RESPOSTA DE TRÊS HÍBRIDOS DE *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* A DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS NA MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS *in vitro*

CLÁUDIA MARIA IANNELLI-SERVÍN

Engenheiro agrônomo

Orientador : Prof. Dr. **ANTÔNIO NATAL GONÇALVES**

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Maio - 1999

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

Iannelli-Servin, Cláudia Maria

Resposta de três híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* a diferentes fontes e concentrações de reguladores vegetais na multiplicação de gemas *in vitro* / Cláudia Maria Iannelli-Servin. - Piracicaba, 1999.

86 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
Bibliografia.

1. Citocinina 2. Clone de eucalipto 3. Cultura de tecido vegetal 4. Eucalipto híbrido 5. Gema 6. Propagação "in vitro" 7. Regulador de crescimento vegetal I. Título

CDD 634.9734

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O Autor"

DEDICO

***AOS MEUS PAIS PELO EXEMPLO, DEDICAÇÃO E APOIO A TODO
MOMENTO, ÀS MINHAS IRMÃS PELA ALEGRIA E
A MEU MARIDO PELA COMPREENSÃO E INCENTIVO.***

AGRADECIMENTOS

Ao engenheiro florestal Manoel de Freitas, que dentro de todo apoio à minha formação profissional me deu a oportunidade de realizar este trabalho.

Ao engenheiro florestal João Comério, que compartilhou diariamente com os problemas e as alegrias durante este período, me apoiando e me fortalecendo diante das necessidades.

Ao engenheiro florestal Fábio Luis Brun, pela amizade e compreensão durante confecção das últimas fases do trabalho.

Aos amigos Aparecida de Fátima, Carlos A. Castilho, Aparecida Cardoso, João Machado e Marilza de Paula Souza pelo apoio na execução deste trabalho.

À amiga bibliotecária Vera Lúcia Villas Boas pela revisão das normas da ABNT, na descrição bibliográfica.

Aos amigos engenheiro florestal Robinson Cannaval Junior e a Professora Sônia Maria Estefano Piedade pela grande ajuda na área de estatística.

Ao engenheiro florestal Agnaldo Scarassati pelas discussões e idéias novas na área de Cultura de Tecidos.

À grande amiga engenheira florestal Ingrid Raquel Nielsen, pelo companheirismo neste período e pela sua determinação.

Ao professor orientador Antônio Natal Gonçalves pelo incentivo aos trabalhos de pesquisa na área de Cultura de Tecidos e pelo apoio técnico.

Ao biólogo Daniel Toyos Hinz pela amizade e grande empenho durante seu estágio na realização dos testes preliminares.

Aos professores Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez (CENA), Weber do Amaral (ESALQ) e Simone Sheppherd (UNICAMP), pelas sugestões apresentadas ao trabalho.

Aos funcionários do laboratório de cultura de tecidos da Champion Papel e Celulose LTDA. pela dedicação e amizade.

Ao professor Ricardo Ferraz, pelo apoio, ensinamentos, amizade e sobretudo pelo entusiasmo à profissão.

Ao professor Augusto Lucchesi pela orientação e ajuda durante este período.

À Champion Papel e Celulose LTDA pelo apoio financeiro desde o início deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. O eucalipto.....	3
2.2. A cultura de tecidos.....	6
2.3. Ação hormonal.....	8
2.3.1. Ação dos reguladores vegetais na cultura de tecidos.....	12
2.3.2. As citocininas.....	13
2.3.2.1. Utilização do BA e KIN em explantes de <i>Eucalyptus</i> spp cultivados <i>in vitro</i>	16
2.4. Ação do TDZ.....	22
2.5. Ações do TDZ em combinação com outros reguladores vegetais.....	24

