. Cátions como Mg^{2+} e Ca^{2+} reduzem a absorção do Mn pela competição direta, ou também pela elevação do pH no caso do cálcio. Elevados níveis de Zn e Fe reduzem a absorção do Mn (MENGEL & KIRKBY, 1987).

No caso dos sintomas de toxidez, ocorre acúmulo de MnO_2 , formando pontos escuros nas folhas mais velhas, rodeados por áreas cloróticas. O excesso de Mn pode induzir a deficiência de Fe, Mg e Ca (FERREIRA & DA CRUZ, 1991). Os níveis nos meios de cultura são classificados como 23,44 μM (baixo); 48,73 μM (médio); 74,03 μM (alto) (GEORGE et al., 1988).

2.3.3.2.5. Cobalto (Co)

O papel do cobalto é bem conhecido para o caso de bactérias fixadoras de nitrogênio, porém sua função no metabolismo de plantas superiores não é bem conhecida. Os níveis foliares, tipicamente encontrados, variam de 0,2 a 29 $\mu g/g$ de matéria seca (MENGEL & KIRKBY, 1987).

Em cultura de suspensão celular de *Pinus* não ficou evidenciada a necessidade de Co. A toxidez é comum em baixos níveis de Co livre, mas não quando quelado pelo EDTA, como no caso do Cu (TEASDELE, 1987). Os sintomas de toxidez são muito semelhantes aos de deficiência de outros íons como Fe, Mn, Zn e Cu. No campo, os sintomas de deficiência de Co, em espécies de plantas não fixadoras de N, foram de clorose nas folhas mais jovens. A deficiências podem ser favorecidas em pH mais alcalino (MENGEL & KIRKBY, 1987).

Apesar de não haver evidências da essencialidade do Co, tem-se adotado como prática em muitos laboratórios, a inclusão de pequenas quantidades no meio de cultura ($0,1 \mu\text{M}$) pois parecem regular a síntese endógena do etileno nos tecidos (GEORGE, 1984; MARSCHENER, 1987). Os valores utilizados no meio de cultura são classificados como $0,00 \mu\text{M}$ (baixo); $0,238 \mu\text{M}$ (médio); $0,577 \mu\text{M}$ (alto) (GEORGE et al., 1988).

2.3.3.2.6. Sódio (Na)

As folhas de plantas normais, contém aproximadamente níveis de 300 mg/g de matéria seca de Na. Em *Pinus radiata* os níveis encontrados foram de 68 mg/g , porém a essencialidade do sódio tem sido reconhecida apenas para plantas tipo C-4 (TEASDALE, 1987).

O sódio pode substituir o K em algumas funções como na regulação da atividade estomática. Em cultura de suspensão celular de pinus o sódio não tem mostrado benefício algum, mas a toxidez ocorre quando a concentração de Na excede 5 mM nas células. Porém, a adição de 100 a $500 \mu\text{M}$ de Na ao meio de cultura pode ser feita sem preocupação com o risco de toxidez (TEASDALE, 1987). Os níveis comumente usados nos meios de cultura são classificados como $0,0 \mu\text{M}$ (baixo); $1,92 \mu\text{M}$ (médio); $4,88 \mu\text{M}$ (alto) (GEORGE et al., 1988).

2.3.3.2.7. Boro (B)

A fração disponível de B no solo está na faixa de $0,4$ a 5 ppm . Sua absorção se dá na forma de íons borato (BO_3^{3-}). Porém, há controvérsias se o processo é ativo ou passivo. Entretanto, sua absorção é bastante afetada pelo pH, diminuindo em soluções mais alcalinas (MENGEL & KIRKBY, 1987).

Em *Pinus radiata* os níveis estão por volta de $23 \pm 4 \mu\text{g/g}$ de matéria seca, estando dentro da faixa considerada normal (15 a $100 \mu\text{g/g}$) para outras plantas

(TEASDALE, 1987). Os níveis de deficiência estão por volta de 4 a 12 $\mu\text{g/g}$ de matéria seca, quando ocorre morte das gemas terminais, frequentemente com coloração vermelho alaranjado, deformação e bifurcação do caule principal (MENGEL & KIRKBY, 1987).

O Boro é relativamente imóvel nas plantas e seu conteúdo aumenta, frequentemente, da parte inferior para a superior. Desta forma, a taxa transpiratória tem grande influência na absorção e transporte de B na planta, sendo translocado principalmente pelo xilema. Isto contribui para sua acumulação nas pontas e margens das folhas. Este acúmulo, pode ter, em algumas circunstâncias, efeitos tóxicos, levando algumas plantas a secretar o excesso através da gutação (MENGEL & KIRKBY, 1987).

As funções do B ainda não são bem conhecidas nas plantas, porém tem-se sugerido sua participação no metabolismo dos ácidos nucleicos, biossíntese de carboidratos, metabolismo das proteínas e outros. A deficiência de B afeta o processo da mitose e síntese de DNA e consequentemente o desenvolvimento dos tecidos meristemáticos como ápice de raiz, do caule e tecidos do câmbio. Em alguns casos, a deficiência pode resultar em um aumento na produção de calose e bloqueamento dos vasos condutores (MENGEL & KIRKBY, 1987).

O boro também parece ser essencial para a estabilidade das membranas pois, quando é adicionado à solução as plantas recuperam o metabolismo ligado ao transporte de íons. Na deficiência de Boro também ocorre acúmulo de substâncias fenólicas, devido a alterações no metabolismo dos açúcares (MENGEL & KIRKBY, 1987). Outro efeito relacionado à deficiência de B é a depressão na síntese de citocininas e, por outro lado, o acúmulo de auxinas nos tecidos deficientes deve ser o responsável pela necrose destes tecidos (MENGEL & KIRKBY, 1987).

Os sintomas de deficiência de B começam com o retardamento do crescimento das gemas apicais, as folhas jovens são deformadas, duras e quebradiças,

de cor verde-azulada, podendo ocorrer clorose internerval irregular. As folhas e os ramos tornam-se quebradiços, indicando um distúrbio transpiratório (FERREIRA & DA CRUZ, 1991). Em nabo e mandioquinha, a deficiência de Boro resulta em raiz vitrificada (MENGEL & KIRKBY, 1987).

Com relação à cultura de tecidos, a interação de B com outros nutrientes ficou evidente na cultura de *Pinus taeda*. As células crescendo no meio LM, necessitam de B na faixa de 500 a 1500 μM . Entretanto, nos níveis do meio MS (100 μM) houve morte celular rapidamente. No meio P₆ os sintomas de deficiência só apareceram em valores inferiores a 20 μM . Estas diferenças de resposta podem ser devido a baixa concentração de Ca (MS/20) e alta concentração de Mg (5 x MS) que caracterizam o meio LM (TEASDELE, 1987).

A toxidez de Boro pode ocorrer em muitas plantas em níveis pouco acima daqueles requeridos para o crescimento normal. Ocorre amarelecimento das folhas, seguido de necrose que começa nas pontas e margens e vai espalhando entre as veias laterais até a nervura principal. As folhas adquirem a aparência de queimadas e caem prematuramente (TEASDALE, 1987; MENGEL & KIRKBY, 1987). Nos meios de cultura as concentrações utilizadas são classificadas como: 21,46 μM (baixa); 64,01 μM (média); 106,47 μM (alta) (GEORGE et al., 1988).

2.3.3.2.8. Molibdênio (Mo)

O molibdênio é absorvido principalmente como íon molibdato. A absorção pode ser reduzida pela competição com SO_4^{2-} e estimulada pelo PO_4^{3-} (MENGEL & KIRKBY, 1987; FERREIRA & DA CRUZ, 1991).

A quantidade de Mo nas plantas é geralmente bem pequena, menor que 1 ppm na matéria seca. Porém, ao contrário dos outros micronutrientes, pode ser absorvido em grandes quantidades sem resultar em efeitos tóxicos (FERREIRA & DA

CRUZ, 1991). A quantidade de Mo nas plantas pode variar bastante. Para *Pinus radiata* as concentrações variaram de 0,03 a 0,05 $\mu\text{g/g}$ de matéria seca, sendo que os níveis mais comuns estão entre 0,5 e 5 $\mu\text{g/g}$ de matéria seca, excepcionalmente chegando a 1 $\mu\text{g/g}$ de matéria seca (TEASDALE, 1987). Em algodão suprido com excesso de Mo houve um acúmulo acima de 1500 ppm nas folhas. A toxidez tem ocorrido ocasionalmente em níveis extremamente altos na solução. Em tomate, a coloração amarelo-ouro só apareceu em níveis entre 1000 e 2000 ppm (MENGEL & KIRKBY, 1987). Em cultura de células de *Pinus* sp, a toxidez ocorreu em concentrações de 50 μM (TEASDELE, 1987).

A função mais importante do Mo é a participação na redução do NO_3^- (MENGEL & KIRKBY, 1987). A deficiência de Mo lembra os sintomas de deficiência de N, porém aparecem necroses rapidamente na margem das folhas devido ao acúmulo de NO_3^- (MENGEL & KIRKBY, 1987; FERREIRA & DA CRUZ, 1991).

Plantas deficientes apresentam redução no crescimento, com as folhas tornando-se pálidas e esbranquiçadas. Os sintomas aparecem normalmente nas folhas mais velhas e nas intermediárias. Elas passam de amarelo para um verde amarelado, as margens das folhas enrolam para cima ou para baixo. As folhas são normalmente pequenas e cobertas de pontos necróticos. A formação de clorose internerval ocorre normalmente nas folhas com coloração verde acinzentada com aspecto "mole" (EPSTEIN, 1975; GEORGE et al., 1988; MENGEL & KIRKBY, 1987). Os níveis utilizados nos meios de cultura estão classificados como baixo (0,0 μM); médio (1,75 μM) e alto (5,91 μM) (GEORGE et al., 1988).

2.3.3.2.9. Cloro (Cl)

Com exceção das halófitas, a concentração de Cl nas folhas varia entre 100 e 1000 $\mu\text{g/g}$ de matéria seca. As taxas de absorção de Cl dependem da concentração deste no solo. Porém, há considerável evidência de que este é um processo metabólico

ativo. Existe um efeito competitivo na absorção de Cl^- pelo NO_3^- e SO_4^{2-} (MENGEL & KIRKBY, 1987; FERREIRA & DA CRUZ, 1991).

O tecido das plantas contém teores de Cl semelhantes ao dos macronutrientes. Porém, a demanda das plantas por Cl para o crescimento ótimo é consideravelmente menor. Os sintomas de deficiência ocorrem na faixa de 2-20 mmol/kg de matéria seca. Em caso de deficiência, o principal efeito é uma redução na taxa de multiplicação da lâmina foliar reduzindo a área foliar, e conseqüentemente o crescimento da planta (EPSTEIN, 1975; MENGEL & KIRKBY, 1987).

Os sintomas de deficiência no tomateiro, são coloração verde-azulada-brilhante nas folhas mais novas, murchamento da ponta das folhas progredindo para um bronzeamento, seguido de clorose e necrose. Solos com baixos teores de Cl possuem menos de 2 ppm (EPSTEIN, 1985; FERREIRA & DA CRUZ, 1991).

O efeito do excesso de Cl é um problema mais sério, ocorrendo queimaduras nas pontas das folhas, bronzeamento, amarelecimento e queda prematura das folhas (EPSTEIN, 1975; MENGEL & KIRKBY, 1987). Em cultura de células de *Pinus* a toxidez pode ocorrer em níveis acima de 7 μM , com 5 μM os sintomas de deficiência desaparecem (TEASDALE, 1987).

McCOWN & SELLMER (1987) chamam a atenção para a sensibilidade de muitas espécies arbóreas ao excesso de Cl, pois quando CaCl_2 foi utilizado para suprir a deficiência de Ca apareceram os sintomas típicos de excesso de Cl (folhas amarelas, caules finos, colapso e morte dos tecidos). Por esta razão, no meio WPM os níveis de cloro foram reduzidos.

2.3.3.2.10. Iodo (I)

O papel do iodo nas plantas não é geralmente aceito, mas um grande número de relatos isolados tem indicado que a essencialidade pode existir (TEASDALE, 1987).

Quando este elemento é necessário, a quantidade é muito pequena. Tomate requer menos de 10 μM no meio de cultura (MENGEL & KIRKBY, 1987).

Uma necessidade clara de iodo foi observada em cultura de células de *Pinus taeda* no meio LM, com a deficiência iniciando-se a 25 μM . Para cultura de células de *P. radiata* no meio P6 não houve necessidade de presença do Iodo. Estes resultados sugerem um efeito interativo entre os diferentes nutrientes. A toxicidade não ocorreu até os níveis de 500 μM , em cultura de suspensão celular. A adição de 50 μM de I é recomendada para o meio P6 (TEASDALE, 1987).

Embora o iodo não tenha sido reconhecido como elemento essencial, tem sido acrescentado em muitos meios de cultura, pois parece ter um efeito favorável devido a seu poder redutor. Esta prática de acrescentar I ao meio de cultura iniciou-se com White em 1968 com a cultura de raízes de tomate. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores que observaram o declínio do crescimento na ausência deste elemento. Em cultura de calo de tabaco, a média de peso seco decresceu 11% sem a presença do I. Na cultura de tecido de palmeira a presença de 0,05 μM (10 x mais que MS) evitou a oxidação dos tecidos. A presença de 0,06 μM de I no meio de cultura aumentou a sobrevivência e o crescimento na cultura de meristemas de *Prunus* (GEORGE, 1984; GEORGE et al. 1988).

Os efeitos tóxicos aparecem primeiro nas folhas mais velhas. Em tomate elas tornam-se cloróticas e caem enquanto as folhas jovens permanecem verdes. O crescimento é bastante reduzido e as folhas enrolam sobre si mesmas e ocorre necrose na ponta e extremidades. Os sintomas de toxidez tem ocorrido acima de 8 ppm. Os níveis normais nas plantas variam de 0 - 0,5 ppm. Níveis altos de Cl podem reduzir os efeitos tóxicos do I, o que sugere um efeito competitivo entre ambos (MENGEL & KIRKBY, 1987). Os níveis de I utilizados nos meios de cultura, são classificados como baixo (1,40 μM); médio (4,62 μM); alto (7,84 μM) (GEORGE et al., 1988).

2.3.4. Componentes orgânicos

2.3.4.1. Carboidratos

Os primeiros estudos mostraram que um grande número de carboidratos pode suportar o crescimento de vários tipos de tecidos, mas com o passar dos anos tem se tornado cada vez mais evidente que a sacarose é, geralmente, a melhor fonte de carbono e energia. As concentrações mais comumente utilizadas tem variado entre 2 e 4% (60 a 120 μM) (GEORGE, 1984; NÉMETH, 1986; THOMPSON & THORPE, 1987).

A eficácia dos íons nitrato e amônio, podem depender da concentração de sacarose utilizada e o efeito das citocininas na divisão celular, podem depender da disponibilidade de açúcar (GEORGE, 1984).

Outros elementos participantes do processo de morfogênese, parecem também interagir com a sacarose, como na formação de elementos vasculares a sacarose normalmente é necessária juntamente com o AIA. Porém, níveis normalmente utilizados para suportar o crescimento de tecidos isolados podem ser inibitórios para a formação de clorofila em algumas plantas, a qual ocorre somente através de uma passagem em meio isento de sacarose. Alguns trabalhos chegam a mencionar a perda da capacidade de sintetizar clorofila em cultivos prolongados sobre meio contendo sacarose (GEORGE, 1984).

Na micropropagação de espécies arbóreas, são reconhecidas três fases distintas que ocorrem dentro do laboratório. 1) Indução de gemas ou ativação de gemas axilares; 2) Multiplicação e/ou alongamento de gemas; 3) Indução de raízes. Estes estágios, normalmente necessitam de quantidades diferentes de carboidratos (THOMPSON & THORPE, 1987).

Na fase de indução de gemas, de espécies arbóreas, a sacarose tem sido o carboidrato mais usado, nas concentrações de 2 a 4%. Em *Pinus contorta*, a sacarose

foi o único açúcar necessário à formação de gemas, cuja capacidade não foi afetada entre 25 e 200 μ M. Em *Pinus rubens* e *Pinus resinosa*, os níveis de 60 a 150 μ M foram mais adequados para a indução de gemas em embriões (THOMPSON & THORPE, 1987). A melhor indução de gemas, em marmelo foi obtida com 3% de sacarose no meio MS (GULSEN & DUMANOGLU, 1991). Em *Larix decidua*, DINER & STRICKLER (1986) obtiveram o melhor resultado na indução de gemas, também quando utilizaram 3% de sacarose em qualquer um dos meios testados, porém, a concentração de 9% foi prejudicial. Na cultura de células de *Aralia cordata*, a concentração de 5% inibiu o crescimento celular e, as maiores concentrações de antocianina ocorreram no meio LS com 2% de sacarose (SAKAMOTO & IDA, 1994).

Para a micropropagação do *Eucalyptus*, a partir de gemas e segmentos nodais, a concentração de sacarose mais utilizada na fase de indução e multiplicação de gemas tem sido 2% (GUPTA et al., 1981; RAO & VENKATESWARA, 1985; SITA & SHOBHA RANI, 1985; GUPTA & MASCARENHAS, 1987; RAO, 1988; FANTINI & GRAÇA, 1990; WIECHETECH, 1990; PINEDO et al., 1990; LE ROUX & STADEN, 1991; CHENG et al., 1992). Porém, para a indução de gemas a partir de calo, níveis maiores apresentaram bons resultados (WARRAG et al., 1991).

Para a fase de alongamento das gemas, poucos trabalhos tem sido desenvolvidos com o objetivo de verificar as concentrações mais adequadas de sacarose. Como este estágio é preparatório para as fases de enraizamento e aclimação, é recomendável que os níveis sejam um pouco inferiores à fase anterior, a fim de estimular o desenvolvimento dos mecanismos fotossintéticos. As gemas de *Pinus radiata* que necessitaram de 3% de sacarose na fase de indução, alongaram melhor quando transferidas para meio com 2% apenas. Para *Pinus resinosa*, *Picea rubens* e *Larix occidentalis* a redução da sacarose para níveis abaixo de 2%, também foi melhor para o alongamento (THOMPSON & THORPE, 1987). Para o *Eucalyptus*, a concentração foi praticamente a mesma utilizada na fase de multiplicação e alongamento (2%)

(CRESSWELL et al., 1985; RAO & VENKATESWARA, 1985; SITA & SHOBHA RANI, 1985; GUPTA & MASCARENHAS, 1987; RAO, 1988; FANTINI & GRAÇA, 1990; DAS & MITRA, 1990).

Além do papel metabólico, como fornecedora de carboidratos para o crescimento dos tecidos, a sacarose influi grandemente no potencial osmótico do meio de cultura (GEORGE, 1984). Na concentração de 3%, a sacarose é responsável por 4/3 do potencial osmótico nos meios de White (1943) e Hildebrandt et al. (1946), e 1/2 no meio MS. Como o potencial osmótico do meio de cultura influi no crescimento dos tecidos, a concentração ótima de sacarose deve variar de um meio para outro, tendendo a ser maior nos meios mais diluídos (GEORGE, 1984). Evans, em seu trabalho de 1976 obteve a máxima taxa de crescimento em soja quando combinou 50 a 75% dos sais do meio MS com 3 a 4% de sacarose ou 75-100% dos sais com 2% de sacarose (GEORGE, 1984). Resultados similares foram obtidos por Yoshida et al. (1973), citados por GEORGE (1984), com calo de *Nicotiniane glutinosa*.

Outro efeito, que foi observado com o decréscimo do potencial osmótico do meio de cultura, pelo aumento na concentração de sacarose, foi o aumento no peso seco e decréscimo na quantidade de água nos explantes. Em embriões de trigo, o peso seco aumentou com o aumento na concentração de sacarose, assim como o comprimento dos brotos de algumas variedades também foram maiores no meio MS com 6 ou 9% de sacarose em relação a concentração de 3%, ocorrendo decréscimo na quantidade de água dos tecidos (Maretzki, 1972 e Dunwell, 1981b, citados por GEORGE, 1984).

Apesar do efeito favorável do aumento da concentração de sacarose na produção de matéria seca, em determinados níveis como 4 e 5%, pode haver inibição do crescimento celular. Em bulbos e raízes de *Lilium auratum*, cultivados em meio MS, houve um aumento no peso seco até a concentração de 90 g/l de sacarose, ocorrendo decréscimo na concentração de 150 g/l (GEORGE, 1984).

O efeito osmótico da concentração de sacarose no meio de cultura, também tem grande influência sobre a morfogênese dos tecidos, onde a formação de gemas parece necessitar de maiores concentrações que a indução de raiz, variando porém de acordo com a espécie (GEORGE, 1984). A indução de gemas em calo de tabaco, foi excelente com 3% de sacarose no meio de cultura, a qual pode ser mantida quando a sacarose foi substituída por manitol em quantidades osmoticamente equivalentes. Porém, quando a concentração de sacarose foi elevada acima de 3%, houve um decréscimo progressivo na regeneração das gemas (Thorpe et al., 1978; Brown et al., 1979; Brown and Thorpe, 1980, citados por GEORGE, 1984).

2.3.4.2. Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento incluem os hormônios que ocorrem normalmente nas plantas como: AIA, giberelinas, zeatina, ABA, etileno, etc. E também outros compostos químicos sintéticos como BA, KIN, ANA, AIB, etc, cada tipo apresentando ampla variação de efeitos fisiológicos em plantas diferentes. Efeitos estes, determinados pelo tipo de regulador, concentração, presença ou ausência de outros reguladores (externos ou internos aos tecidos) e pelo genótipo e estado fisiológico dos tecidos. Portanto, para a mesma resposta fisiológica em diferentes tecidos de uma mesma planta, podem ser necessários diferentes tipos de reguladores, ou diferentes combinações destes (MINOCHA, 1987).

Em seu trabalho sobre a influência dos reguladores de crescimento, na morfogênese de cultura de células e tecidos de árvores, MINOCHA (1987) relaciona diversos fatores que dificultam este trabalho. Primeiro, a falta de dados quantitativos sobre as diferentes combinações hormonais e seus efeitos na morfogênese. Segundo, a dificuldade na interpretação dos resultados devido à falta de esclarecimento das condições anteriores de incubação dos explantes antes da instalação dos experimentos. Terceiro, as diferenças no estado fisiológico do explante original dificultam a

repetibilidade dos experimentos. Quarto, raramente são apresentados dados sobre a absorção e/ou metabolismo dos reguladores de crescimento pelo material em estudo. Além destes, até o momento muito pouco se conhece sobre o modo de ação dos reguladores, principalmente dos sintéticos (DAVIES, 1988).

Devido a estas dificuldades, até o momento, o que se tem de mais claro são as funções gerais das classes de hormônios. As auxinas são geralmente necessárias para a indução de calo em diversos tecidos (exceto os cambiais), sendo o 2,4-D a auxina mais frequentemente utilizada. Uma ampla faixa de concentração de auxinas (10^{-8} a 10^{-3} M) é tolerada por muitos tecidos. DE FOSSARD (1974b) utilizou 20 μ M de 2,4-D em tecido de "lignoluber" para a indução de calo. SITA (1979) utilizou 0,2 mg/l de AIA para indução de gemas em calo de *Eucalyptus*, MEHRA-PALTA (1982) utilizou acima de 0,1 mg/l de AIA, ANA ou AIB para fase de indução de calo de *E. viminalis*.

Outro papel importante das auxinas na micropropagação de espécies arbóreas, é na indução de raízes. A auxina que tem proporcionado os melhores resultados para o *Eucalyptus* é o AIB (DE FOSSARD, 1974b; BENNETT & MAC COMB, 1982; MEHRA-PALTA, 1982; CRESSWELL et al., 1985; MAC COMB, 1986b; RAO, 1988; FANTINI & GRAÇA, 1990; PINEDO, 1990; DAS & MITRA, 1990; MAC CURRIR, 1992; LEROUX & STADEN, 1991; CHANG et al., 1992; LUBRANO et al., 1992).

As citocininas são rotineiramente utilizadas em combinações com auxina para a indução e manutenção de culturas de calo. DE FOSSARD (1974b) utilizou 16 μ M de BA com 20 μ M de 2-NOA. SITA (1979) utilizou 1 mg/l de Zeatina com 0,2 mg/l de AIA para regeneração de gemas. SUBBAIAH & MINOCHA (1990) obtiveram melhor indução de calo quando as concentrações de ANA foram inferiores a 0,2 mg/l e as de KIN inferiores a 0,1 mg/l. BENNETT & MAC COMB (1982) utilizaram 10 μ M de KIN com 10 μ M de ANA na fase de indução de calo.

No caso da micropropagação a partir de gemas apicais e axilares, as citocininas promovem a multiplicação de gemas tanto em angiospermas como gimnospermas. As citocininas mais comumente usadas são o BA e KIN, porém em alguns casos a Zeatina tem mostrado melhor efeito. PINEDO et al. (1990) obtiveram bons resultados utilizando 0,25 mg/l de BA com 0,01 mg/l de ANA na fase inicial, e 1,0 mg/l de BA com 0,1 mg/l de ANA na fase de multiplicação. GUPTA et al. (1981) utilizaram apenas 0,2 mg/l de KIN na fase inicial. WARRAG et al. (1990) obtiveram melhor resultado na fase inicial com 0,5 mg/l de BA e 0,05 mg/l de ANA, passando na fase seguinte para 0,6 mg/l de BA sem ANA. MEHRA-PALTA (1982) obteve melhor frequência de indução de gemas com 0,001 mg/l de AIB + 1,0 mg/l de Zeatina, enquanto as outras citocininas (BA, 2ip, KIN) apresentaram resultados inferiores. Estes trabalhos foram desenvolvidos com diferentes espécies de *Eucalyptus*.

Pelo que se pode observar, os resultados obtidos com a mesma faixa e tipo de reguladores de crescimento variam bastante de um trabalho para outro quer em função da espécie e/ou do meio básico utilizado.

EVERS (1988) obteve melhor taxa de multiplicação para *Alnus glutinosa* quando combinou as doses de BA com o meio contendo uma relação de 1:5 de $\text{NH}_4:\text{NO}_3$. Porém em doses muito elevadas, não mencionadas pelo autor, houve vitrificação. TREMBLAY et al. (1986) trabalhando com a mesma espécie obtiveram melhor resultado com BA em relação ao 2ip, na faixa de 0,5 - 5 μM . VON ARNOLD & ERIKSSON (1986) confirmaram a necessidade de citocininas na fase indução de gemas em "Norway Spruce", mas não para seu posterior desenvolvimento, recomendando nesta fase a utilização dos métodos de "pulsing". MOHAMMED & DUSTAN (1986) observaram que BA em baixas concentrações (10^{-5} μM) ou uma mistura de KIN (10^{-3}M) com AIA (10^{-1}M) aumentou o alongamento das gemas de *Picea glauca*. Em *Larix decidua*, obteve-se excelente resultado na fase de multiplicação com 44 μM de BA (DINER et al., 1986).

Além das auxinas e citocininas, outra classe hormonal bastante utilizada nos meios de cultura de espécies arbóreas são as giberelinas. Estas, são utilizadas na fase de alongamento antes do enraizamento das gemas (GEORGE, 1984; MINOCHA, 1987 e DAVIES, 1988).

CRESSWELL et al. (1985) utilizaram 0,5 mg/l de GA, obtendo excelente alongamento das gemas. SITA & SHOBHA RANI(1985) utilizaram concentração bem mais elevada (1 mg/l). RAO & VENKATESWARA (1985) obtiveram gemas de 0,8 a 1,3 cm com 30 μ M de GA₃. FANTINI & GRAÇA (1990) utilizaram concentração bem menor (0,1 mg/l) e obtiveram gemas de 1 cm. WIECHETECH (1990) obteve bons resultados com GA₃ na faixa de 0,1 a 1,0 mg/l. Estes trabalhos foram desenvolvidos com diferentes espécies de *Eucalyptus*.

2.3.4.3. Aminoácidos

Embora o amônio seja a forma mais simples de se fornecer nitrogênio na forma reduzida, compostos contendo grupos amina e amida servem como eficientes fontes alternativas as quais estimulam a atividade da redutase nitrato e a utilização do nitrogênio. A absorção destes compostos causa uma queda no pH semelhante ao íon amônio (GEORGE et al., 1988).

Apesar dos aminoácidos fornecerem nitrogênio em uma forma mais rapidamente assimilável do que as fontes inorgânicas, estas duas formas não são completamente intercambiáveis. Segundo Simpkins et al., (1970), citados por GEORGE (1984), algumas culturas de suspensão celular tem o formato das células mais alongados quando cultivados em meio contendo somente N-orgânico.

Os aminoácidos e a uréia são as mais eficientes fontes orgânicas de nitrogênio nos meios de cultura. Além de estimularem o crescimento podem ser importantes para induzir a morfogênese em alguns casos particulares como na

embriogênese somática, mas os resultados podem ser variáveis. Em *Gossypium* e cenoura, a adição de glutamina induziu a formação de embriões somáticos, mas em *Dactylis glomerata*, acarretou morte das células (Anderson, 1976; Price & Smith, 1979; Gray & Canger, 1985, citados por GEORGE et al., 1988). Em muitos casos porém, a disponibilidade de íons amônio pode ser suficiente (GEORGE, 1984).

Nem todos os aminoácidos são igualmente eficientes, e muitos podem inibir o crescimento. Em *Datura innoxia*, dos 14 aminoácidos testados apenas dois estimularam o crescimento e os demais foram prejudiciais, porém não foram mencionados quais foram vantajosos (FUKANA & KING, 1982, citados por GEORGE et al., 1988).

Acredita-se que apenas alguns aminoácidos são necessários para o crescimento e a morfogênese, exigências estas que variam de acordo com os tecidos ou órgãos. Aqueles que mais frequentemente têm apresentado efeito positivo são: glicina, arginina, asparagina, ácido aspártico, alanina, prolina e ácido glutâmico (GEORGE, 1984; GEORGE et al., 1988).

Os benefícios da adição de aminoácidos ao meio de cultura estão frequentemente associados às formulações de macronutrientes contendo pequenas quantidades de nitrogênio inorgânico. MURASHIGE and SKOOG (1962) observaram que a adição de caseína hidrolizada e edamina aumentou o crescimento de calos de tabaco, substancialmente, exceto quando adicionadas ao seu meio de cultura revisado, o qual continha maiores quantidades de nitrogênio, particularmente na forma de NH_4 , porém o efeito de suplementos com aminoácidos podem ser menores quando os níveis de auxina, citocinina e dos outros componentes estiverem bem ajustados.

Segundo GEORGE et al. (1988) a amplitude das concentrações de alguns aminoácidos comumente utilizados nos meios são:

GLICINA - 0,506 μM a 100 μM

L-ARGININA - 0,057 μM a 300 μM

L-ASPARAGINA - 0,946 μM a 800 μM

L-GLUTAMINA - 0,068 μM a 2000 μM

L-CISTEINA - 0,082 μM a 100 μM

Teoricamente, para cada μM de aminoácido adicionado ao meio de cultura há um fornecimento de uma quantidade equivalente de NH_4^+ (GEORGE et al., 1988).

2.3.4.4. Vitaminas

As vitaminas são compostos necessários em pequenas quantidades para a obtenção do crescimento adequado. Muitas destas substâncias são utilizadas pelas plantas no metabolismo catalítico, as quais são naturalmente produzidas pelas plantas intactas nas quantidades necessárias. Porém, na cultura *in vitro*, os tecidos podem ser deficientes nestes componentes, apresentando maior crescimento ou sobrevivência quando algumas vitaminas são adicionadas ao meio (BUTENKO, 1964; GEORGE, 1984).

As vitaminas consideradas essenciais e mais frequentemente utilizadas na cultura de tecidos de plantas são: a tiamina (B1), utilizada nas concentrações de 0,1 a 0,5 mg/l; ácido nicotínico (niacina) normalmente usada na concentração de 0,5 mg/l e a piridoxina (B6) na concentração de 0,5 mg/l (HARTMANN et al., 1990).

O meso-inositol não é considerado uma vitamina na definição exata do termo, mas seu efeito favorável quando incorporado ao meio de cultura em pequenas quantidades, levou vários autores a enquadrá-lo nesta categoria. A concentração mais comumente utilizada nos meios de cultura, é de 100 mg/l, sendo adicionado

rotineiramente (GEORGE, 1984). Em alguns trabalhos a adição de 20 - 1000 mg/l favoreceu a indução de gemas em tecido cambial. Lethan (1966), citado por GEORGE (1984), demonstrou que o meso-inositol interage com as citocininas e estimula a divisão celular em floema de cenoura. O crescimento de calo de *Fraxinus pennsylvanica*, mostrou a necessidade de 10 mg/l de meso-inositol para atingir o crescimento máximo. Níveis acima de 250 mg/l não tiveram efeito sobre a produção de matéria fresca e seca (GEORGE, 1984).

Os efeitos positivos apresentados pela adição de água de côco ao meio de cultura, parecem ser devido em parte à presença de meso-inositol. Também, pequenas quantidades de meso-inositol podem estar presentes no agar comercial normalmente utilizado nos meios semi-sólidos, o que em parte pode explicar o comportamento diferenciado de um mesmo genótipo em agar de diferentes procedências (GEORGE, 1984).

Além destes compostos, mais comumente utilizados nos meios de cultivo, outras vitaminas têm apresentado efeitos benéficos em alguns casos, como o pantotenato de cálcio e a biotina. Ambas mais frequentemente na concentração de 0,1 mg/l (BUTENKO, 1964; GEORGE, 1984; GEORGE et al., 1988; HARTMANN et al., 1990).

Segundo GEORGE et al. (1988) os níveis utilizados nos meios de cultura são classificados como: meso-inositol 1562,86 μM (Médio), 3.718,20 μM (alto). Tiamina (0,327 μM (baixo), 6,248 μM (médio), 12,168 μM (alto). Ácido nicotínico 6,33 μM (baixo), 14,65 μM (médio), 22,98 μM (alto). Pirodoxina HCl (0,91 μM (baixo), 4,53 μM (médio), 22,98 μM (alto). Pantotenato de Cálcio 0,68 μM (baixo), 3,15 μM (médio), 5,63 μM (alto). Biotina 1,30 μM (médio), 3,08 μM (alto).

2.3.5. Considerações finais

Na formulação dos meios de cultura, a concentração de um elemento deve ficar entre os limites da deficiência e da toxidez. Estes limites podem variar significativamente em relação a outras mudanças na composição do meio de cultura, como resultado da interação entre seus compostos (TEASDALE, 1987). Portanto, os valores limites estabelecidos para um determinado meio de cultura são válidos apenas para aquela situação. Nestas circunstâncias, a seleção do meio de cultura deve ser cuidadosa, sendo que a análise dos tecidos pode ser utilizada satisfatoriamente para orientar esta seleção (TEASDALE, 1987).

Além da avaliação da composição mineral dos tecidos, deve-se também considerar que o carbono fornecido no meio de cultura será utilizado tanto na síntese de novas estruturas como fonte de energia para esta síntese. Em cultura de suspensão celular de *Pinus*, das 30 g/l de sacarose adicionada ao meio de cultura, metade foi utilizada na respiração e metade na síntese de estruturas celulares. Portanto, cada ml de meio de cultura deve ser suficiente para permitir a produção de 15 mg de matéria seca (TEASDALE, 1987).

2.4. Avaliação do crescimento

O crescimento de uma planta é muitas vezes referido como um processo vegetal, mas na verdade é coordenado por diferentes sub-processos. Muitos autores restringem o termo crescimento aos processos de divisão e aumento do volume celular e separam o crescimento, assim definido, da diferenciação. Porém, a caracterização mais exata deste processo seria: divisão celular, aumento do volume celular (ou alongamento) e diferenciação celular, cujo sinônimo pode ser morfogênese (MEYER et al., 1973).

Nos vegetais, o crescimento pode ser medido através do aumento da área foliar, aumento do diâmetro do caule, aumento do volume, aumento do peso seco e/ou do peso fresco, etc. Cada um tendo maior ou menor aplicação dependendo do objetivo da avaliação (MEYER et al., 1973; MAGALHÃES, 1985). Lance (1957), citado por BUTENKO (1964) comenta que além da determinação do peso fresco e seco, pode-se utilizar a área de crescimento da massa celular, número de células e N-Protéico, para avaliação dos sistemas de cultura *in vitro*.

A análise quantitativa do crescimento vegetal foi desenvolvida por fitofisiólogos da escola inglesa e é considerada internacionalmente como método-padrão para estimativa da produtividade biológica, ou produtividade primária (MAGALHÃES, 1985). No caso de comunidades vegetais a análise quantitativa do crescimento é o primeiro passo para a análise da produção vegetal, podendo ser usada para investigar a adaptação ecológica das culturas a novos ambientes, a competição entre espécies, efeitos do manejo e tratos culturais e a identificação da capacidade produtiva de diferentes genótipos (Kvet et al., 1971, citados por PEREIRA & MACHADO, 1987 e PEREIRA & MACHADO, 1987).

Nos ecossistemas, a taxa de produção vegetal pode ser definida como o acúmulo de produtos da fotossíntese/por unidade de área de terreno/por unidade de

tempo (Produtividade Primária das Comunidades Vegetais). Esta taxa de produção pode ser expressa em quantidade de peso seco, matéria orgânica, carbono, energia solar fixada, etc. As transformações podem ser feitas através das seguintes aproximações: 1 g de peso seco $\approx$ 0,4 g C $\approx$ 1,5 g CO₂ $\approx$ 17 KJ de energia (MAGALHÃES, 1985).

Numerosas plantas anuais e partes individuais de plantas anuais e perenes, apresentam o padrão de crescimento idealizado pela curva sigmóide. Este padrão de crescimento pode ser dividido em: Fase logarítmica, onde o crescimento aumenta exponencialmente com o tempo e, cuja taxa de crescimento é proporcional ao tamanho do organismo (quanto maior o organismo, maior a taxa de crescimento). A fase logarítmica é exibida por células isoladas e populações de alguns microrganismos, onde se tem feito uma analogia matemática com o capital empregado em um sistema de juros compostos. Fase linear, onde o incremento em tamanho ou peso continua em uma taxa constante, normalmente máxima, por algum tempo, porém, as causas dessa fase não são bem compreendidas. E a fase de senescência, onde a taxa de crescimento decresce (SALISBURY & ROSS, 1985).