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1. Procedimentos laboratoriais.....	34
3.2. Experimentos Preliminares.....	38
3.3. Experimentos Desenvolvidos.....	38
3.4. Taxa de crescimento relativo (TCR).....	41
3.5. Delineamento estatístico.....	42
3.6. Apresentação dos resultados.....	43
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 45
4.1. Avaliação visual dos clones.....	45
4.2. Avaliação nos diferentes tratamentos.....	51
4.2.1. Peso de material seco.....	51
4.2.2. Diâmetro dos nós epicórmicos.....	54
4.2.3. Altura das gemas.....	58
4.3. Avaliação nos diferentes dias.....	62
4.3.1. Peso de material seco.....	62
4.3.2. Diâmetro dos nós epicórmicos.....	64
4.3.3. Altura das gemas.....	67
4.4. Taxa de crescimento relativa (TCR).....	70
 5. CONCLUSÕES.....	 74
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 75

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
1 Produtos de base florestal.....	4
2 Mão-de-obra empregada no setor florestal.....	4
3 Faturamento do setor.....	5
4 Área total reflorestada no Brasil (ha).....	5
5 Concentrações das soluções nutrientes para o preparo do meio JADS..	37
6 Médias do peso de material seco nos diferentes tratamentos	51
7 Médias dos diâmetros dos nós epicórmicos nos diferentes tratamentos..	55
8 Médias das alturas das gemas nos diferentes tratamentos	58
9 Médias do peso de material seco nas diferentes avaliações.....	62
10 Médias dos diâmetros dos nós epicórmicos nas diferentes avaliações...	64
11 Médias das alturas das gemas nas diferentes avaliações.....	67

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

1	Desenho esquemático que mostra uma célula vegetal indicando o processo da ação dos reguladores vegetais.....	10
2	Efeito da ação dos reguladores vegetais na atividade gênica.....	10
3	Estrutura das amino-purinas (ZEA, KIN e BA) e fenil-urea (TDZ).....	11
4	O ciclo celular indicando as fases S e G2 que são alteradas na presença de citocininas.....	15
5	Cultivo do clone A	46
6	Cultivo do clone B.....	47
7	Cultivo do clone C.....	49
8	Médias do peso de material seco dos nós epicórmicos nos diferentes tratamentos.....	53
9	Médias dos diâmetros dos nós epicórmicos nos diferentes tratamentos..	56
10	Médias das alturas das gemas nos diferentes tratamentos.....	59
11	Médias de peso de material seco nas diferentes avaliações.....	63
12	Médias dos diâmetros dos nós epicórmicos nas diferentes avaliações..	65
13	Médias das alturas nas diferentes avaliações	68
14	Taxas de Crescimento Relativo para o clone A	70
15	Taxas de Crescimento Relativo para o clone B.....	71
16	Taxas de Crescimento Relativo para o clone C.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA: Ácido indol acético

AIB: Ácido indol butírico

ANA: Ácido naftaleno acético

BA: 6-benzilamino-purina

CPC: Champion Papel e Celulose Ltda.

KIN: 6-furfurilamino-purina

2iP: isopentenil adenina

PMS: peso de material seco

TCR: Taxa de Crescimento Relativo

TDZ: N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea, thiadiazuron

ZEA: 6-(4-hidroxi-3-metilbut-trans-2-enilamina), zeatina

MS: meio de cultura básico definido por Murashige & Skoog (1962)

RESPOSTA DE TRÊS HÍBRIDOS DE *Eucalyptus grandis* X
Eucalyptus urophylla A DIFERENTES FONTES E
CONCENTRAÇÕES DE REGULADORES VEGETAIS NA
MULTIPLICAÇÃO DE GEMAS *in vitro*

Autor: CLÁUDIA MARIA IANNELLI-SERVÍN

Orientador: ANTÔNIO NATAL GONÇALVES

RESUMO

A propagação assexuada de árvores é atualmente de suma importância para o estabelecimento das florestas clonais e aumento da produtividade. Dentro deste contexto, a micropropagação exerce um papel fundamental aumentando a qualidade das florestas. A técnica da micropropagação é complexa, principalmente quando diferentes genótipos são envolvidos. Isto porque cada clone tem necessidades específicas com relação a diversos fatores, entre eles o balanço de reguladores de crescimento e o tempo de cultivo. Este trabalho envolve três clones que fazem parte do programa comercial da CHAMPION PAPEL E CELULOSE LTDA e são híbridos entre *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*, os quais apresentam dificuldades na micropropagação e diferentes necessidades nutricionais e hormonais. Os clones foram submetidos a diferentes fontes e