Na curva de crescimento sigmóide, se os números obtidos forem transformados em logarítmos dos valores de peso seco ou outro parâmetro, a representação gráfica adquire uma forma característica, onde ficam evidentes um período inicial de crescimento lento quando ocorre o estabelecimento da cultura, seguido por um período linear denominado fase logarítmica ou exponencial e finalmente o período de senescência (MAGALHÃES, 1985).

Na avaliação do crescimento vegetal, MAGALHÃES (1985) relata a utilização da fórmula de juros compostos para calcular o acúmulo de matéria orgânica:

$$P_1 = P_0 \cdot e^{at}, \text{ onde:}$$

P_l = peso ou tamanho final

P_o = peso ou tamanho inicial

t = tempo de cultivo

a = taxa de crescimento relativo

A expressão acima, indica que o tamanho final do organismo depende da quantidade inicial de material, e da eficiência da planta (a) na produção de nova matéria orgânica. A eficiência difere de espécie para espécie e também conforme a fase de crescimento (MAGALHÃES, 1985).

Esta fórmula foi utilizada por Chaplin em 1947, e demonstrou ser adequada para avaliar o crescimento de calo de tabaco. Porém, outros estudos mostraram que não pode ser aplicada para o crescimento de todos os tipos de tecidos, pois não considera a "lag fase" (4 a 7 dias aproximadamente). Porém, o crescimento de qualquer cultura de tecidos pode ser expresso pela fórmula sigmóide clássica (BUTENKO, 1964).

Considerando que a quantidade de crescimento na unidade de tempo depende da quantidade inicial de material no início do período, onde "seedlings" provenientes de sementes maiores desenvolvem-se mais rapidamente que os de sementes menores e que "seedlings" maiores devem crescer mais rapidamente que os menores, fica difícil comparar o crescimento de plantas de diferentes tamanhos. Tal fato levou ao desenvolvimento do conceito de taxa de crescimento relativo (TCR) (KRAMER & KOSLOWSKI, 1979).

A taxa de crescimento relativo mede o incremento do peso seco por unidade de tempo, frequentemente em gramas por grama. Isto permite a comparação do efeito de vários fatores do meio ambiente sobre a taxa de crescimento, independente do

tamanho das plantas ou materiais que estão sendo comparados (KRAMER & KOSLOWSKI, 1979). A equação é a seguinte:

$$TCR = \frac{\ln P2 - \ln P1}{t2 - t1} \times 100, \text{ onde}$$

P1 e P2 → peso inicial e final no período amostrado

T1 e T2 → instante inicial e final, respectivamente.

Segundo PEREIRA & MACHADO (1987), a TCR é também chamada de taxa de crescimento específico, pois representa a quantidade de material produzido por unidade de material já existente, a qual depende do índice de conversão de matéria seca do material.

Apesar de cada parâmetro citado anteriormente ser utilizado com frequência na avaliação do crescimento, estes porém indicam apenas certas fases quantitativas do crescimento. No entanto, os fenômenos de crescimento compreendem em geral, também os aspectos qualitativos, que muitas vezes têm significado científico ou prático tão ou mais importantes que os aspectos quantitativos (MEYER et al., 1973).

2.5. Hiperhidria

Hiperhidria é o termo utilizado para descrever sintomas de alterações morfológicas, fisiológicas e/ou bioquímicas que aparecem em explantes de algumas espécies, quando cultivados em determinadas condições. O termo anteriormente utilizado era vitrificação, cujos sinônimos são translucidez, suculência ou vitriscência (ZIV, 1991; PÂQUES, 1991).

A hiperhidria afeta, normalmente, os processos de fotossíntese e troca gasosa. Ocorre má formação dos estômatos, resultando em folhas anormais que não respondem normalmente aos estímulos externos como CO₂, ABA, estress, etc. Estes efeitos resultam do acúmulo excessivo de água nos tecidos (ZIV, 1991), sendo um fenômeno aleatório que pode levar a perdas de até 60% na produção (PÂQUES, 1991).

Os sintomas de hiperhidria não são idênticos em todas as plantas, e ocorrem após certo período de cultivo devido a certas condições da cultura e do explante. O surgimento dos sintomas visuais, podem ser evitados pelo controle de composição do meio de cultura, das condições ambientais e qualidade dos explantes (DEBERGH et al., 1992).

Os sintomas mais típicos são: o encurtamento dos internódios, formação de rosetas, espessamento dos pecíolos, folhas quebradiças, alongadas, espessas, translúcidas, curvadas ou enrugadas, com superfície reduzida ou hipertrofiada (DEBERGH et al., 1992). A cor das folhas é de um verde mais escuro, brilhante e translúcido (PÂQUES, 1991). Embora estes sejam os sintomas mais comuns, não há uma regra exata que possa ser utilizada em todos os casos. Outros critérios como folhas quebradiças ou não, suculentas ou não, etc, também são utilizados. Porém, deve ficar claro que estes sintomas podem ou não aparecer conjuntamente (PÂQUES, 1991).

A atividade fisiológica de plantas anormais, depende tanto do estágio como do tipo de vitrificação. No início do processo, parece haver hiperatividade com maior produção de gemas e biomassa. Entretanto, com o passar do tempo, há um decréscimo na proliferação das gemas e estas podem tornar-se necróticas. Porém, o processo é reversível (PÂQUES, 1991).

Até o momento, muitos agentes têm sido considerados indutores da hiperhidria, como o excesso de umidade relativa nos recipientes, concentração elevada de citocininas, etileno, desbalanço nutricional e tipo de agente gelificante (ZIV, 1991; LESHEM et al., 1988; PHAN, 1991; DEBERGH et al., 1992 e PÂQUES, 1991).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local da experimentação

Os experimentos foram instalados no Laboratório de Fisiologia das Árvores, do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), localizada no município de Piracicaba - SP.

3.2. Condições Ambientais

Os experimentos foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16/8 horas (Luz/Escuro) a $37,5 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ fornecida por luz branca fria localizada 30 cm acima do nível de cada prateleira, provenientes de duas lâmpadas de 110 W cada uma, modelo H.O. marca Sylvania. A temperatura foi mantida entre 20°C e 30°C.

3.3. Fonte de Explantes e Desinfecção

3.3.1. Progênies

Foram usados ápices caulinares de "seedlings" germinados *in vitro*, sob condições estéreis, a partir de sementes provenientes de sete matrizes (1, 2, 3, 4, 94 e 96) de *Eucalyptus saligna* localizadas no Horto Florestal de Itatinga, pertencente à Universidade de São Paulo. Entretanto, apesar de todas as matrizes possuírem os padrões de características típicos da espécie *E. saligna*, suas progênies podem ter sido formadas a partir de cruzamentos com matrizes de *E. botryoides*, segundo BÁEZ (1994).

A desinfecção das sementes foi feita através da lavagem em água corrente por 15 min. Em seguida, foram transferidas para solução de detergente comercial a 15%

(V/V) onde ficaram sob agitação por 10 min. Depois, foram transferidas para solução de hipoclorito de sódio comercial (1 a 2% de Cl ativo) à 50% (V/V), onde permaneceram por 20 min. Decorrido o tempo e, em câmara de fluxo laminar, foram lavadas três vezes em água destilada/autoclavada e inoculadas em 10 ml de meio de cultura MSA sólido só com sais inorgânicos, contidos em tubos de ensaio de 25 mm x 150 mm, tapados com tampas plásticas tipo "BELLCO". Em cada tubo de ensaio foram colocadas de duas a cinco sementes, num total de trinta tubos por progênie.

A germinação das sementes ocorreu em aproximadamente sete dias e as progênies foram identificadas como P1, P2, P3, P4, P5, 94 e 96. Destas progênies, apenas a de nº 94 foi considerada como representante típico da espécie *E. saligna*, segundo o trabalho de BÁEZ (1994).

Os "seedlings" mais vigorosos, de cada progênie, com aproximadamente trinta dias de idade, tiveram suas raízes removidas e os ápices caulinares com um par de folhas foram utilizados como explantes. Os explantes foram inoculados no meio de indução de gemas no dia nove de setembro de 1993. O número de genótipos por progênie foi variável, sendo portanto, considerados clones de progênies. O meio usado para indução de gemas foi o MSA completo + 0,3 mg/l BA ($1,33 \mu\text{M}$) + 0,1 mg/l de ANA ($0,54 \mu\text{M}$) + 30 g/l de sacarose ($81,97 \mu\text{M}$) + 4 g/l de "ágar chileno". Os explantes foram subcultivados a cada 3 semanas durante quatro meses.

Após este período, quando o material já estava estabelecido, foi transferido para meio de multiplicação MSA Completo + 0,5 mg/l de BA ($2,22 \mu\text{M}$) + 4 g/l de "ágar chileno" + 30 g/l de sacarose ($81,97 \mu\text{M}$), sendo subcultivados a cada quatro semanas, até a data de Instalação do Experimento I.

3.3.2. Clone

Além dos clones formados a partir das sete progênies de material juvenil, foi utilizado mais um clone de *E. saligna*, obtido a partir de uma matriz adulta, selecionada pelo setor de melhoramento da CHANFLORA AGRÍCOLA LTDA.

Após passar por um período de rejuvenescimento, foram extraídos os segmentos nodais que foram inoculados, segundo CORREIA (1993), sobre o meio JADS em dezoito de outubro de 1990. O clone foi identificado como s2/90.

Os explantes permaneceram em meio de multiplicação JADS semi-sólido, por um período de 20 meses, quando então foram transferidos para o meio de multiplicação MSA-Completo (semi-sólido) + 0,5 mg/l de BA (2,22 μ M) + 30 g/l de sacarose (87,6 μ M); onde permaneceram até a data de instalação do experimento I. O material foi subcultivado a cada três semanas e passou a ser identificado como ES.

3.4. Meios de Cultura

A composição básica do meio de cultura MSA, foi desenvolvida a partir de informações de campo, disponíveis na literatura, sobre aspectos nutricionais do *E. saligna*, e modificada para MSA-1 após testes preliminares com os clones de *E. saligna*. A composição destes dois meios de cultura, do meio MS (1962) e JADS (1989) são apresentados na Tabela 3.

No meio MSA-1, as concentrações de N-total e de NO_3^- foram aumentadas e a concentração de NH_4^+ reduzida, em relação ao meio MSA. Porém, as concentrações dos demais macronutrientes, foram elevadas aos níveis do JADS (1989), utilizado por CORREIA (1993). As concentrações de micronutrientes foram as mesmas, tanto no meio MSA como no MSA-1 exceto para o ferro, cuja concentração foi elevada aos níveis utilizados no meio JADS (1989). Estas modificações proporcionaram melhores resultados do que aqueles obtidos no meio MSA original.

Tabela 3 - Composição dos meios de cultura envolvidos neste trabalho

MACRONUTRIENTES				
	(mM)			
ÍON	MS(1962)	MSA	MSA-1	JADS(1989)
NH ₄ ⁺	20,61	12,66	11,38	4,05
NO ₃ ⁻	39,40	26,16	29,38	22,05
K ⁺	20,04	9,00	10,50	11,00
PO ₄ ³⁻	1,25	1,50	3,00	3,00
Ca ²⁺	3,00	3,00	5,10	5,00
Mg ²⁺	1,50	2,00	3,00	3,00
SO ₄ ²⁻	1,73	2,17	3,27	3,30
Cl ⁻	6,00	0,00	0,00	0,00
N-TOTAL	60,01	38,82	40,76	26,10
NH ₄ ⁺ /NO ₃	1/1,91	1/2,06	1/2,58	1/6,44
TOTAL	93,73	56,58	65,81	57,60
MICRONUTRIENTES				
	(μM)			
ÍON	MS(1962)	MSA	MSA-1	JADS(1989)
Fe ²⁺	99,99	99,99	199,98	199,98
BO ₃ ⁻	100,30	60,00	60,00	50,14
Zn ⁺	29,91	15,09	15,09	15,02
Cu ⁺	0,70	5,01	5,01	5,01
Mn ⁺	99,99	50,00	50,00	75,80
MoO ₄ ²⁻	1,03	1,03	1,03	0,62
Co ²⁺	0,11	1,05	1,05	1,05
I ⁻	5,00	0,50	0,50	-
TOTAL	337,03	232,67	332,66	347,62
ORGÂNICOS				
	(μM)			
ÍON	MS(1962)	MSA	MSA-1	JADS(1989)
m-inositol	555,06	555,06	555,06	555,06
Tiamina-HCl	0,30	5,93	5,93	14,83
Piridoxina-HCl	2,43	4,86	4,86	2,43
Ac. nicotínico	4,06	8,12	8,12	4,06
Pantotenato-Ca	-	2,10	2,10	5,04
L-asparagina	-	-	-	-
L-glutamina	-	13,68	13,68	998,97
L-arginina	-	11,48	11,48	40,18
L-cisteína	-	-	-	20,63
Glicina	26,64	26,64	26,64	-
TOTAL	588,49	627,87	627,87	1.641,10

- 3.5. **Experimento I:** Efeito do meio de cultura na produção de Matéria Fresca (PMF), produção de Matéria Seca (PMS), porcentagem de Matéria Seca (S%), número de gemas (NG), tamanho das gemas (TG) e ocorrência de hiperhidria.

Este experimento foi instalado entre os dias vinte e dois de março e dois de abril de 1994, sendo composto por dois tratamentos, que foram os seguintes:

Trat. A: meio MSA-1 + 0,3 mg/l de BA ($1,33 \mu\text{M}$) + 0,2 mg/l de KIN ($0,93 \mu\text{M}$) + 4 g/l de ágar comercial nacional + 30 g/l de sacarose ($81,97 \mu\text{M}$).

Trat. B: meio MS 1962 + 0,3 mg/l de BA ($1,33 \mu\text{M}$) + 0,2 mg/l de KIN ($0,93 \mu\text{M}$) + 4 g/l de ágar comercial nacional + 30 g/l de sacarose ($81,97 \mu\text{M}$).

Para cada tratamento, foram utilizados 200 frascos de comida de bebê (250 ml) modelo Weaton, com tampa modelo "BIOPLANTA". Em cada vidro foi colocado 35 ml de meio de cultura (distribuídos com auxílio de uma proveta de 100 ml).

Para preparar o meio de cultura foram utilizadas soluções estoque dos sais minerais, vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento, preparadas a partir de produtos com alto grau de pureza (P.A.). Para cada tratamento foram preparados sete litros de meio de cultura da seguinte forma:

- 1 - Medição do volume de solução estoque em proveta de 100 ml. No caso de medidas muito pequenas foram utilizadas pipetas graduadas;
- 2 - Adição de 30 g de sacarose (marca Reagen) para cada litro de meio de cultura;
- 3 - Complementação do volume com água destilada/deionizada até a metade do volume final a ser preparado;
- 4 - Ajuste do pH para 5,9 com solução 1N de KOH e/ou HCl;

- 5 - Cozimento do ágar (4 g/l) em 3,5 litros de água destilada/deionizada (metade do volume final), até o ponto de fervura;
- 6 - Mistura e homogeneização das duas metades em balde plástico com capacidade para 13 litros;
- 7 - Distribuição do meio de cultura, ainda quente, nos recipientes finais (vidros de comida de bebê);
- 8 - Autoclavagem a $120^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos sob pressão de $1,0 \text{ kg/cm}^2$.

Após a autoclavagem, os frascos foram deixados em repouso à temperatura ambiente, para geleificação do meio de cultura. Após a geleificação, foram levados para a câmara de fluxo laminar onde foi feita a inoculação dos explantes.

Os explantes iniciais foram preparados de forma a se obter o tamanho mais homogêneo possível para todas as progênies, os quais foram denominados de explantes-padrão. O peso fresco médio (PF) e o peso seco médio (PS), do explante padrão, foi de 90,65 mg e 7,98 mg, respectivamente. Estes valores foram determinados a partir de amostras retiradas de cada progênie e do clone utilizados no experimento.

Para cada uma das progênies e para o clone ES, procurou-se utilizar o mesmo número de repetições nos dois tratamentos. Porém, para as progênies P1 e P5 não foi possível devido ao número limitado de explantes disponível. A partir deste fato, a distribuição do número de explantes por recipiente ficou da seguinte forma:

- P1 → 3 explantes por vidro no trat. A e 2 no trat. B
- P2 → 5 explantes por vidro nos dois tratamentos
- P3 → 5 explantes por vidro nos dois tratamentos
- P4 → 5 explantes por vidro nos dois tratamentos
- P5 → 3 explantes por vidro nos dois tratamentos
- 94 → 5 explantes por vidro nos dois tratamentos

96 → 5 explantes por vidro nos dois tratamentos

ES → 5 explantes por vidro nos dois tratamentos

Após a inoculação, os vidros foram selados com filme de PVC, a fim de diminuir risco de contaminação e levados para a sala de crescimento, onde permaneceram sob as condições previamente descritas.

A partir da inoculação dos explantes (dia zero), a cada sete dias, durante trinta e cinco dias, foram retirados cinco vidros por tratamento, de cada uma das progênies e do clone ES, para determinação do peso fresco (PF), do peso seco (PS) e da relação S% de cada explante.

As pesagens foram realizadas em balança analítica eletro-mecânica (marca Metler) e a secagem em estufa secadora (marca FANEN modelo S 205), regulada para temperatura entre 60°C e 70°C

O procedimento adotado foi o seguinte:

- 1 - Pesagem inicial das forminhas de alumínio (tipo brigadeiro) para determinação da tara;
- 2 - Secagem externa dos explantes, em papel filtro, para retirada do excesso de meio de cultura e água;
- 3 - Determinação do peso fresco do explante + peso da forminha;
- 4 - Secagem dos explantes na estufa, por 48 horas entre 60°C e 70°C;
- 5 - Retirada dos explantes com as forminhas, da estufa e transferência para o dessecador;
- 6 - Determinação do peso seco mais peso da forminha após o esfriamento do material.

Além da quantificação da PMF, PMS e S%, ao longo do experimento, foram contados os explantes que apresentavam sintomas de hiperhidria.

A partir da quarta coleta, também foram realizadas observações de caráter qualitativo como: forma e cor das folhas, sintomas de senescência, presença de calo nas folhas e gemas e coloração dos pecíolos.

Na quinta coleta, antes da determinação do peso seco, foi escolhido um explante de cada progênie e do clone ES, para determinação do tamanho médio das gemas (TG) e do número de gemas contáveis (NG).

3.6. Experimento II: Avaliação do efeito da concentração de sacarose na produção de matéria seca (PMS), taxa de multiplicação (TM), número de gemas (NG) e tamanho das gemas(TG).