concentrações de citocininas no meio de cultura JADS, $0,0 \text{ mgL}^{-1}$, $0,25 \text{ mgL}^{-1}$, $0,50 \text{ mgL}^{-1}$, $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ de KIN ; $0,25 \text{ mgL}^{-1}$, $0,50 \text{ mgL}^{-1}$, $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ de BA e $0,001 \text{ mgL}^{-1}$, $0,003 \text{ mgL}^{-1}$, $0,005 \text{ mgL}^{-1}$ de TDZ. Os clones apresentaram comportamento diferenciado, quando submetidos aos tratamentos por 28 dias. Avaliações a cada sete dias, pelo período de 28 dias de cultivo, foram realizadas para medição do peso de material seco (PMS), do diâmetro das gemas e da altura das gemas, o cálculo da Taxa de crescimento relativo (TCR) foi obtido com os valores de PMS. Observações do comportamento dos clone durante o experimento também foram realizadas. Em relação à concentração de reguladores e fonte, os melhores resultados foram o uso de $0,5$ e $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ de BA para o clone A, $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ de BA para o clone B e $0,5$ e $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ BA e $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ KIN para o clone C. Através das análises de TCR concluiu-se para os clones A e C, que o cultivo deverá ocorrer por menos de 21 dias, e para o clone B, o tempo de cultivo deve permanecer entre 15 e 21 dias.

RESPONSES OF THREE HYBRIDS OF *Eucalyptus grandis* X
Eucalyptus urophylla TO DIFFERENT SOURCES AND
CONCENTRATIONS OF GROWTH REGULATORS IN THE
SHOOT MULTIPLICATION *IN VITRO*

Author: CLÁUDIA MARIA IANNELLI-SERVÍN

Adviser: ANTÔNIO NATAL GONÇALVES

Tree asexual propagation is very important for the clonal reforestation high yields. Thus, micropropagation tends to be of fundamental importance to yield and quality of forest plantations. Micropropagation technique is complex especially when different clones are involved. Each clone has specific needs for mineral nutrition and growth regulators. This study uses three clones, all of them hybrids of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. They showed some difficulties in micropropagation and nutrients and growth regulators needs were different. The clones were cultivated in different media with different growth regulators levels and sources. The treatments were: 0.0; 0.25, 0.5, 0.75 mgL⁻¹ KIN, 0.25, 0.5, 0.75 mgL⁻¹ BA and 0.001, 0.003, 0.005 mgL⁻¹ TDZ. Each clone showed different growth responses, when they completed

28 days of culture. Growth evaluations were made at every seven days for a period of 28 days of culture, and the variables measured were dry weight, shoot diameter and shoot height. Values of relative growth rate were obtained with dry weight values. The best results for each clone were: clone A , 0.5 and 0.75 mgL⁻¹ of BA; clone B, 0.75 mgL⁻¹ of BA and clone C , 0.5 and 0.75 mgL⁻¹ of BA and 0.75 mgL⁻¹ of KIN. The best ages were: clone A and C, less than 21 days and clone B, between 15 to 21 days.

1. INTRODUÇÃO

O eucalipto, devido aos resultados de rápido crescimento, volume e qualidade da madeira vem sendo uma grande opção nas plantações florestais em todo Brasil. Para resultados mais rápidos e maiores volumes, as empresas florestais buscam, investindo na clonagem, um retorno rápido e seguro a partir de árvores com características superiores. As diferenças obtidas na produtividade de talhões provenientes de sementes e de clones são significativas, a produtividade média de talhões com sementes é de 31 m³/ha de madeira por ano e de clones é de 36 m³/ha de madeira por ano¹.

Dentro da clonagem, a metodologia que traz melhores resultados em relação a quantidade e qualidade das mudas é a da micropropagação. Porém, as condições de cultivo podem variar para diferentes clones sendo necessário ajustes dos meios de cultura, principalmente em relação aos reguladores vegetais.