Este experimento foi instalado no dia 30 de Junho de 1994, onde foram testadas três concentrações diferentes de sacarose, no meio de cultura MSA-1 semi-sólido (4 g de agar nacional/l) acrescido de 0,6 mg/l de BA (2,66 μ M); 0,1 mg/l de ANA (0,54 μ M). A metodologia para preparo do meio de cultura foi semelhante a do experimento I. Os tratamentos foram os seguintes:

Trat. A: MSA-1 + 10 g/l (29,2 mM) de sacarose

Trat. B: MSA-1 + 20 g/l (58,4 mM) de sacarose

Trat. C: MSA-1 + 30 g/l (87,6 mM) de sacarose

Em cada um dos tratamentos, foram utilizadas duas repetições (2 vidros com 35 ml de meio de cultura), com cinco explantes em cada vidro. Os explantes vieram das mesmas 7 progênies e do clone ES utilizados no experimento I, cultivados no meio de cultura MSA-1 mais 0,5 mg/l de BA. O peso seco médio (PS) dos explantes-

padrão, foi de 11,93 mg. Após trinta dias de cultivo, cada explante foi normalmente subdividido, onde foram eliminados os tecidos e órgãos danificados, de forma a produzir novos explantes semelhantes ao explante-padrão inicialmente utilizado. Esta subdivisão foi realizada a fim de determinar a taxa de multiplicação ao final de trinta dias de cultivo. Após a subdivisão, foram contadas as gemas em cada uma dos novos explantes formados, e medido o comprimento destas gemas, em papel milimetrado.

Uma vez determinada a taxa de multiplicação (TM), número de gemas (NG) e comprimento das gemas (TG), estes novos explantes, formados a partir do explante-padrão, foram novamente reunidos, para determinação da produção de matéria seca (PMS). A metodologia utilizada foi semelhante a do Experimento I. Esta PMS foi denominada de matéria seca útil, pois os resíduos (folhas danificadas e calos) foram eliminados no processo de subdivisão, sendo portanto diferente da PMS obtida no experimento I.

3.7. Delineamento Estatístico

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, tanto no Experimento I como no Experimento II.

No experimento I, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey para as variáveis PMF, PMS, TG e NG.

Para a avaliação da ocorrência de hiperhidria, foi aplicado o teste do qui-quadrado (X^2) e testes de probabilidades.

Com relação a forma e cor das folhas, sintomas de senescência, presença de calo nas folhas e gemas e coloração dos pecíolos, não foi aplicada nenhuma análise estatística.

No experimento II, foi aplicada a ANOVA e o teste de Tukey para as variáveis PMS, TM, TG e NG.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. **Experimento I:** Efeito do meio de cultura na produção de Matéria Fresca (PMF), produção de Matéria Seca (PMS), porcentagem de Matéria Seca (S%), número de gemas (NG), tamanho das gemas (TG).

4.1.1. Produção de matéria fresca (PMF), produção de matéria seca (PMS) e S%

Os resultados da análise de variância para a produção de matéria fresca (PMF), produção de matéria seca (PMS) e da porcentagem de matéria seca por explante (S%), são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para PMF, PMS e S% de progênies/clone de *E.saligna*, na fase de multiplicação de gemas, durante 35 dias

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios		
		PMF	PMS	S%
Meio	1	0,0427 ^(ns)	0,01945 ^{**}	281,90269 ^{**}
Genótipo	7	1,3507 ^{**}	0,01117 ^{**}	36,3907 ^{**}
Meio x Genótipo	7	0,2965 [*]	0,00261 ^(ns)	10,3161 ^{**}
Resíduo	267	0,1418	0,0018	1,793
F		5,48 ^{**}	4,27 ^{**}	25,06 ^{**}
C.V. (%)		42,46	40,63	11,07
Média geral	(mg)	886,83	103,67	12,09

(n.s.) não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

^{**} significativo pelo teste F, a 1% de probabilidade.

^{*} significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

(PMF) → produção de matéria fresca

(PMS) → produção de matéria seca

(S%) = $[PMS/PMF] \times 100$

Através dos coeficientes de variação experimental (Tabela 4), nota-se uma boa amplitude de variação dos dados coletados, tanto para a variável PMF (C.V. 42,46%), como para a variável PMS (C.V. 40,63%). A maior amplitude obtida para a PMF em relação a PMS, está de acordo com os resultados obtidos, com *E. grandis*, por CORREIA (1993).

Comparando os coeficientes de variação (CV) (Tabela 4), para PMF (42,46%) e PMS (40,63%), com aqueles obtidos por CORREIA (1993) (38,1% e 14,4% respectivamente) para *E. grandis*, estes foram 4,36% e 26,23%, respectivamente maiores para o *E. saligna*. Entretanto, comparando a variabilidade de genótipos utilizados neste trabalho (7 progênies e 1 clone) com a do trabalho de CORREIA (1993) (4 clones), estes resultados podem ser considerados satisfatórios. Deve-se ainda considerar, que o C.V. obtido por CORREIA (1993) para a PMS partiu dos dados transformados para $\ln x + 0,5$.

O C.V. obtido para a variável S% (11,07%) pode ser considerado médio, segundo GOMES (1987), indicando que esta relação entre PMS e PMF permaneceu dentro de uma faixa de variação não muito ampla. A média obtida foi de 12,09% (Tabela 4).

Os níveis de significância (Tabela 4), mostram que apenas as variáveis PMS e S% diferiram estatisticamente pelo teste F ($p < 0,01$), com relação aos tratamentos. Porém, o efeito dos genótipos foi altamente significativo pelo teste F ($p < 0,01$) para as três variáveis analisadas. A interação genótipo x meio de cultura, apresentou diferença significativa pelo teste F ($p < 0,05$) para PMF e diferença altamente significativa ($p < 0,01$) pelo mesmo teste para S%. Para a PMS, não houve diferença significativa pelo teste F ($p > 0,18$).

Como o objetivo principal deste trabalho foi o de comparar a eficiência dos meios de cultura, não foi realizado o desdobramento dos dados, para estudar com

detalhes o efeito da interação genótipo x meio de cultura. Entretanto, os resultados obtidos com a ANOVA (Tabela 4), para os níveis de significância adotados, sugerem que os genótipos que apresentaram maiores médias no tratamento A, para variável PMS, também deverão ser os mais produtivos no Tratamento B, pois não houve interação significativa entre meio de cultura e genótipo, para esta variável.

As médias gerais obtidas para PMF, PMS e S% foram 886,83 mg, 103,67 mg e 12,09% respectivamente (Tabela 4). Entretanto, o tratamento A proporcionou maiores médias para as variáveis PMS e S% em relação ao tratamento B. Para a PMF, ocorreu o inverso. Porém, só ocorreram diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para a PMS e S% (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação dos valores médios obtidos para a PMF, PMS e S% nos dois meios de cultura, aos 35 dias de cultivo.

Meio de Cultura	PMF (mg)	PMS (mg)	S%
MSA-1	864,50 A	110,91 A	13,20 A
MS	910,00 A	96,17 B	10,94 B

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

(PMF) → produção de matéria fresca

(PMS) → produção de matéria seca

O tratamento A, produziu em média 14,74 mg (15,33%) a mais de matéria seca por explante do que o tratamento B. Isto significa que a composição do MSA-1 foi melhor ajustada ou mais adequada, do que a do MS para a PMS dos genótipos de *E.saligna*.

Considerando o maior valor obtido para o tratamento A, para S%, pode-se dizer que houve maior concentração de matéria seca para uma mesma quantidade de água incorporada aos tecidos, em relação ao tratamento B.

Tabela 6 - Taxa média de crescimento relativo (TCR) em relação a PMS.

Período (dias)	TCR para PMS	
	MEIO DE CULTURA	
	Trat. A	Trat. B
0 - 7	14,51	15,38
7 - 14	9,17	9,68
14 - 21	8,67	6,73
21 - 28	3,59	1,65
28 - 35	1,93	2,06
MÉDIA	7,57	7,10

$$(TCR) = \frac{\ln P2 - \ln P1}{t2 - t1} \times 100$$

(PMS) → produção de matéria seca

(MSA-1) → meio de cultura do Trat. A

(MS) → meio de cultura do Trat. B

A TCR (Tabela 6), mostra que as maiores taxas de crescimento ocorreram nos sete primeiros dias, independentemente do meio de cultura utilizado, estando de acordo com os resultados obtidos por CORREIA (1993).

O tratamento A permitiu uma TCR mais equilibrada até o 21º dia em relação ao tratamento B, indicando provavelmente que o equilíbrio nutricional no meio de cultura MSA-1 foi mantido por maior período de tempo. A diferença entre o primeiro período de crescimento (0 - 7 dias) e o terceiro (14 - 21 dias), foi de apenas 5,84 no tratamento A, enquanto no tratamento B foi de 8,65. Entretanto, apesar do tratamento B possibilitar uma maior TCR no primeiro período (0 - 7 dias), ao final de 35 dias, a TCR no tratamento A foi ligeiramente superior (7,10 e 7,57, respectivamente).

Tabela 7 - Comparação dos valores médios da PMF, PMS e S% aos 35 dias.

Progênie /clone	PMF (mg)		PMS (mg)		S%	
	TRAT. A	TRAT. B	TRAT. A	TRAT. B	TRAT. A	TRAT. B
P1	1084,00 AB	644,00 C	146,90 A	82,10 B	14,27 A	14,75 A
P2	982,00 ABC	984,00 BC	115,80 AB	103,80 AB	12,06 D	10,62 BCD
P3	974,00 ABC	832,00 BC	117,50 AB	88,80 B	12,31 CD	10,99 BC
P4	621,00 C	787,00 BC	87,00 B	90,60 B	14,12 AB	11,73 B
P5	1209,00 A	1461,00 A	149,94 A	142,30 A	12,28 CD	9,45 D
P94	606,00 C	697,00 BC	86,10 B	79,00 B	14,53 A	11,41 BC
P96	906,00 ABC	1078,00 AB	113,90 AB	105,50 AB	12,76 BCD	10,03 CD
ES	750,00 BC	854,00 BC	100,6 B	86,80 B	13,51 ABC	10,22 CD

- Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

(PMF) → produção de matéria fresca

(PMS) → produção de matéria seca

(S%) → $[PMS/PMF] \times 100$

Pela análise da Tabela 7, pode-se concluir que todas as progênies, com exceção da progênie 4, e o clone ES apresentaram maiores médias para a PMS no tratamento A. Isto significa que o meio de cultura MSA-1 foi mais favorável que o MS para o cultivo de 87,5% dos genótipos de *E. saligna* utilizados neste trabalho, em relação a PMS.

A maior média para PMS, no tratamento A, foi apresentada pela progênie P5, a qual não diferiu significativamente das progênies P1, P2, P3 e 96, pelo teste Tukey ($p > 0,05$). No tratamento B a maior média, para PMS, foi apresentada também pela progênie P5, a qual não diferiu significativamente das progênies P1, P2 e 96, pelo

teste Tukey ($p > 0,05$). A menor média para PMS, no tratamento A, foi apresentada pela progênie 94, não diferindo significativamente das progênies P2, P3, P4, 96 e do clone ES, pelo teste Tukey ($p > 0,05$). No tratamento B a média mais baixa para a PMS ocorreu também na progênie 94, a qual não diferiu significativamente pelo teste Tukey ($p > 0,05$) das progênies P2, P3, P4, 96 e do clone ES.

Segundo LEIFERT et al. (1992), a absorção de nutrientes no meio de cultura é influenciada pelo número de explantes dentro de cada recipiente. A absorção de cada explante individualmente, aumenta quando há maior disponibilidade de meio de cultura. Ou seja, quanto menor o número de explantes por unidade de meio de cultura, maior a quantidade de nutrientes absorvidos pelos explantes individualmente.

Considerando portanto, que uma maior absorção de nutrientes poderia induzir maiores valores para a PMF e PMS, dentro do mesmo tratamento, os valores encontrados nas progênies P1 e P5, não podem ser considerados para efeito comparativo com as demais progênies e o clone ES, pois possuíam quantidades diferentes de explantes. Portanto, estas progênies serão excluídas das demais análises comparativas dentro de cada tratamento. Entretanto, para efeito de comparação entre os tratamentos, o número de explantes dentro dos recipientes não deve ter interferido nos resultados (Tabela 7).

Com relação à variável S%, a progênie que apresentou maior média, no tratamento A, foi a 94, não diferindo significativamente pelo teste Tukey ($p > 0,05$) da progênie P4 e do clone ES. No tratamento B, a maior média foi apresentada também pela progênie 94, não diferindo significativamente das demais progênies e do clones ES. A menor média da variável S% no tratamento A, foi apresentada pela progênie P2, não diferindo significativamente pelo teste Tukey ($p > 0,05$) das progênies P3, e 96. No tratamento B, a menor média também ocorreu na progênie P2, não diferindo significativamente das demais progênies e do clone ES. Apenas a progênie P1

apresentou média maior no tratamento B. Porém, a diferença a favor do tratamento B, para esta progênie, foi bem inferior às obtidas a favor do tratamento A para outras progênies e para o clone ES.

Tabela 8 - Comparação dos valores médios de PMF, PMS e S%, após 35 dias de cultivo, independente dos tratamentos

Progênie/clone	PMF (mg)	PMS (mg)	S%
P1	898,70 BC	119,60 AB	14,47 A
P2	983,00 B	109,80 BC	11,34 C
P3	906,90 BC	103,90 BC	11,69 C
P4	706,50 BC	88,90 BC	12,90 B
P5	1.334,80 A	145,80 A	10,87 C
94	651,60 C	82,60 C	12,97 B
96	989,60 B	109,80 BC	11,43 C
ES	801,80 BC	93,70 BC	11,87 C

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A maior média para a PMF ocorreu na progênie 96 (989,60 mg), não diferindo porém, pelo teste Tukey ($p > 0,05$), das progênies P2, P3, P4 e do clone ES. A menor média ocorreu na progênie 94 (651,60 mg), a qual não diferiu significativamente pelo teste Tukey ($p > 0,05$) das progênies P3, P4 e do clone ES (Tabela 8).

Para a variável PMS, as maiores médias ocorreram nas progênies P2 e 96 (109,80 mg), não diferindo significativamente, pelo teste Tukey ($p > 0,05$), das progênies P2, P3, P4 e do clone ES. A menor média também ocorreu na progênie 94 (82,60 mg), não diferindo porém, significativamente, das demais progênies e do clone ES (Tabela 8).

O maior valor para a variável S%, ocorreu na progênie 94 (12,97%), não diferindo significativamente da progênie P4, pelo teste Tukey ($p > 0,05$). A menor média, foi apresentada pela progênie P2, a qual não diferiu significativamente pelo teste Tukey ($p > 0,05$) das progênies P3, 96 e do clone ES (Tabela 8).

Tabela 9 - Taxas médias de crescimento relativo (TCR), no período de 0 a 35 dias, em relação ao PMS.

Progênie/clone	TCR		Média
	TRAT. A	TRAT. B	
P1	8,32	6,65	7,49
P2	7,63	7,33	7,49
P3	7,69	6,89	7,29
P4	6,91	6,94	6,93
P5	8,37	8,23	8,30
94	6,80	6,59	6,70
96	7,60	7,38	7,49
ES	7,24	6,82	7,03

$$(TCR\%) = \frac{\ln P2 - \ln P1}{t2 - t1} \times 100$$

(TRAT. A) → meio de cultura do Trat. A

(TRAT. B) → meio de cultura do Trat. B

Na Tabela 9, observa-se que, no tratamento A, a progênie com maior TCR (P3) atingiu 7,69 e no tratamento B (progênie 96) 7,38. Na média, o maior valor para a TCR foi de 7,49 (P2 e 96). O menor valor obtido no tratamento A (progênie 94), foi de 6,80, e no tratamento B (progênie 94) 6,59. Na média, o menor valor (progênie 94) foi de 6,70.

Os resultados obtidos para PMS e TCR, sugerem que a progênie 94 deve ser a representante típica da espécie *E.saligna* e as progênies mais produtivas prováveis

híbridos entre *E.saligna* x *E.botryoides*, pois, segundo informações de campo fornecidas pelo Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, os híbridos de *E.saligna* x *E.botryoides* são mais produtivos e menos exigentes em relação à fertilidade do solo. E a matriz 94 que forneceu as sementes da progênie 94, era a que se encontrava mais distante das árvores de *E. botryoides* (BAEZ, 1994).

Pela análise de variância apresentada na Tabela 4, ficou evidente a influência do genótipo e do meio de cultura na PMS. Porém, a interação genótipos x meio de cultura, não foi significativa. Entretanto, a seqüência das progênes mais eficientes na PMS (Tabela 7) foi diferente em cada um dos tratamentos, o que indica a necessidade de maiores estudos sobre a influência da interação genótipo x meio de cultura para esta variável.

Considerando que, para as progênes P1 e P5, foi utilizada uma menor quantidade de explantes para uma mesma quantidade de meio de cultura, foi estudada a relação entre disponibilidade de meio de cultura e número de explantes (Tabela 10).

Tabela 10 - Matéria seca produzida ao final de 35 dias, em relação à disponibilidade de meio de cultura por explante..

Progênie/ clone	nº explantes/ 35 ml de meio		PMS (mg) / ml de meio	
	TRAT. A	TRAT. B	TRAT. A	TRAT. B
P1	3	2	11,91	4,24
P2	5	5	15,40	13,69
P3	5	5	15,64	11,55
P4	5	5	11,28	11,80
P5	3	3	12,25	11,51
94	5	5	11,16	10,15
96	5	5	15,13	13,93
ES	5	5	13,23	11,26
MÉDIA	4,5	4,38	13,25	11,02

(PMS) → Produção de matéria seca

Apesar das progênies P1 e P5 apresentarem as maiores médias para PMS (Tabela 8), não foram as mais produtivas com relação à disponibilidade do meio de cultura por explante (Tabela 10). Seria de se esperar, que a progênie P1 fosse a mais produtiva, devido à maior disponibilidade de meio de cultura por explante. Porém, é preciso verificar se todo meio de cultura esteve realmente disponível para os explantes, pois, segundo CORREIA (1993), a presença de ágar no meio de cultura pode prejudicar a difusão de nutrientes.

Considerando a proposição feita por TEASDALE (1987), que cada ml de meio de cultura deve ser suficiente para produzir 15 mg de matéria seca e, que tanto o meio de cultura MSA-1 como o MS contém quantidades de nutrientes suficientes para a produção de 15 mg/l de matéria seca de *E.saligna*; o MSA-1 se mostrou mais ajustado para o cultivo do *E.saligna*, no período de 35 dias.

Na média geral, a PMS/ml de meio de cultura foi 2,23% maior no meio de cultura MSA-1, do que no meio MS. No meio MSA-1, as progênies P2, P3 e 96 ultrapassaram a quantidade mínima estabelecida (15 mg/ml), enquanto que no meio de cultura MS, a progênie que chegou mais próxima foi a 96, mas ficou abaixo do mínimo estabelecido (15 mg/ml). No meio de cultura MSA-1, a progênie que apresentou produção mais baixa (94), ficou em torno de 1/4 abaixo do mínimo esperado (15 mg/ml). Já no meio de cultura MS, a progênie que apresentou produção mais baixa (P1), produziu menos da metade do mínimo esperado (15 mg/ml).

As maiores médias para PMS, obtidas no tratamento A em relação ao tratamento B (Tabela 7), sugerem que a composição do meio de cultura MSA-1 foi mais adequada para o cultivo de seis das sete progênies de *E.saligna*, e para o clone ES.

Em relação ao meio de cultura MS, o meio de cultura MSA-1 contém menor concentração total de macronutrientes, menor concentração de N-total, menor relação $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ e menor quantidade de Cl. A concentração total de micronutrientes do MSA-1 é semelhante ao MS, porém, a concentração de compostos orgânicos é maior.

Segundo MALAVOLTA et al. (1989), os teores médios dos macroelementos considerados adequados em tecidos sadios de *E. saligna* são, em porcentagem: N = 1,5; P = 0,11; K = 1,10; Ca = 1,0; Mg = 0,45 e S = 0,18. As concentrações utilizadas por MIYASAKA et al. (1987), para cálculo da DRIS em *E. saligna* foram as seguintes, em porcentagem: N = 1,22; P = 0,14; K = 1,09; Ca = 0,57; Mg = 0,27 e S = 0,12. A média destes dois valores proporciona o seguinte resultado: N = 1,36; P = 0,13; K = 1,10; Ca = 0,79; Mg = 0,36 e S = 0,15.

Para a comparação das relações encontradas nos dois meios de cultura, com os valores obtidos acima, foi necessária a conversão das concentrações dos macronutrientes, nos meios de cultura, de mM para mg, obtendo-se os seguintes valores:

MSA-1 → N(571,04), P(93,00), K(410,55)
 → Ca(204,41), Mg(72,93), S(104,83)
 MS → N(840,74), P(31,00), K(783,56)
 → Ca(120,24), Mg(36,47), S(55,46)

A partir dos valores acima, foi elaborada a Tabela 11, a fim de permitir a comparação dos desvios das relações consideradas adequadas ao *E. saligna*, em relação aos valores encontrados nos meios de cultura MSA-1 e MS.

Os resultados da Tabela 11, permitem observar maiores desvios em relação ao meio de cultura MS, do que em relação ao MSA-1. No meio de cultura MS, os desvios somam um total de 84,74 em valores absolutos e 26,78 no MSA-1. No meio de cultura MS, a soma dos desvios das relações, com valores acima daqueles considerados adequados, foi superior a dos desvios abaixo dos valores considerados adequados (79,34 e 5,40, respectivamente). Entretanto, no meio de cultura MSA-1, a soma dos desvios das relações abaixo dos valores considerados adequados foi superior a dos desvios acima dos valores considerados adequados (16,37 e 10,41, respectivamente).

Tabela 11 - Comparação dos desvios das relações de macronutrientes consideradas adequadas para o *E.saligna*, em relação aos meios de cultura

..... %

Relação	<i>E.saligna</i>	MSA-1	d (MSA-1)	MS	d (MS)
N/P	10,46	6,14	-4,32	27,12	+16,66
N/K	1,24	1,39	+0,15	1,07	-0,17
N/Ca	1,72	2,79	+1,07	6,99	+5,27
N/Mg	3,78	7,83	+4,05	23,05	+19,27
N/S	9,07	5,45	-3,62	15,16	+6,09
P/K	0,12	0,23	+0,11	0,04	-0,08
P/Ca	0,16	0,45	+0,29	0,26	+0,10
P/Mg	0,36	1,28	+0,92	0,85	+0,49
P/S	0,87	0,89	+0,02	0,56	-0,31
K/Ca	1,39	2,01	+0,62	6,52	+5,13
K/Mg	3,06	5,63	+2,57	21,49	+18,43
K/S	7,33	3,92	-3,41	14,13	+6,80
Ca/Mg	2,19	2,80	+0,61	3,30	+1,10
Ca/S	5,27	1,95	-3,32	2,17	-3,10
Mg/S	2,40	0,70	-1,70	0,66	-1,74

d → desvio

O maior desvio em valor absoluto, no meio de cultura MS, foi apresentada pela relação N/Mg. Em ordem decrescente, os resultados dos desvios foram os seguintes: N/Mg > K/Mg > N/P > K/S > N/S > N/Ca > K/Ca > Ca/S > Mg/S > Ca/Mg > P/Mg > P/S > N/K > P/Ca > P/K. Estes resultados, sugerem que deve haver excessos de N e K, déficit de P, Ca e Mg e níveis relativamente adequados de S, em relação aos níveis considerados adequados para o *E.saligna*, segundo MALAVOLTA et al. (1989) e MIYASAKA et al. (1987).

No meio de cultura MSA-1, o maior desvio em valor absoluto ocorreu na relação N/P. Em ordem decrescente, os resultados dos desvios, foram os seguintes: N/P

> N/Mg > N/S > K/S > Ca/S > K/Mg > Mg/S > N/Ca > P/Mg > K/Ca > Ca/Mg > P/Ca > P/K. Os resultados sugerem excesso de N, P e S e déficit de K, Ca e Mg, em relação aos níveis considerados adequados para o *E. saligna*, segundo MALAVOLTA et al. (1989) e MIYASAKA et al. (1987).

Em relação aos micronutrientes, as concentrações em ppm consideradas adequadas para o Eucalipto, segundo MALAVOLTA et al. (1989) são: B(45); Cu(9,00); Fe(175,00); Mn(450,00); Mo(0,75) e Zn(0,50). Segundo FERREIRA & DA CRUZ (1991), as concentrações em ppm consideradas adequadas para o *E. saligna* são: B(26), Cu(6), Fe(74), Mn(398) e Zn(37). A média destes valores fornece o seguinte resultado: B(34), Cu(7,67); Fe(127,66); Mn(491,33), Mo(0,75) e Zn(43,67).

Da mesma forma que para os macronutrientes, os valores dos micronutrientes nos meios de cultura foram transformados de μM para μg , resultando nos seguintes valores em ppm:

MSA-1 → B(648,60), Cu(318,34), Fe(11168,88),
 → Mn(2747,00), Mo(98,82) e Zn(986,43)

MS → B(10060,00), CU(44,48), Fe(5584,44)
 → Mn(5593,45), Mo(98,82) e Zn(1955,22)

A partir dos valores acima, foi elaborada a Tabela 12 com os desvios das relações dos micronutrientes dos meios de cultura, em relação aos valores considerados adequados ao *E. saligna*.

Os resultados da Tabela 12, permitem verificar que, em valores absolutos, a soma dos desvios encontrados no meio de cultura MS é superior àquela encontrada no MSA-1. No MS, o total dos desvios somam 949,42 e no MSA-1 681,35. No meio de cultura MS, os valores dos desvios, acima dos valores considerados adequados, somam

286,57 e no MSA-1 12,66. Os desvios considerados abaixo do indicado somam 662,85 no MS e 675,69 no MSA-1.

TABELA 12 - Comparação dos desvios das relações de micronu-trientes consideradas adequadas para o *E.saligna*, em relação aos meios de cultura

.....ppm					
Relação	<i>E.saligna</i>	MSA-1	d (MSA-1)	MS	d (MS)
B/Cu	4,43	2,04	-2,39	226,17	+221,74
B/Fe	0,27	0,06	-0,21	1,80	+1,53
B/Mn	0,08	0,24	+0,16	1,80	+1,72
B/Mo	45,33	6,56	-31,77	101,80	+56,47
B/Zn	0,70	0,66	-0,12	5,15	+4,37
Cu/Fe	0,06	0,03	-0,03	0,01	-0,05
Cu/Mn	0,02	0,12	+0,10	0,01	-0,01
Cu/Mo	10,23	3,22	-9,01	0,45	-9,78
Cu/Zn	0,18	0,32	+0,14	0,02	-0,16
Fe/Mn	0,29	4,07	+3,78	1,00	+0,71
Fe/Mo	170,21	113,02	-57,19	56,51	-113,70
Fe/Zn	2,92	11,32	+8,40	2,86	-0,06
Mn/Mo	588,44	27,80	-560,64	56,60	-531,84
Mn/Zn	10,11	2,78	-7,33	2,86	-7,25
Mn/Zn	0,02	0,10	+0,08	0,05	+0,03

d - desvio

O maior desvio em valor absoluto no meio de cultura MS, ocorreu na relação Mn/Mo. Em ordem decrescente, o resultado dos desvios foi o seguinte: Mn/Mo > B/Cu > Fe/Mo > B/Mo > Cu/Mo > Mn/Zn > B/Zn > B/Mn > B/Fe >

$\text{Fe/Mn} > \text{Cu/Zn} > \text{Fe/Zn} > \text{Cu/Fe} > \text{Mo/Zn} > \text{Cu/Mn}$. Estes resultados sugerem que deve haver excesso de B, Mo e Zn e déficit de Fe, Mn e Cu, em relação aos valores considerados adequados ao *E. saligna*, segundo MALAVOLTA et al. (1985) e FERREIRA & DA CRUZ (1991).

No MSA-1, o maior desvio ocorreu também na relação Mn/Mo e foi superior ao do meio de cultura MS. Em ordem decrescente, o resultado foi o seguinte: $\text{Mn/Mo} > \text{Fe/Mo} > \text{B/Mo} > \text{Cu/Mo} > \text{Fe/Zn} > \text{Mn/Zn} > \text{Fe/Mn} > \text{B/Cu} > \text{B/Fe} > \text{B/Mn} > \text{Cu/Zn} > \text{B/Zn} > \text{Cu/Mn} > \text{Mo/Zn} > \text{Cu/Fe}$. Os desvios sugerem excesso de Fe, Mo e Cu, e déficit de Mn, B e Zn, em relação aos valores considerados adequados ao *E. saligna*, segundo MALAVOLTA et al. (1985) e FERREIRA & DA CRUZ (1991).

O efeito das concentrações dos macronutrientes na PMS, taxa de multiplicação e outros parâmetros, não foram adequadamente estudados até o momento, com exceção do N e suas formas de absorção (NH_4^+ ou NO_3^-). Entretanto, com relação ao efeito dos micronutrientes pouco foi feito. LEE & KIRKBY (1986), obtiveram maior PMS em *P. menziessi*, quando utilizaram somente NO_3^- como fonte de nitrogênio no meio de cultura MS. EVERS (1988), obteve melhor resultado na indução de gemas, em *Alnus glutinosa* com $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ na relação 1:5. Porém, o alongamento foi melhor na relação 1:8. BARROS et al. (1990), observaram em condições de campo que *E. grandis* absorvia mais intensamente N-NH_4^+ do que N-NO_3^- . Entretanto, a máxima PMS foi obtida na presença de NO_3^- , na relação $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ de 50:50.

Considerando que, no meio de cultura MSA-1, a relação $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (1 : 2,58) foi menor que no MS (1 : 1,91), é provável que a maior PMS, neste meio de cultura, tenha sido influenciada pela relação entre NH_4^+ e NO_3^- .

O efeito relativo da concentração dos macronutrientes ficou evidente no trabalho de MURASHIGE e SKOOG (1962). Neste trabalho, os níveis de N acima de

80 mM foram prejudiciais a PMS de calo de tabaco, e os níveis mais adequados de P dependeram da concentração de K. GEORGE et al. (1988), obtiveram aumento na taxa de crescimento de *Hemerocalis* com a adição de NaH_2PO_4 ao meio de cultura MS. Muitas espécies arbóreas, mostraram necessitar de menores concentrações de K no meio de cultura (LEIFERT et al., 1991).

MENGEL & KIRKBY (1987), mencionaram a importância das concentrações relativas pois a produção resultante do aumento de um fator depende da concentração de outros fatores. O excesso de N, pode levar a um excesso de aminoácidos solúveis, os quais não podem ser usados nos processos de crescimento, devido a falta relativa de outros nutrientes. No campo, a aplicação de altas doses de NPK, diminuiu a produtividade de batata em solos com baixo potencial de produção, e aumentou em solos com alto potencial de produção.

Portanto, a menor intensidade de desvios encontrada no meio de cultura MSA-1, significa que as concentrações relativas dos nutrientes estavam mais próximas dos valores considerados adequados ao *E.saligna*, o que deve ter permitido a maior PMS em relação ao meio de cultura MS.

MENGEL & KIRKBY (1987), comentam que as maiores ocorrências de deficiência de S são observadas mais freqüentemente em condições de excesso de N ou P, onde plantas com deficiência de S apresentam relação N/S de 70/1 ou 80/1. Entretanto, como esta relação está abaixo destes valores, tanto no MSA-1 como no MS, não deve ter ocorrido deficiência de S em função da concentração de N.

FERREIRA (1991b), observou que o efeito do calcário e do gesso na PMS de milho e feijão variou de acordo com os genótipos das planta, mostrando a necessidade de diferentes combinações conforme o genótipo utilizado. Resultado este que está de acordo com aqueles obtidos neste experimento, em relação aos diferentes genótipos.

Considerando que o teste de Tukey, para comparação das médias, é uma prova exigente e que a diferença obtida entre os tratamentos A e B, para PMS, foi significativa a nível de 5% de probabilidade, os resultados obtidos podem ser de grande importância a nível econômico, pois segundo LEIFERT et al. (1992), pequenas diferenças na taxa de crescimento podem determinar se uma espécie poderá ser produzida comercialmente, a um preço competitivo.

4.1.2. Ocorrência de Hiperhidria

As avaliações permitiram verificar que, já na primeira coleta, foram observados sintomas de hiperhidria em alguns explantes (Tabela 13).

Tabela 13 - Constatação de explantes com sintomas de hiperhidria ao longo das amostragens.

	Progenie/Clone															
	P1		P2		P3		P4		P5		94	96	ES	Total		
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A		B	
Coleta																
1 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	1	
2 ^a	-	x	x	x	x	-	-	x	-	x	-	-	-	-	6	
3 ^a	-	x	-	-	x	x	-	x	x	x	-	-	-	x	7	
4 ^a	x	-	x	x	-	x	-	x	x	x	-	-	-	x	8	
5 ^a	x	x	x	x	x	x	-	-	-	x	-	-	-	x	8	
Sub total /trat.	2	3	3	3	3	3	-	3	2	5	-	-	-	3		
Total/Prg /Clone	5		6		6		3		7		-		3		-	30

A = Tratamento A B = Tratamento B

x = com sintomas - = ausência de sintomas

Pela análise da Tabela 13, das 80 amostras coletadas, 30 (37,5%) apresentaram explantes com sintomas de hiperhidria e, destas 30, 20 (66,7%) pertenciam ao tratamento B.

A progênie P5 apresentou sintomas de hiperhidria já na 1ª coleta e, as demais progênies e o clone ES a partir da 2ª coleta. Entretanto, os sintomas tornaram-se levemente mais freqüentes ao longo das coletas, provavelmente devido ao efeito acumulativo de algum ou alguns fatores de indução da hiperhidria. LESHEM et al. (1988), também notaram sintomas de hiperhidria, em seedlings de melão, após 10 dias de cultivo no meio de cultura MS semi-sólido, com progressivo aumento na intensidade dos sintomas ao longo dos sub-cultivos. No geral, a progênie P5 apresentou maior número de amostras com sintomas de hiperhidria (8,75%) e a progênie 94 e o clone ES não apresentaram amostras com estes sintomas.

Para poder analisar os efeitos dos tratamentos e dos genótipos, na indução de hiperhidria, nos explantes, foi elaborada a Tabela 14, a qual serviu de base para aplicação do teste do qui-quadrado (χ^2).

Os resultados da Tabela 14, mostram que dos 1650 explantes utilizados no experimento I, apenas 219 (13,3%) apresentaram sintomas de hiperhidria. A progênie que apresentou maior porcentagem de explantes com sintomas de hiperhidria foi a P2 (34,2%), seguida pelas progênies P5(25,2%), P3(21,5%), 96(12,9%), P1(8,5%) e P4(8,1%).

Com relação ao efeito dos tratamentos, tanto no total como em cada uma das progênies/clone, o tratamento B produziu maior porcentagem de explantes com sintomas de hiperhidria, em relação ao tratamento A (19,9% e 7,0% no total, respectivamente). No tratamento B, a maior porcentagem de explantes com sintomas de hiperhidria ocorreu na progênie P5 (48,3%) e no tratamento A na progênie P2 (25,0%).

Comparando estes resultados, com aqueles apresentados nas Tabelas 5 e 8, observa-se que as progênes P2 e P5 apresentaram as menores médias para a variável S% na média dos dois tratamentos, e o tratamento B proporcionou menor média para S%, em relação ao tratamento A. Portanto, é provável que deva haver uma correlação negativa entre a variável S% e a ocorrência de hiperhidria. Se comprovada esta relação, seria possível monitorar a probabilidade de indução da hiperhidria, através dos valores de S%.

Tabela 14 - Quantidade de explantes com sintomas de hiperhidria.

Progênie/ Clone	Total Explante	Trata- mento	Nº Expl. /Trat.	Nº Exp. com sint. p/trat.	Nº Expl. com sint. p/prog.
P1	117	A	70	4 (5,7)	10 (8,5)
		B	47	6 (12,8)	
P2	240	A	120	30 (25,0)	82 (34,2)
		B	120	52 (43,3)	
P3	209	A	111	21 (18,9)	45 (21,5)
		B	98	24 (24,5)	
P4	235	A	116	0 (0)	19 (8,11)
		B	119	19 (16,0)	
P5	127	A	69	4 (5,8)	32 (25,2)
		B	58	28 (48,3)	
94	237	A	117	0 (0)	0 (0)
		B	120	0 (0)	
96	240	A	119	0 (0)	31 (12,9)
		B	121	31 (25,6)	
ES	245	A	123	0 (0)	0 (0)
		B	122	0 (0)	
Totais	1650	A	845	59 (7,0)	219 (13,3)
		B	805	160 (19,9)	

Expl. = Explante

Trat. = tratamento

() = valor em %

Tabela 15 - Teste do X^2 para comparação do efeito dos tratamentos na formação de explantes com sintomas de hiperhidria.

	Com sintomas	Sem sintomas	TOTAIS
Tratamento A	59 (112,13)	786 (732,87)	845
Tratamento B	160 (106,82)	645 (698,18)	805
TOTAIS	219	1431	1650
GL = 1			
$X^2 = 59,55^{**}$			

GL - graus de liberdade

X^2 - qui-quadrado

Tabela 16 - Teste de x^2 para comparação do efeito dos genótipos, no surgimento de sintomas de hiperhidria.

	Com sintomas	Sem sintomas	TOTAIS
P1	10 (15,53)	107 (101,47)	117
P2	82 (31,85)	158 (208,15)	240
P3	45 (27,73)	164 (181,27)	209
P4	19 (31,18)	216 (203,82)	235
P5	32 (16,85)	95 (110,15)	127
94	0 (31,45)	237 (205,55)	237
96	31 (31,85)	209 (208,15)	240
ES	0 (32,51)	245 (212,49)	245
TOTAIS	219	1431	1650
GL = 7			
$X^2 = 200,67^{**}$			

GL - graus de liberdade

X^2 - qui-quadrado

Através do valor altamente significativo ($p < 0,001$) do χ^2 (59,55), calculado a partir da Tabela 15, para um grau de liberdade ($GL = 1$), ficou evidente o efeito dos tratamentos na indução da hiperhidria. Sendo que, o tratamento A foi menos favorável a indução da hiperhidria, do que o tratamento B.