1. Dados obtidos na Champion Papel e Celulose Ltda., em janeiro de 1999.

As dificuldades para a propagação *in vitro* de espécies florestais principalmente, para o eucalipto foi abordada por muito autores, que desenvolveram trabalhos desde a seleção dos explantes iniciais, desinfestação, meios de cultura, condições de luz e temperatura para diferentes espécies.

O objetivo deste trabalho foi de ajustar as concentrações e as fontes de reguladores vegetais para maximizar a fase de multiplicação *in vitro*, de três clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* da Champion Papel e Celulose LTDA, obtendo assim maior número de gemas por nó epicórmico (produção de grupos de gemas que tem origem de ramos ou do tronco de uma árvore (Bell, 1993)).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O EUCALIPTO

A demanda de produtos florestais cresce a cada ano, porém as florestas nativas devem ser preservadas, conservando assim as diferentes espécies vegetais e animais. As florestas de rápido crescimento como o eucalipto, são procuradas, para a manutenção das áreas nativas.

O gênero *Eucalyptus* foi nomeado em 1788, por Charles-Louis L'Heritier de Brutelle em Londres. Este gênero pertence a família Myrtaceae e consiste de aproximadamente 500 espécies, 24 sub-espécies e 24 variedades com 870 nomes de uso comum, das quais 115 designam híbridos naturais. O eucalipto é endêmico na Austrália e em algumas ilhas do norte incluindo o Timor, Nova Guiné e Filipinas. É adaptado a diversos climas e solos, inclusive aqueles com salinidade de 2 a 3% e encontrado em itudes de até 1.850 metros na Austrália (Cresswell et al., 1985).

Atualmente, o setor florestal contribui para o desenvolvimento do país gerando empregos, rendas, tributos e divisas e atuando na proteção ao

meio ambiente. Nas Tabelas de 1 a 4 são apresentadas informações a respeito do setor no país.

Tabela 1: Produtos de base florestal

Produto	Produção	Consumo	Exportação (mil t)
Celulose	6.331 t	4.236 t	2.343
Papel	6.517 t	6.124	1.260
Madeira serrada	17.710 m ³ *	17.415 m ³ *	920
Madeira compensada	1.670 m ³	1.000 m ³	379
Madeira Laminada	1.224 m ³	1294 m ³	125
Carvão Vegetal	-	26.000 mdc	0,5
Painéis de fibra	539 m ³	322 m ³	248

* Nativas (75%) e plantadas (25%)

Fonte : SBS- Estatísticas Florestais (1997)

Tabela 2: Mão-de-obra empregada no setor florestal

Segmento	Empregos diretos	Empregos indiretos
Papel e celulose	102.000	500.000
Carvão vegetal	119.000	-
Madeira sólida	300.000	1.200.000

Fonte : SBS- Estatísticas Florestais (1997)

Tabela 3: Faturamento do setor

Segmento	Exportações (US\$)	Faturamento (US\$ Bilhões)	Impostos (US\$ Milhões)
Papel e Celulose	2,0 bi	7,1	696
Carvão Vegetal	69 mi	4,2	546
Madeira sólida*	351 mi	6,0	-

* indústria de móveis

Fonte : SBS- Estatísticas Florestais (1997)

Tabela 4: Área Total Reflorestada no Brasil (ha)

Estado	Eucaliptos	Pinus	Total
Minas Gerais	1.535.750	144.757	1.696.134
São Paulo	558.029	204.363	785.392
Paraná	56.038	609.683	665.721
Santa Catarina	41.292	350.823	392.114
Bahia	197.609	86.854	284.463
Rio Grande do Sul	115.026	137.945	252.971
Outros	407.015	168.600	575.615
Total	2.949.345	1.703.025	4.625.412

Fonte : SBS- Estatísticas Florestais (1997)

2.2. A CULTURA DE TECIDOS

A tecnologia da cultura de células, protoplastos e tecidos de plantas constitui uma das áreas de maior êxito da biotecnologia. Após quase meio século de progresso, esta tecnologia conquistou destacada posição na propagação comercial e industrial de plantas, melhoramento genético, manejo, intercâmbio e conservação de germoplasma e em outras aplicações como as pesquisas em fisiologia vegetal e produção industrial *in vitro* de compostos secundários (Giacometti, 1990).

De acordo com a crescente demanda de produtos florestais e o interesse de manutenção de florestas nativas, há a necessidade constante de desenvolvimento de técnicas visando o aumento da produtividade das florestas. O melhoramento de plantas envolve dois componentes importantes: (1) geração de tipos úteis (desejáveis) de variação de natureza genética e epigenética através do melhoramento e (2) seleção, manutenção e multiplicação de caracteres desejáveis, através de métodos de propagação sexual (semente) e assexual (vegetal) (Mantell, 1994).

Dentro das técnicas assexuais, a micropropagação é uma técnica de impacto entre as aplicadas para a propagação de eucalipto, no setor florestal. Esta importância está relacionada à possibilidade de propagar genótipos desejáveis sem a perda da árvore matriz, obtendo alta taxa de multiplicação com uso da reversão à juvenilidade, reduzindo o tempo para obter-se este

genótipo e estabelecendo-se alternativas a estratégias do melhoramento genético (Gonçalves, 1982).

Segue abaixo o esquema geral da micropropagação para o eucalipto:

A fase de INTRODUÇÃO é a fase da desinfestação do material vegetal, que sendo manipulado em câmara asséptica passa pela fase de ISOLAMENTO. Com a formação dos explantes iniciais e o cultivo em tubos de ensaio com meio nutritivo adequado, ocorre o desenvolvimento de

brotações que chamamos de fase de INDUÇÃO. No BANCO CLONAL, as plantas são mantidas por várias repicagens para se obter a reversão a juvenilidade. Atingido este ponto, as plantas estão prontas para produção comercial. As próximas fases envolvem maiores números de plantas para atender a produção comercial da empresa. Na fase de MULTIPLICAÇÃO, os nós epicórmicos são multiplicados pela ação das citocininas e alongados na fase de ALONGAMENTO. O ENRAIZAMENTO ocorre na casa de vegetação.

Em um futuro próximo, a micropropagação em combinação com altos investimentos no melhoramento das florestas, trarão importantes resultados no desenvolvimento das árvores. A utilização de outros métodos biotecnológicos, as variações somaclonais e a engenharia genética, permitirão maiores ganhos dentro dos programas de melhoramento (Mascarenhas et al., 1984).

2.3. AÇÃO HORMONAL

Os hormônios vegetais são compostos de ocorrência natural, substâncias orgânicas com influência na morfologia e fisiologia da planta, e que atuam em baixas concentrações (10^{-4} M). Estes compostos promovem, inibem ou modificam processos metabólicos das plantas. Os reguladores vegetais têm a mesma função, porém são exógenos. O termo hormônio é de

origem grega e em fisiologia de animais, significa mensageiro químico. O uso original em fisiologia de plantas é derivado da concepção de hormônio em mamíferos (Davies, 1987).

A Figura 1 mostra o efeito dos reguladores vegetais na atividade gênica. O processo inicia-se quando o regulador vegetal encontra um receptor proteico da membrana plasmática. Ocorre a atração do complexo hormônio-receptor com a fosfolipase-C (PLC). A PLC hidrolisa membranas lipídicas, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2), que libera inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 movimenta-se em direção ao tonoplasto da célula da planta, onde combina-se com um receptor que ativa a bomba de Ca^{2+} ou transporta o Ca^{2+} do vacúolo para o citosol. O DAG, que está ligado à membrana plasmática, ativa a proteína quinase C (PKC). A PKC é ativada pela liberação de cálcio do vacúolo. A PKC fosforiliza outras enzimas e o Ca^{2+} e a Ca^{2+} -calmodulina ativa outras proteínas quinases e outras enzimas. O IP_3 perde fosfatos por hidrólises para formar IP_2 e IP, então convertidos o IP e outros (PIP e PIP_2), voltam à membrana plasmática. Finalmente, a ação hormonal estimula modificações de folhas, alterando processos metabólicos, fisiológicos e morfológicos em nível celular. A ação hormonal atua também no controle genético e no mRNA (Salisbury & Ross, 1991), como mostra a Figura 2.