Considerando o grande tamanho amostral do experimento I, a distribuição dos dados foi considerada como sendo próxima da curva normal (BEIGUELMAN, 1994). Portanto, foi possível estimar o intervalo de confiança, com 95% de probabilidade, da ocorrência de explantes com sintomas de hiperhidria (q) e explantes sem sintomas (p). Desta análise, obteve-se $p = 0,87$; $q = 0,13$ e $\sigma = 0,008$. Este resultado permite dizer que, num intervalo de confiança de 95%, a probabilidade de ocorrer hiperhidria nos explantes deste experimento pode variar de 11% a 15%.

Aplicando a mesma análise, para os tratamentos A e B individualmente, obteve-se $q_A = 0,07$ e $\sigma_A = 0,009$; $q_B = 0,20$ e $\sigma_B = 0,014$. O que permite dizer que, num intervalo de confiança de 95%, a probabilidade de ocorrer hiperhidria nos explantes do tratamento A pode variar de 5% a 9%, e no tratamento B de 17% a 23%.

Este resultado indica que o meio de cultura MSA-1 (tratamento A), desenvolvido para o *E.saligna*, deve ter permitido melhor interação com os diferentes genótipos, em relação aos processos metabólicos de síntese de lignina e outros diretamente envolvidos com a hiperhidria. Além do que, no meio de cultura MSA-1, a relação carbono/nitrogênio ($C/N = 0,74$) foi maior que no MS ($C/N = 0,50$) e, a relação NH_4^+/NO_3^- foi menor (0,39 e 0,52, respectivamente). Segundo GASPAR et al. (1987), a baixa relação C/N e a rápida assimilação de NH_4^+ podem aumentar o consumo de glicosídeos, desviando-os do metabolismo de síntese de lignina. E, a suculência excessiva em algumas espécies pode ser resultado do excesso de N, assim como da redução na quantidade de açúcares (TISDALE et al., 1985). Em cravo, a redução na relação NH_4/NO_3 melhorou a morfogênese. As plantas hiperhídricas perderam Ca^{2+} e

Mg²⁺ para o meio de cultura, enquanto absorviam K⁺ (Kevers et al., 1986, citados por ZIV, 1991).

Segundo ZIV (1991), o NH₄⁺ e o Ca²⁺ são os dois principais elementos, no meio de cultura MS, envolvidos no processo de hiperhidria de muitas espécies. LE ROUX & STADEN (1991), obtiveram hiperhidria em *E.saligna*, no meio MS mais 0,2 mg BA e 0,01 mg de ANA. A redução nos níveis de NH₄⁺, aumentou a lignificação e reduziu a hiperhidria em salgueiro (chorão), ameixeira e algumas espécies de cacto (Bauchense, 1981, citado por ZIV, 1991). A elevação dos níveis de Ca²⁺ reduziu a hiperhidria em várias espécies arbóreas (Kreutmeier et al., 1984, citado por ZIV, 1991).

O aumento da hiperhidria em espécies arbóreas, crescendo na concentração de NH₄⁺ do meio MS, é devido à toxidez causada nas enzimas responsáveis pela síntese de lignina (Dajim et al., citados por LESHEM et al., 1988). Em *Salix babylonica*, os sinais de hiperhidria foram observados no meio de KNOP com os níveis de NH₄⁺ do meio MS (PÂQUES, 1991).

Além do efeito do nitrogênio, outro elemento que pode ter influenciado na indução da hiperhidria é o Cu. O Cu é elemento importante no processo de síntese da lignina (MENGEL & KIRKBY, 1987; ALMEIDA et al., 1988; FERREIRA, 1991b). Altas concentrações de N podem induzir deficiência de Cu (MENGEL & KIRKBY, 1987). Em condições de campo, essa deficiência provoca a formação dos chamados "ramos aquosos" (MALAVOLTA et al., 1989).

No meio de cultura MS, além da maior concentração de N, a concentração de Cu (0,70 µM) é aproximadamente sete vezes menor que a do MSA-1 (5,01 µM). Segundo GEORGE et al. (1988), os níveis dos cátions competidores (Fe²⁺, Mn²⁺ e NH₄⁺) no MS são considerados altos, o que poderia afetar a absorção de Cu. A soma de cátions no meio de cultura MS, exceto o Cu²⁺, é de 45,38 mM e no MSA-1 de 30,20 mM. Portanto, considerando que os demais cátions possam ser potenciais competidores

do Cu^{2+} , a possibilidade da competição ocorrer no meio MS deve ser maior que no MSA-1.

Apesar da concentração dos cátions competidores do Cu^{2+} , ser maior no meio de cultura MS, deve-se ressaltar que a maior concentração de PO_4^{3-} no meio de cultura MSA-1 também poderia ser um fator prejudicial no processo de absorção do Cu^{2+} , devido à formação de precipitados insolúveis (GEORGE, 1984). Entretanto, como os íons PO_4^- possuem maior reatividade com os íons Fe^{2+} em relação ao Cu^{2+} (GEORGE, 1984) e, como a relação $\text{PO}_4^{3-}/\text{Fe}^{2+}$ do meio de cultura MSA-1 é praticamente a mesma do MS, pode-se supor que a possibilidade de formação de precipitados de Cu^{2+} com PO_4^{3-} deverá ser semelhante nos dois meios de cultura.

O potássio (K^+) e o cloro (Cl^-), também são outros elementos que podem influenciar no processo de hiperhidria dos tecidos, devido ao papel destes íons na regulação da pressão osmótica das células.

DEBERGH et al. (1992), recomendam a redução nos níveis de Cl^- para evitar o problema da hiperhidria. MENGEL & KIRKBY (1987), comentam que plantas cultivadas *in vivo* apresentam menor perda d'água quando bem nutridas com K. PÂQUES (1991), relata sobre a maior concentração de K^+ em tecidos hiperhídricos em relação a tecidos normais. A partir desta informação, o autor postula que a redução do potencial hídrico nas folhas hiperhídricas permitem a manutenção de pressão de turgor, a qual pode afetar diretamente a expansão celular vindo a formar folhas com morfologia alterada.

Desta forma, considerando que o nível de K^+ no meio de cultura MS (20,04 mM) é aproximadamente o dobro do MSA-1 (10,5 mM) que, segundo WILLIAMS (1993), a taxa de absorção de K aumenta com a elevação de sua concentração no meio de cultura e, que segundo MEZZETTI et al. (1991), após 30 dias de cultivo, 60% do K contido no meio de cultura MS é absorvido, deve-se esperar maior probabilidade de ocorrer hiperhidria no meio MS, em relação à absorção de K.

Além dos elementos minerais, outros fatores químicos podem induzir a formação de tecidos hiperhídricos. Como é o caso dos hormônios vegetais e reguladores de crescimento.

O envolvimento do etileno na formação de tecidos hiperhídricos está diretamente relacionado com as condições físicas e químicas na cultura. Seu acúmulo está relacionado à hipolignificação e mudanças nas propriedades elásticas da parede celular. Estas mudanças induzem à hiperhidria devido à redução na pressão de turgor e aumento na absorção d'água (LESHEM et al., 1988; ZIV, 1991). Entretanto, a relação entre hiperhidria, hipolignificação e síntese de etileno necessita de melhor esclarecimento, pois são poucas as informações que indicam clara relação entre hiperhidria e síntese de etileno (Deprofit et al., 1987, citados por PÂQUES, 1991).

A aplicação de inibidores da síntese de etileno, com exceção de um cultivar de cravo, não evitou a hiperhidria em cravo (Kevers et al., 1985, citados por ZIV, 1991). PHAN (1991), utilizou um precursor de síntese de etileno a fim de induzir hiperhidria em maçã, cultivada no meio de cultura MS/2. Porém, apesar da grande quantidade de etileno produzida, não houve hiperhidria.

Considerando ainda, que o etileno é um hormônio sintetizado normalmente em condições de estresse e, que altas concentrações salinas podem induzir a um estresse hídrico, o meio de cultura MS poderia ter maior probabilidade de induzir este tipo de estresse, devido sua maior concentração salina.

O ácido indolacético (AIA), considerado um dos precursores da síntese do etileno, é formado a partir do triptofano, cuja síntese depende da presença de Zn (MENGEL & KIRKBY, 1987). Portanto, seria importante verificar se maiores concentrações de Zn no meio de cultura poderiam levar a uma maior síntese de AIA e consequentemente de etileno. Se isto ocorrer de fato, o meio de cultura MS com 29,91 μM de Zn deverá produzir maior quantidade de etileno do que o MSA-1, com 15,09 μM .

Outro elemento que pode influenciar na indução de hiperhidria, nos tecidos vegetais, é o cobalto (Co), pois é tido como elemento inibitório da síntese de etileno (MENGEL & KIRKBY, 1987). DEBERGH et al. (1992), recomendam a utilização de CoCl_2 , entre outros compostos, como possíveis inibidores da hiperhidria. Portanto, é provável que a maior concentração de Co do MSA-1 ($1,05 \mu\text{M}$) em relação ao meio MS ($0,11 \mu\text{M}$), tenha diminuído a síntese endógena de etileno e também a indução da hiperhidria.

Apesar dos resultados ainda não serem conclusivos, diversos trabalhos têm demonstrado o efeito das citocininas como indutores da hiperhidria em explantes de diversas espécies. As evidências destes efeitos são bem marcantes.

O desequilíbrio entre citocinina e auxina induziu hiperhidria em cravo, enquanto a redução na concentração de AIA diminuiu a hiperhidria em coníferas, somente quando foram reduzidos os níveis de cinetina (Leshem, 1983 e Deneso, 1987, citados por ZIV, 1991).

LESHEM et al. (1988), testaram o efeito de BA e AIA em meio de cultura MS líquido e sólido, na indução de hiperhidria em explantes de melão. Os resultados mostraram que, tanto no meio de cultura líquido como no sólido, na ausência de BA, não houve indução de hiperhidria. Porém, no meio de cultura líquido com $0,01 \text{ mg/l}$ de BA houve 100 % de hiperhidria. Quando se utilizou somente AIA, não houve hiperhidria dos tecidos dos explantes.

PHAN (1991), cultivando maçã no meio de cultura MS, com metade da concentração original de macronutrientes, induziu a formação de tecido hiperhídrico. O grau de hiperhidria foi proporcional à concentração de BA, havendo grande emissão de etileno. Entretanto, mesmo quando foi inibida a síntese de etileno através da utilização de AGV, ocorreu hiperhidria na presença de BA. Porém, quando se utilizou o AIBA como inibidor da síntese de etileno não ocorreu hiperhidria, mesmo na presença de BA. Concluiu-se portanto, que a indução da hiperhidria pode ser devida a um desequilíbrio

entre o aumento do volume e a divisão celular, devido à presença de grandes concentrações de citocinina, perturbando o processo de diferenciação celular.

Desta forma, considerando que tanto o meio de cultura MS como o MSA-1, possuíam a mesma concentração e mesmo tipo de reguladores de crescimento, a interação entre estes reguladores com os demais componentes do meio de cultura MS devem ter sido mais favoráveis à indução da hiperhidria, do que como o MSA-1.

O metabolismo das citocininas está diretamente relacionado à concentração de N nos tecidos, e quanto maior for esta concentração, maior também, será a síntese de citocininas (MENGEL & KIRKBY, 1987). Além do que, o N tem grande influência no transporte de citocininas para as gemas e a intensidade deste transporte é maior na presença de íons NH_4^+ do que na presença de íons NO_3^- (MARSCHNER, 1986). Os íons potássio e fósforo, também favorecem a síntese e transporte das citocininas. Em plantas deficientes em fósforo, pode haver acúmulo de ABA (MARSCHNER, 1986). Este acúmulo, em alguns casos, pode levar à síntese endógena de etileno (FERRI, 1986).

Desta forma, as maiores concentrações de N, principalmente como NH_4^+ , e K do meio de cultura MS, poderiam levar a uma maior síntese e transporte de citocinina nos tecidos, provocando uma maior formação de tecidos hiperhídricos. Entretanto, apesar do meio de cultura MSA-1 possuir maior concentração de P, os níveis de síntese e transporte de citocinina endógena não foram, provavelmente, tão intensos quanto os induzidos pela concentração de N e K no meio de cultura MS. E, a menor probabilidade de síntese de etileno, devido à maior concentração de P, pode ter diminuído a probabilidade de hiperhidria dos explantes no meio de cultura MSA-1.

No teste do χ^2 , aplicado para detectar o efeito dos genótipos na indução da hiperhidria (Tabela 16), o valor obtido ($\chi^2 = 200,67^{**}$) foi altamente significativo ($p < 0,001$), em relação ao valor tabelado para sete graus de liberdade ($GL = 7$). Este

resultado permite concluir que pelo menos duas das progênies/ clone diferiram significativamente entre si.

De maneira análoga aos tratamentos, foi aplicado o teste de probabilidades nos dados da Tabela 14, obtendo-se os seguintes resultados: $q_1 = 0,09$ e $\sigma_1 = 0,032$; $q_2 = 0,34$ e $\sigma_2 = 0,032$; $q_3 = 0,22$ e $\sigma_3 = 0,032$; $q_4 = 0,08$ e $\sigma_4 = 0,017$; $q_5 = 0,25$ e $\sigma_5 = 0,038$; $q_{94} = 0$; $q_{96} = 0,13$ e $\sigma_{96} = 0,022$; $q_{ES} = 0$. Portanto, a amplitude das probabilidades de indução de hiperhidria em cada progênie, foi a seguinte: $28\% \leq P_2 \leq 40\%$; $18\% \leq P_5 \leq 32\%$; $16\% \leq P_3 \leq 28\%$; $9\% \leq 96 \leq 17\%$; $3\% \leq P_1 \leq 15\%$; $5\% \leq P_4 \leq 11\%$; $94 = ES = 0$.

Embora, de maneira geral, tenha sido constatado o efeito dos tratamentos e dos genótipos na indução da hiperhidria, é também importante se conhecer o efeito dos tratamentos em cada uma das progênies/clone, assim como a comparação do efeito dos genótipos, dois a dois. Para esta análise, foi novamente aplicado o teste de X^2 , a partir dos dados da Tabela 14.

Tabela 17 - Resultados do teste de X^2 para comparação do efeito dos tratamentos em cada uma das progênies/ clone.

Progênies/Clone	G.L.	X^2
P1	1	1,79 ^(N.S.)
P2	1	8,96**
P3	1	0,96 ^(N.S.)
P4	1	20,14**
P5	1	30,16**
94	-	-
96	1	35,00**
ES	-	-

G.L. = número de graus de liberdade

** = resultado altamente significativo ($p < 0,001$)

X^2 = valor calculado para o qui-quadrado - = não foi possível aplicar o teste

n.s. = resultado não significativo

TABELA 18 - Resultados obtidos com a aplicação do teste de X^2 , para comparação do efeito dos genótipos dois a dois

Progênie	P2	P3	P4	P5	94	96	ES
P1	13,46**	9,03**	0,002 ^{ns}	11,84**	11,77**	1,78 ^{ns}	21,55**
P2	-	8,80**	48,28**	3,14 ^{ns}	97,78**	30,08**	100,73**
P3	-	-	16,23**	0,61 ^{ns}	56,65**	5,89*	58,58**
P4	-	-	-	19,88**	20,60**	14,83**	20,60**
P5	-	-	-	-	96,46**	8,79**	32,90**
94	-	-	-	-	-	32,77**	N.P.
96	-	-	-	-	-	-	33,81**

* → valores significativos, a nível de 5% de probabilidade

** → valores significativos a nível de 1% de probabilidade

ns → valores não significativos a nível de 5% de probabilidade

NP → não foi possível aplicar o teste X^2

Os resultados apresentados na Tabela 17, indicam que não houve diferença significativa entre os tratamentos, nas progênies P1 e P3. Porém, para as progênies P2, P4, P5 e 96 as diferenças foram altamente significativas ($p < 0,001$). Para a progênie 94 e para o clone ES, não foi possível aplicar o teste de X^2 , devido à ausência de sintomas em ambos. Portanto, das seis progênies onde foi possível aplicar o teste do X^2 , somente duas (33,33%) não foram significativamente influenciadas pela composição do meio de cultura, com relação à indução de hiperhidria.

Com relação ao efeito dos genótipos, comparados dois a dois, os resultados da Tabela 18 indicam que, nas combinações onde foi possível aplicar o teste do X^2 , somente quatro (14,81%) não apresentaram diferenças significativas (P1 x P4; P1 x 96; P2 x P5 e P3 x P5). Apenas a combinação P3 x 96 apresentou diferença significativa

($p < 0,05$), representando 3,7% das combinações. Entretanto, a maior parte das combinações (85%) apresentaram diferenças altamente significativas ($p < 0,001$). Portanto, apesar de não ter sido possível detectar efeitos significativos, em duas combinações, observou-se efeito do genótipo na indução da hiperhidria.

4.1.3. Número e tamanho das gemas (NG e TG)

Neste experimento, ao final de 35 dias de cultura, foi realizada uma avaliação do número de gemas produzidas pelos explantes, assim como do comprimento destas gemas. As médias obtidas para estas duas variáveis estão apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19 - Média do número e tamanho das gemas produzidas pelos explantes ao final de 35 dias de cultura

Progênes/Clone	TRAT. A		TRAT. B	
	Nº Gemas	T. Gemas (cm)	Nº Gemas	T Gemas (cm)
P1	28	1,5	18	1,5
P2	21	0,8	14	3,0
P3	35	1,5	29	2,0
P4	25	1,5	27	1,5
P5	41	1,0	23	1,5
94	21	1,0	17	1,5
96	18	1,5	26	1,3
ES	25	1,3	25	1,5
MÉDIA GERAL	26,75	1,26	22,36	1,73

A partir dos dados da Tabela 19, foi aplicada a análise de variância para o número e o tamanho de gemas (Tabela 20).

TABELA 20 - Resumo da análise de variância para o número e tamanho de gemas (cm), após 35 dias de cultura

Fontes de Variação	QUADRADOS MÉDIOS		
	G.L.	Nº Gemas	T. Gemas
Tratamento	1	76,5625 ^{ns}	0,8556 ^{ns}
Resíduo	14	44,6697	0,3367
F		1,71 ^(ns)	2,53 ^(ns)
C.V		27,21	39,13
Média Geral		24,56	1,49

Nº Gemas → número de gemas produzidas

T Gemas → tamanho das gemas

ns → não significativo

Através da análise de variância, verificou-se que não houve diferença significativa a nível de 5% de probabilidade, em relação aos tratamentos, tanto para o número como tamanho das gemas. Porém, deve-se considerar que a amostragem foi pequena.

CORREIA (1993), observou efeito altamente significativo do genótipo de clones de *E. grandis* com relação ao número de gemas produzidas. O número médio de gemas em meio de cultura sólido, aos 35 dias, foi 51,2. A classe de alturas com maior frequência de gemas, foi a de 0,5 cm e 1,0 cm ($m = 0,75$ cm).

Comparando os resultados obtidos por CORREIA (1993), para clones de *E. grandis*, com os resultados obtidos para o *E. saligna*, para número (24,56) e tamanho de gemas (1,49); o *E. saligna* produziu menor quantidade de gemas. Porém, estas alongaram mais do que as gemas dos clones de *E. grandis*. O número médio de gemas produzidas pelo *E. saligna*, correspondeu apenas à metade daqueles obtidos para os clones de *E. grandis*. Entretanto, o comprimento médio das gemas de *E. saligna* foi duas vezes maior do que as gemas dos clones de *E. grandis*.

Considerando que o valor médio da PMS (123,4 mg) obtido por CORREIA (1993), para clones de *E. grandis* em meio de cultura sólido, não foi muito diferente do obtido para *E. saligna* neste experimento (103,67 mg), pode-se considerar que parte da matéria seca dos explantes de *E. saligna*, que seria utilizada na produção de novas gemas, deve ter sido desviada para o alongamento das já existentes.

Para obter melhores informações a respeito destas duas variáveis, seria preciso desenvolver um experimento melhor elaborado, com maior número de repetições. Porém, os dados aqui apresentados sugerem que o meio de cultura MSA-1 foi mais adequado à produção de gemas em relação ao MS. E, o meio de cultura MS mais adequado ao alongamento das gemas, em relação ao MSA-1. Entretanto, deve-se observar que o comprimento das gemas produzidas no MSA-1 é suficientemente grande para permitir o enraizamento das gemas, caso fosse necessário (CORREIA, 1993).

4.1.4. Observações

Ao longo deste experimento, foram realizadas outras observações de caráter qualitativo. Porém, como não constituíam o objetivo principal deste trabalho, a amostragem não foi adequada à aplicação de uma análise estatística. Entretanto, são observações interessantes que podem contribuir para trabalhos futuros.

A partir da quarta coleta (28 dias), foi possível observar a incidência de folhas senescentes (amareladas), formação de calo sobre as folhas e gema terminal, ocorrência de pecíolo avermelhado e hipertrofia do 3º par de folhas. CORREIA (1993) também observou sintomas de senescência, aos 28 dias, em explantes de clones de *E. grandis* cultivados em meio de cultura sólido.

4.1.4.1. Senescência e Hipertrofia

Embora, não tenha sido possível uma avaliação estatística, os sintomas de senescência e hipertrofia do 3º par de folhas ocorreram com maior frequência no tratamento B. No tratamento B, os sintomas de senescência foram detectados nas progênes P1, P2, P3, 94, 96 e no clone ES, e no tratamento A, apenas na progênie P1 e no clone ES. A hipertrofia do 3º par de folhas foi detectada nas progênes P1, P2, P3 e 94, no tratamento B e somente nas progênes P3 e P5, no tratamento A. Tanto a senescência como a hipertrofia, devem ter sido induzidas devido a um desequilíbrio nutricional nos meios de cultura, ao longo do período de cultivo.

Segundo WILLIAMS (1993), após oito semanas de cultivo de *Pitilopus exaltatus*, em meio de cultura MS, a quantidade absorvida, de alguns elementos, foi: S(90%); P(75%); Fe(60%); Ca(50%) e K(35%). Em *Actinia deliciosa*, após 15 dias de cultivo, no meio de cultura MS, a quantidade absorvida foi: N(40%); P(65%); K(30%); Ca(18%) e Mg(20%). Portanto, como os meios cultura constituem um sistema de tamponamento não muito eficiente, a absorção dos elementos em diferentes taxas, num dado período de tempo, poderia levar a desequilíbrios nutricionais na proximidade dos explantes.

Quanto ao problema da hipertrofia das folhas no Tratamento B, este pode ter sido devido a um desequilíbrio na síntese de AIA, decorrente do excesso de Zn. Pois, segundo MENGEL & KIRKBY (1987), a expansão foliar seguida de clorose, pode ser uma das consequências da toxidez de Zn.

4.1.4.2. Formação de calo

Com relação à formação de calo, nas folhas e gemas terminais, a maior frequência destes sintomas também ocorreu no tratamento B causada provavelmente,

como sugerido anteriormente, pelo desequilíbrio nutricional provocado pela composição do meio de cultura MS, levando a uma maior síntese de etileno endógeno.

4.1.4.3. Coloração do pecíolo

A maior frequência de pecíolos avermelhados ocorreu no tratamento A, principalmente nas progênies P1, P2, P3, P4 e no clone ES. No tratamento B, houve incidência apenas nas progênies P1 e P4.

Segundo KYTE (1987), a ocorrência de pecíolo avermelhado, em culturas *in vitro*, pode estar relacionada às condições de estresse (luz e/ou temperatura), excesso de carboidratos, falta de NO_3^- e cultura muito velha.

FERREIRA & DA CRUZ (1991), associam o surgimento de pigmentos arroxeados à deficiência de B e/ou Mo. Entretanto, MENGEL & KIRKBY (1987); MALAVOLTA et al. (1989) e MEZZETTI et al. (1991), constataram a formação de caule avermelhado em diversas espécies, em condições de deficiência de fósforo.

Considerando a concentração de P, no meio de cultura MSA-1, é mais provável que estes sintomas tenham sido causados devido à deficiência de B ou Mo. Pois, na presença de maiores concentrações de NO_3^- , são exigidas maiores concentrações de Mo (MENGEL & KIRKBY, 1987). Entretanto, não se pode descartar uma possível deficiência de P no meio de cultura MSA-1, induzida pelas maiores concentrações de Ca^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} e Co^{2+} .

4.2. EXPERIMENTO II: Avaliação do efeito da concentração de sacarose no desenvolvimento das gemas

TABELA 21 - Resumo da análise de variância para PMS, TM, TG e NG, dos explantes cultivados em diferentes concentrações de sacarose, durante 30 dias

Fontes de Variação	Quadrados Médios				
	G.L.	PMS	TM	TG	NG
Genótipos	7	0,0002**	3,4478**	0,4180*	46,2150**
Tratamento	2	0,0003**	0,8783 ^(ns)	0,0034 ^(ns)	18,9608 ^(ns)
Genót. x Trat	14	0,0000 ^(ns)	0,3814 ^(ns)	0,1380 ^(ns)	4,7679 ^(ns)
F		4,13**	1,56 ^(ns)	1,79 ^(ns)	3,11**
CV (%)		18,66	23,26	19,88	17,52
Média Geral		28,84(mg)	4,0351	1,7466(cm)	14,5786

** → significativo pelo teste F, a 1 % de probabilidade.

* → significativo pelo teste F, a 5 % de probabilidade.

(ns) → valores não significativos pelo teste F, a 5 % de probabilidade

PMS → produção de matéria seca

TM → taxa de multiplicação

TG → tamanho das gemas

NG → número de gemas

A análise de variância (Tabela 21), mostra que o efeito dos genótipos foi mais significativo do que o efeito dos tratamentos, em relação às variáveis analisadas. Os coeficientes de variação podem ser considerados medianos para PMS, TG e NG e alto para TM (GOMES, 1987). Apenas a PMS apresentou variação significativa, em relação à concentração de sacarose no meio de cultura.

As variáveis PMS, TM e NG apresentaram diferenças altamente significativas pelo teste F ($p < 0,01$), em relação ao efeito dos genótipos. A variável TG também apresentou diferença significativa pelo teste F, porém com menor significância ($p < 0,05$).

As médias gerais obtidas para PMS, TM, TG e NG foram 28,84 mg; 4,04; 1,75 cm e 14,58, respectivamente. Para comparação das médias, entre os tratamentos e entre as progênie/clon foi aplicado o teste Tukey a nível de 5% de probabilidade (Tabelas 22 e 23).

TABELA 22 - Comparação dos valores médios obtidos para PMS, TM, TG e NG, em cada progênie/clon, após 30 dias de cultivo

Progênie	PMS (mg)	TM	TG (cm)	NG
P1	17,68 C	2,70 C	1,70 B	16,83 AB
P2	38,40 A	4,53 AB	2,38 A	16,64 AB
P3	28,50 AB	4,20 ABC	1,70 B	12,33 AB
P4	35,77 AB	4,20 ABC	1,77 AB	14,73 ABC
P5	28,00 ABC	3,87 ABC	1,56 B	16,45 AB
94	29,32 AB	5,20 A	1,90 AB	10,93 C
96	26,83 BC	4,37 ABC	1,45 B	10,13 C
ES	27,85 BC	3,30 BC	1,62 B	17,80 A

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 23 - Comparação dos valores médios obtidos para PMS, TM, TG e NG, em cada tratamento, após 30 dias de cultura

Tratamento	PMS (mg)	TM	TG (cm)	NG
T1	23,59 B	3,86 A	1,70 A	13,41 B
T2	29,81 A	3,93 A	1,77 A	15,94 A
T3	32,81 A	4,31 A	1,77 A	14,41 AB

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si estatisticamente, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Pela análise da Tabela 22, a progênie P2 apresentou a maior PMS (38,40 mg). Porém, não diferiu significativamente das progênies P3, P4, P5 e 94, pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade. A progênie P1 apresentou a menor PMS (17,68), não diferindo significativamente das progênies P5, 96 e do clone ES. Estes resultados, indicam que a progênie P2 produziu maior quantidade de matéria seca útil. Isto é, após a operação de limpeza dos explantes, houve um maior aproveitamento da matéria seca na "confeção" de novos explantes.

Com relação à TM, a progênie 94, provável representante típico da espécie *E.saligna*, foi a que apresentou maior média (5,20). Isto é, permitiu a formação de um maior número de explantes, a partir do explante original. Entretanto, não diferiu significativamente das progênies P2, P3, P4, P5 e 96, pelo teste Tukey, a nível de 5% de probabilidade. A menor média de TM (2,70), foi apresentada pela progênie P1, não diferindo significativamente das progênies P3, P4, P5, 96 e do clone ES.

Dividindo-se os valores obtidos para PMS, pelos valores obtidos para a TM, obtém-se o peso médio dos explantes que seriam transferidos para novo meio de cultura, caso houvesse novo subcultivo. Estes resultados indicam que os explantes obtidos a partir da progênie P4 teriam maior peso seco e, os da progênie 94, o menor peso seco.

A variável TG, apresentou pouca amplitude de variação das médias. A progênie P2 apresentou a maior média (2,38 cm), porém não diferiu significativamente das progênies P4 e 94, pelo teste Tukey a nível de 5% de probabilidade. A menor média ocorreu na progênie P5 (1,56 cm), a qual não diferiu significativamente das progênies P1, P3, P4, P5, 94, 96 e do clone ES. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos no Experimento I, onde a progênie P2, apresentou a maior média no tamanho das gemas e a progênie P5 a menor.

A média do número de gemas contáveis (NG), foi maior no clone ES (17,80) não diferindo porém, significamente, das progênies P1, P2, P3, P4 e P5. A

menor média ocorreu na progênie 96 (10,13), não diferindo significativamente da progênie 94.

Os tratamentos T1 e T2, só apresentaram diferenças significativas, pelo teste Tukey ($p < 0,05$), para as variáveis PMS e NG. Indicando portanto, que as concentrações de sacarose utilizadas neste experimento não afetaram significativamente as variáveis TM e TG. A maior média de PMS ocorreu no tratamento T3 (32,81 mg), não diferindo porém, significativamente, do tratamento T2. A menor média ocorreu no tratamento T1 (23,59 mg). Para a variável TM, não houve diferença significativa entre os tratamentos, a maior média ocorreu no tratamento T3 (4,31) e a menor no tratamento T1 (3,86). O tamanho das gemas (TG), praticamente não variou de um tratamento para o outro, a menor média ocorreu no tratamento T1 (1,70 cm) e a maior média no tratamento T3 (1,77). Não houve diferença significativa entre os tratamentos. A variável (NG) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos T2 (15,94) e T3 (14,41). Porém, o tratamento T1 (13,41) diferiu significativamente do tratamento T2.

Independentemente do nível de significância, o tratamento T3 apresentou maiores médias para PMS e TM, e média igual a do tratamento T2 para a variável TG, apenas para a variável NG, o tratamento T3 apresentou média menor que a do tratamento T2.

Os resultados obtidos para PMS e TG, estão de acordo com aqueles apresentados por GEORGE (1984), onde o aumento na concentração de sacarose proporcionou aumento no peso seco e no comprimento dos brotos de *Lilium auratum*.

GULSEN & DUMANOGLU (1991), testaram o efeito de várias concentrações de sacarose (20, 30, 40 e 50 g/l) sobre a taxa de multiplicação, espessura e comprimento dos brotos e formação de calo, em marmelo. A taxa de multiplicação foi maior no tratamento com 30 g/l de sacarose, sendo prejudicial acima desta

concentração. O comprimento dos brotos não diferiu significativamente entre os tratamentos com 30, 40 e 50 g/l.

THOMPSON & THORPE (1987), obtiveram melhor taxa de indução de gemas de *Pinus radiata* no meio de cultura com 3% de sacarose, porém o alongamento foi melhor no meio de cultura com 2% de sacarose. Em *Pinus contorta*, a produção de gemas não foi alterada pelas concentrações de sacarose entre 25 e 200 μ M. Entretanto, outros trabalhos indicam os níveis de concentração de 3% como os mais adequados (DINER et al., 1986; GULSEN & DUMANOGLU, 1990).

Em *Eucalyptus*, a concentração mais freqüentemente utilizada na fase de multiplicação é a de 2% (WICHETECH, 1990; PINEDO et al., 1990; LE ROUX & STADEN, 1991; CHENG et al., 1992). Porém, a concentração ideal deve variar de um meio de cultura para outro, devido a variação no potencial osmótico pois, em soja, as melhores taxas de crescimento ocorreram entre 50% e 75% dos sais do meio de cultura MS com 3% a 4% de sacarose. Ou entre 75% e 100% dos sais do MS com 2% de sacarose (GEORGE, 1984).

5. CONCLUSÕES

A análise dos resultados permitiu as seguintes conclusões:

- . Não houve diferença significativa entre os meios de cultura MS e MSA-1, para PMF, NG e TG.
- . A PMS e S%, obtidas no meio de cultura MSA-1, foram significativamente superiores às obtidas no MS.
- . A PMF, PMS, S%, TM, NG, TG e hiperhidria, foram significativamente influenciadas pelo genótipo dos explantes.
- . Houve interação significativa entre os genótipos e os meios de cultura, para a PMF e S%.
- . O meio de cultura MS foi significativamente mais favorável à indução de hiperhidria, em relação ao MSA-1.
- . Não houve diferença significativa para TM, TG e NG, em relação às diferentes concentrações de sacarose (20, 25 e 30 g/l).
- . Houve diferença significativa para PMS, em relação às diferentes concentrações de sacarose (20, 25 e 30 g/l).
- . O meio de cultura MSA-1 foi mais adequado que o MS para o cultivo de gemas de *E. saligna* Smith.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINTABLIAN, N. & DIAS, A.C. A polpação quimiotermomecânica de *Eucalyptus saligna* em escala industrial. In: CONGRESSO ANUAL DE CELULOSE E PAPEL, 21., São Paulo. 1988. **Anais**. São Paulo: ABCP, 1988. p.289-293.
- ALBINO, J.C. & TOMAZELLO FILHO, M. Crescimento e densidade básica da madeira em 12 espécies de *Eucalyptus*. **International Union of Forest Research Organizations**, Manaus, 1984. Manaus: IUFRO, 1984. p.19-23.
- ALMEIDA, A.R.P.; GONTARSKI, F.C.; FLOSS, E.L.; CORREIA, C.A. **Produção de matéria seca, efeito de época, fonte e tipo de adubação com zinco, boro e cobre**. Piracicaba, ESALQ, 1988. 41p.
- ALVARENGA, R.M. Potencial econômico do eucalipto, segundo a região. In: CONFERÊNCIA MUNDIAL DO EUCALIPTO, 2., São Paulo, 1961. São Paulo: FAO, 1961. v.1, p.164.
- AZEVEDO, A.M. Produção de *Eucalyptus saligna* no planalto central de Angola. In: CONFERÊNCIA MUNDIAL DO EUCALIPTO, 2., São Paulo, 1961. São Paulo: FAO, 1961. v.1, p.21-26.
- BAÉZ, M.N. Variação fenotípica de *Eucalyptus saligna* Smith de Itatinga (SP): árvores superiores, sementes e progênes de polinização livre. Piracicaba, 1994. 79p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology of tree improvement for rapid propagation and biomass energy production. In: BAJAJ, Y.P.S., ed. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Trees I, Berlin, Springer-Verlag, 1986. p.1-23.
- BALLONI, E.A.; BERTOLOTI, G.; MORA, A.L.; SILVA, A.P. Estudo do comportamento florestal de *E.saligna* e *E.grandis* da Australia, em diversos espaçamentos. **Boletim Informativo IPEF**, Piracicaba, 8(27):11-3, 1980.
- BARROS, N.F.; NOVAIS, R.F.; CARDOSO, J.R. & MACEDO, P.R.O. Algumas relações Solo-Espécie de Eucalipto e suas condições naturais. In: BARROS, N.F. & NOVAIS, R.F. ed. **Relação solo-eucalipto**. Viçosa, Folha de Viçosa, 1990. p.1-24.
- BEIGUELMAN, B. Curso prático de estatística. 3.ed. Ribeirão Preto, Revista Brasileira de Genética, 1994. 231p.
- BENNETT, I.J. & MAC COMB, J.A. Propagation of Jarrah (*Eucalyptus marginata*) by organ and tissue culture. **Australian Forest Research**, Melbourne, 12(2):121-27, 1982.
- BHOSWANI, S.S. & RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice**. Amsterdam, Elsevier, 1983. 520p. (Developments in Crop Science, 5).
- BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. **Tissue culture in forestry**. Dordrecht, Martinus Nishoff, 1985. 420p.
- BUSNARDO, C.A.; GONZAGA, J.V.; BENITES, E.P.; DIAS, C.; MENOCELLI, D.; SCHIMIDT, C. Estudo comparativo de qualidade da madeira do *Eucalyptus saligna*, procedência de Coff's Harbour e madeira de origem híbrida, procedência de Canela, introduzidas na região de Guaíba-RS. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CELULOSE E PAPEL, 3., São Paulo, 1983. **Anais**. São Paulo, ABCP, 1983. v.4, p.1073.

- BUTENKO, R.G. **Plant tissue culture and plant morphogenesis**. Washington, National Science Foundation, 1964. 291p.
- CÁCERES, R.H. Produccion y Evaluacion de Pulpas Cellulosicas a partir de diferentes espécies de *Eucalyptus*. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CELULOSE E PAPEL, 3., São Paulo, ABCP, 1983. v.4, p.1043-51.
- CÂNDIDO, J.F. **Instruções sobre escolha de espécie, produção de mudas, plantio, tratos e exploração**. Viçosa, UFV, 1970. 77p.
- CARMO, D.M.; REZENDE, M. & SILVA, T.C.A. Avaliação da aptidão das terras para Eucalipto. In: BARROS, N.F. & NOVAIS, R.F., ed. **Relação solo-eucalipto**. Viçosa, UFV, 1990. p.187-236.
- CARVALHO, C.M.; BAENA, E.S.; COUTINHO, C.J.; FREITAS, M.; FERREIRA, C.A. Estudo das relações B/K e B/Ca na cultura de *Eucalyptus saligna* Smith. Resultados Preliminares. In: **Anais do 3º Congresso Florestal Brasileiro**, vol. II, dezembro 1987. p.264-260.
- CÁSABONA, A.M.; REPETTI, R. Pulpado químico y semiquímico de *Eucalyptus*. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CELULOSE E PAPEL, 3., São Paulo, 1983. **Anais**, São Paulo, ABCP, 1983. v.4.
- CHANG, S.H.; DONALD, D.G.M.; JACOBS, G. Micropropagation of *Eucalyptus radiata* spp. *radiata* using explants from mature and coppice material. **South African Forestry Journal**, Pretoria, (162):43-47,. September 1992.
- CHENG, B.; PETERSON, C.M.; MITCHELL, R.J. The role of the sucrose, auxin and explant source on *in vitro* rooting of seedlings explants of *Eucalyptus sideroxylon*. **Plant Science**, Lucknow, **87**(2):2078-214, 1992.

- CHIPPENDALE, G.M. & LUDEK, W. **The natural distribution of eucalyptus in Australia.** Camberra: Australian National Parks and Wildlife Service, Austrália, 1981. 198p.
- CORREIA, D. Otimização da fase de multiplicação de gemas *in vitro* de *Eucalyptus* spp. Piracicaba, 1992. 109p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- CRESSWELL, D.R.; BOULAY, M.; FLANCLET, A. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. ed. **Tissue Culture in Forestry.** Dordrecht, Martinus Mijhoff, 1985. cap.6.
- CRESSWELL, R.J. & DE FOSSARD, R.A. Organ culture of *Eucalyptus grandis*. **Australian Forestry**, Armidade, **37**:55-59. 1974.
- CURRIR, P. Flavonoid accumulation is correlated with adventicous roots formation in *Eucalyptus gunnii* Hook micropropagated through axillary bud stimulation. **Plant Physiology**, Bethesda, **92**(4):1148-153, 1992.
- DARROW, W.K. Provenance - Type trials of *Eucalyptus grandis* and *E. saligna* in South Africa: eight years results. **South African Forestry Journal**, Pretoria, (126):30-38, Setembro 1983.
- DAS, T. & MITRA, G.C. Micropropagations of *Eucalyptus tereticornis* Smith. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Boston, **22**(2):95-104, 1990.
- DAVIES, P.J. Plant hormones and their role in plant growth and development. Ed. by Kluwer Academic Publishers, 1988. p.1-12.
- DE FOSSARD, R.A. Tissue and organ culture of *Eucalyptus*. **New Zealand Journal of Forestry Science**, Rotorua, **4**(2):267-78, 1974a.

- DE FOSSARD, R.A. Tissue culture of *Eucalyptus* **Australian Forestry**, Pertho, **37**(10):43-57, 1974b.
- DE-EKNAMKUL, W. & ELLIS, E.B. Effects of macronutrientes on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, **4**(2):46-49, 1985.
- DEBERGH, P.; AITKEN-CHRISTIE, J.; COHEN, D.; GROUT, B.; Von ARNOUD, S.; ZIMMERMAN, R.; ZIV, M. Reconsideration of the term "vittrification" as used in micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Boston, **30**(2):35-40, 1992.
- DIN, U.A. Regional Progress Report for Asia and Pacific. In: SEGUNDA CONFERÊNCIA MUNDIAL DO EUCALIPTO, 2., São Paulo, 1961. São Paulo, FAO, 1961. v.1, p.164.
- DINER, A.M.; STRICKLER, A.; KARNOSKY, D.F. Initiation, elongation, and remultiplication of *Larix decidua* micropropagules. **New Zealand Journal of Forestry Science**, Rotorua, **16**(3):306-318, 1986.
- DO, C.B. & CORNIER, F. Effects of high ammonium concentration on growth and anthocyanin formation in grape (*Vitis vinifera* L.). Cell suspension culture in a production medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, **27**(2):169-74, November 1991.
- EPSTEIN, E. **Nutrição mineral das plantas - princípios e perspectivas**. São Paulo, EDUSP, 1975. 341p.
- EVERS, P.W. **Micropropagation of forest trees through tissue culture**. Wageningen, Pudoc, 1988. 84p.

FANTINI JR, M.; GRAÇA, M.E.C. Propagação *in vitro* de *Eucalyptus saligna*. In: **Anais do 6º Congresso Florestal Brasileiro**, 22 a 27 de Setembro, Campos do Jordão, 1990. p.373-378.

FAO. **Eucalyptus for planting**. Rome, 1979. 677p. (FAO. Forestry Series, 11).

FERREIRA, M. & KAGEYAMA, P.Y. Melhoramento genético da densidade da madeira de eucalipto. In: **Anais do 3º Congresso Florestal Brasileiro**, vol. II, 4 a 7 de Dezembro, Manaus 1978.

FERREIRA, M. Programa de melhoramento de *Eucalyptus saligna* Smith. **Jornal do Convênio USP/IPEF**, Suplemento especial dedicado à Estação Experimental de Itatinga, Piracicaba, **5**(42):1-2, Jun./Jul. 1991a.

FERREIRA, M.E. & DA CRUZ, M.C.P. **Micronutrientes na agricultura**. Piracicaba, POTAFOS/CNPq, 1991. 734p.

FERREIRA, I. Nutrição mineral e produção de matéria seca de milho (*Zea mays* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivados sob diferentes combinações de calcário e gesso. Lavras, 1991b. 140p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura de Lavras).

FERRI, M.G. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. São Paulo, EPU, 1986. 2v.

FURZE, M.J. & CRESSWELL, C.F. Micropropagation of *Eucalyptus grandis* and *E. nitens* using tissue culture techniques. **South African Forestry Journal**, (135):20-3, Dec. 1985.

- GASPAR, T.H.; KEVERS, C.; DEBERGH, P.; MAENE, L.; PÂQUES, M.; BOCCUSE, P.H. Vitrication: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONGH, J.M. & SURZAN, D.J. ed. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.1, p.152-66.
- GEORGE, E.F.; PUTTOCK, D.J.M.; GEORGE, H.J. **Plant culture media**. Edington, British Library, 1988. 2v.
- GOERGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**; handbook and directory of commercial laboratories. Eversley, Exegetics Limited, 1984. 700p.
- GOMES, F.P. **A estatística moderna na pesquisa agropecuária**. 3.ed. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 1987. 162p.
- GROSSI, F. Testes preliminares para adequação de meio de cultura na fase de multiplicação para o *E.saligna*. (não publicado).
- GRUT, M. Eucalyptus plantations in South Africa, silvicultural operations and management. In: CONFERÊNCIA MUNDIAL DO EUCALIPTO, 2., São Paulo, 1961. São Paulo, FAO, 1961. v.1, p.674-81.
- GUIMARÃES, R.F. Experimentos Regionais de Progenies. In: CONFERÊNCIA MUNDIAL DO EUCALIPTO, 2., São Paulo, 1961. São Paulo, FAO, 1961. v.1, p.369-74.
- GULSEN, Y. & DUMANOGLU, H. The effect of sucrose, agar and pH on shoot multiplication and quality in quince a micropropagation. **Acta Horticulturae**, The Hague, (289): 115-116, April, 1991.

- GUPTA, P.K. & MASCARENHAS, A.F. Eucalyptus. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J., ed. **Cell and Tissue Culture In Forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1988. p.385-410.
- 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**, England, **20**(3):195-201, 1981.
- HAAG, H.P. **Nutrição Mineral de Eucalyptus, Pinus, Araucaria e Gmelina no Brasil**. Campinas, Fundação Cargill, 1983. 202p.
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR, F.T. **Plant propagation - principles and practices**. 5.ed. New Jersey, Prentice-Hall International, 1990. 647p.
- HARTNEY, V.J. Vegetative propagation of the *Eucalyptus*. **Australian Forest Research**, Canberra, **10**(3):191-212, 1980.
- JACOBS, M.R. Eucalyptus as an Exotic. In: CONFERÊNCIA MUNDIAL DO EUCALIPTO, 2., São Paulo, 1961. São Paulo, FAO, 1961. v.1, p.380-413.
- KARNOSKY, D.F. & MICKLER, R.A. Elms (*Ulmus* spp.). In: BAJAJ, Y.P.S., ed. **Biotechnology in Agriculture and Forestry. Trees I**. Berlin, Springer Verlag, 1986. p.326-40.
- KIKUTI, P. & NAMIKAWA, I.S. Estudo de interação clones x níveis de adubação em *Eucalyptus saligna*. **O Papel**, São Paulo, **31**(3):37-44, mar. 1990.
- KIKUTI, P. **Programas Cooperativos na Área de Melhoramento Genético Florestal**, coordenado pelo IPEF/SIF/ESALQ/UFV. 10 e 11 de maio, Piracicaba/São Paulo, 1988.

- KITE, L. **Plant from test tubes, an introduction to micropropagation**. Portland, Timber Press, 1987. 160p.
- KRAMER, P.J. & KOSLOWSKI, T.T. Vegetative growth. In: _____. **Physiology of wood plants**. New York, Academic Press, 1979. cap.3.
- KRONKA, P.; MATSUKUMA, C.K.; NALON, M.A.; DELCALI, I.H.; ROSSI, M.; MATTOS, I.F.A.; SHIN-IKE, M.S.; PONTINHAS, A.A.S. **Inventário Florestal do Estado de São Paulo**. São Paulo, SEMA/CINP/IF, 1993, 199p.
- LE ROUX, J.J. & STADEN, J.V. Micropropagation of *Eucalyptus* species. **Hort Science**, St. Joseph, **26**(2):199-200, 1991.
- LEE, M.S. & KIRBY, E.G. Growth parameters of cell suspension cultures of *Pseudotsuga menziesii* and effects of nitrogen sources on growth. **New Zealand Journal of Forestry Science**, Rotorua, **16**(3):369-376, 1986.
- LEIFERT, C.; PRYCE, S.; LUMDSEN, P.J.; MURPHY, K.P. Effects of mineral nutrition on growth of tissue culture plants. **Proceedings of a Conference organized jointly by The Institute of Horticulture and North West Branch of the Institute of Biology**. September 1992. Edited by: K.H. GOULDING.
- LESHEM, B.; SHALEY, D.P.; IZHAR, S. Cytokinin as an inducer of vitrification in Melon. **Annals of Botany**, London, **61**:255-60, 1988.
- LUBRANO, L. Micropropagation of *Eucalyptus grandis*. **Acta Horticulturae**, The Hague, **300**:89-94, 1992.
- MCCOWN, B.H. & SELLMER, J.C. General media and vessels suitable for woody plant culture. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J., ed. **Cell and tissue culture in forestry**, Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987, v.2, p.4-16.

- MAC COMB, J.A. & BENNETT, I.J. *Eucalyptus* (*Eucalyptus* spp.). In: BAJAJ, Y.P.S., ed. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Trees I. Berlin, Springer Verlag, 1986. p.340-5.
- MAGALHÃES, A.C.N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M.G. **Fisiologia Vegetal 1**. São Paulo, EPU, 1985. p.333-50.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; DE OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas - princípios e aplicações**. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa de Potassa e do Fósforo. 1989. 201p.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. Orlando, Academic Press, 1986. 674p.
- MAC COMB, S.A. & WROTH, M. Vegetative propagation of *Eucalyptus resinifera* and *E. maculata* using coppice cuttings and micropropagation. **Australian Forest Research**, Canberra, **16**(3):231-42, 1986.
- MEHRA-PALTA, A. Clonal propagation of *Eucalyptus* by tissue culture. **Plant Science Letters**, England, **26**(1):1-11, 1982.
- MENGEL, K. & KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. Bern, International Potash Institute, 1987. 687p.
- MENZIES, M.I.; HOLDEN, D.G.; ROOK, D.A. & HARDACRE, A.K. Seasonal Frost-Tolerance of *Eucalyptus saligna*, *E. regnans* and *E. fastigata*. **New Zealand Journal of Forestry Science**, Rotorua, **11**(3):254-61, 1981.
- MEYER, B.; ANDERSON, D.; BOHNING, R.; FRANTIANNE, D. Crescimento Vegetativo. In: _____. **Introdução a Fisiologia Vegetal**. 2.ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1973. p.505-31.

- MEZZETTI, B.; ROSATI, P.; CASALICCHIO, G. *Actinia deliciosa* C.F. Liang in vitro I. Growth and Mineral uptake by explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Boston, **25**(2):91-98, 1991.
- MIGLIORINI, A.J.; BARRICHELO, L.E.G.; KAGEYAMA, P.Y.; CAMARGO, F.R.A. Variação da densidade básica da madeira de *E. grandis* Hill ex. Maiden em função de diferentes níveis de floresta. In: **21º Congresso Anual de Celulose e Papel**, 21 a 25 de novembro, São Paulo, 1988. p.25-36.
- MINOCHA, S.C. Plant growth regulators and morphogenesis in cell and tissue culture of forest trees. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. ed. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987. v. 1, cap.4, p.50-66.
- MIYASAKA, S.C.; YOST, R.S.; DE BELL, D.S.; WHITESELL, C.D. Early growth and nutrient status of *Eucalyptus saligna* as affected by Nitrogen and Phosphorus fertilization. **Australian Forest Research**, Canberra, **17**(3):203-14, 1987.
- MOHAMMED, G.H. & DUSTAN, D.I. Influence of nutrient medium upon shoot initiation on vegetative explants excised from 15 to 18 year old *Picea glauca*. **New Zealand Journal of Forestry Science**, Rotorua, **16**(3):297-305, 1986.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, **15**(3):473-97, 1962.
- NÉMETH, G. Induction of rooting. In: BAJAJ, Y.P.S., ed. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Trees I. Berlin, Springer Verlag, 1986. p.49-64.
- PÂQUES, M. Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects. **Acta Horticulturae**, Geneva, (289):283-90, April 1991.

- PEREIRA, A.R. & MACHADO, E.C. **Análise quantitativa do crescimento de comunidades vegetais**. Campinas, IAC, 1987. 33p. (IAC. Boletim Técnico, 114).
- PHAN, C.T. Vitreous state in vitro culture: ethylene versus cytokinin. **Plant Cell Reports**, Berlin, **9**(9):517-19, 1991.
- PINEDO, D.N.H.; GRAÇA, M.E.C. e ARAUJO, A.J. Micropropagação do *Eucalyptus citriodora* e *E. terrenticornis*. In: **Anais do 6º Congresso Florestal Brasileiro**, 22 a 27 de Setembro, Campos do Jordão, 1990. p.361-372.
- RAO, K.A. & VENKATESWARA, R. Tissue culture of forest tress: clonal multiplication of *Eucalyptus grandis* L. **Plant Science**, Lucknow, **40**(1):51-55, 1985.
- RAO, K.S. *In vitro* meristem cloning of *Eucalyptus terenticornis* Sm. **Plant Cell Reports**, Berlin, **7**(7):546-49, 1988
- REIS, M.G.F. & BARROS, N.F. Ciclagem de nutrientes em plantios de eucalipto. In: BARROS, N.F. & NOVAIS, R.F., ed. **Relação solo-eucalipto**. Viçosa, Folha de Viçosa, 1990. p.265-302.
- RIBEIRO, F.A.; ZANI Fº, J.; STAPE, J.L. Comportamento Silvicultural de Procedências de *Eucalyptus saligna* Smith na Região do Estado de São Paulo. In: **Anais do 6º Congresso Florestal Brasileiro**, 22-27 Setembro, Campos do Jordão, 1990.
- SAKAMOTO, K. & IDA, K. *Anthocyanin* production in culture cells of *Aralia cordata* Thumb. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Boston, **36**(1):21-26, 1994.
- SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. **Plant physiology**. 3.ed. Belmont, Wadsworth, 1985. 540p.

- SAMPAIO, F.M.; FRADE, E.C. O Arboreto do Eucalyptus de Dango. Descrição e Estudo do Comportamento das Espécies Existentes. In: CONFERÊNCIA MUNDIAL DO EUCALIPTO, 2., São Paulo, FAO, 1961. v.1, p.443-47.
- SIGMA CHEMICAL COMPANY. **Biochemicals organic compounds for research and diagnostic reagents.** St. Louis, 1990. 2077p.
- SILVA, H.D.; POGGIANI, F.; COELHO, L.C. Eficiência da utilização de nutrientes em cinco espécies de *Eucalyptus*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, São Paulo, (6/7):1-8, jun./dez. 1983.
- SITA, G.L. & SHOBHA RANI, B. *In vitro* propagation of *Eucalyptus grandis* L. by tissue culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, **4**(2):63-5, 1985.
- SITA, G.L. Morphogenesis and plant regeneration from cotyledonary cultures of *Eucalyptus* **Plant Science Letters**, England, **14**(1):63-68, 1979.
- SUBBAIAH, M.M. & MINOCHA, S.C. Shot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, **9**(7):370-73, 1990.
- TEASDALE, R.D. Generation of sustainable *Pinus radiata* cell suspension culture and studies of cellular nitrogen nutrition. **New Zealand Journal of Forestry Science**, Rotorua, **16**(3):369-376, 1986.
- TEASDALE, R.D. Micronutrientes. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J., ed. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987. v.1, p.17-49.
- TEIXEIRA, J.L. Conteúdo de nutrientes e produção de eucalipto em diferentes ambientes do Rio Doce, MG. Viçosa, 1987. 150p. (Mestrado, Universidade Federal de Viçosa).

- THOMPSON, M.R. & THORPE, T.A. Metabolic and non-metabolic roles of carbohydrates. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J., ed. **Cell and Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987. v.1, cap.6.
- TISDALE, S.L.; NELSON, W.L.; BEATON, J.D. **Soil fertility and fertilizers**. 4.ed. New York, Macmillan, 1985. 754p.
- TREMBLAY, F.M.; PÉRINET, P. & LALONDE, M. Tissue culture of *Alnus* spp. with regard to symbiosis. In: BAJAJ, Y.P.S., ed. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Trees I. Berlin, Springer Verlag, 1986. p.87-100.
- VON ARNOLD, S. & ERIKSSON, T. Norway Spruce (*Picea abies* L.). In: BAJAJ, Y.P.S., ed. **Biotechnology in agriculture and forestry**. Trees I. Berlin, Springer Verlag, 1986. p.291-310.
- WALTERS, G.A. Growth of *Eucalyptus saligna*. A spacing study after ten years. **Journal of Forestry**, Portland, 7(16):346-48, June 1973.
- WARRAG, E.; LESNEY, M.S.; ROCKWOOD, D.L. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. **Plant Cell Reports**, Berlin, 9(10):586-89, 1991.
- WARRAG, E.I.; LESNEY, M.S. & ROCKWOOD, D.L. Micropropagation of field tested Superior *Eucalyptus grandis* hybrids. **New Forests**, Dordrecht 4:67-69, 1990.
- WIECHETECK, M.S.S. Micropropagação de *Eucalyptus viminalis* Labile, a partir de material juvenil. Curitiba, 1990. 92p. (Mestrado - Universidade Federal do Paraná).
- WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition *in vitro*. A mechanistic approach. **Australian Journal of Botany**, East Melbourne, 1:237-51, 1993.
- ZIV, M. Quality of micropropagated plants - vitrification. **In Vitro Cell Developmental Biology**, 27:64-9, Apr. 1991.