Figura 1: Desenho esquemático mostrando o processo da ação dos reguladores vegetais, extraído de Salisbury & Ross (1991).

Figura 2: Efeito da ação dos reguladores vegetais na atividade gênica, extraído de Salisbury & Ross (1991).

2.3.1. AÇÃO DOS REGULADORES VEGETAIS NA CULTURA DE TECIDOS

A composição e concentração dos reguladores vegetais no meio de cultura são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos, sendo que as auxinas e as citocininas são as classes de reguladores vegetais mais utilizadas nestas técnicas. Dentro dos grupos de reguladores de crescimento, as citocininas e auxinas são as mais importantes para o processo da cultura de tecidos. A formação de raíz, parte aérea e calo em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação destas duas classes de reguladores de crescimento (Caldas et al., 1990). Se a relação auxina/citocinina for mantida baixa, a divisão de células é favorecida, formando então gemas, caules e folhas. Porém, se esta relação for mantida em níveis mais altos, a formação de raízes é favorecida.

Segundo Caldas et al. (1990), para diferentes espécies são necessárias diferentes fontes de reguladores vegetais: (1) Algumas culturas independem do uso de reguladores vegetais, (2) outras dependem da combinação de auxinas e de citocininas, (3) outras dependem somente das citocininas e (4) outras somente das auxinas.

2.3.2. AS CITOCININAS

As citocininas desde o final do século XIX, foram pesquisadas graças à sua ação de citocineses, de divisão celular. São derivadas de adenina-purina com habilidade característica de induzir a divisão de células em cultura de tecidos (na presença de auxinas). A mais comum, de ocorrência natural é a 6-(4-hidroxi-3-metilbut-trans-2-enilamino) purina, a zeatina (ZEA), foi a primeira citocinina sintetizada de milho, em 1963. Porém antes desta descoberta, 6-(furfurylamino)-purina, a cinetina (KIN), foi identificada, a partir da purificação do extrato de DNA de espermatozoides autoclavado. Células de tabaco foram cultivadas com este composto, resultando em aumento de citocinese (Roberts & Hooley, 1988). Outra fonte, a N⁶(benzil) adenina (BA), muito utilizada em cultura de tecidos, sua ação foi testada em cultura de tabaco mostrando haver interação com o RNA, embora em pequeno nível, responsável pela síntese de proteínas (Davies, 1987). Das citocininas comercialmente disponíveis, o BA é a que, em geral, apresenta melhores resultados na propagação *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1990).

A estrutura usual das citocininas são as amino-purinas (Taiz & Zeiger, 1991) , incluindo a KIN, a ZEA e o BA, porém, o TDZ que tem estrutura de fenil-urea também atua como citocinina.

Figura 3: Estruturas de amino-purinas (ZEA, KIN e BA) e fenil-urea (TDZ), extraído de Salisbury & Ross (1991).

O modo de ação destas substâncias não é muito conhecido, porém algumas observações levam a acreditar que há uma atuação na síntese de proteínas (McGAW, 1987). Fosket et al. (1981), concluíram que a presença deste regulador vegetal no meio de cultura, reduz a fase S e leva a um aumento de transição para a fase G2 da mitose, graças ao aumento da síntese de proteínas (que podem ser enzimas ou proteínas estruturais necessárias para a mitose), nenhum aumento na formação de RNAm foi observado, logo as citocininas atuam na translação, como mostra a Figura 4.

Figura 4: O ciclo celular indicando as fases S e G₂ que são alteradas na presença de citocininas, extraído de Salisbury & Ross (1991).

Segundo Salisbury & Ross (1991), há evidências de que em células tratadas com citocininas, os ribossomos são agrupados em grandes polissomos sintetizadores de proteínas, sendo então mais rápida a incorporação de amino-ácidos. Estas substâncias bloqueiam os inibidores de RNA e síntese de proteínas.

A adição destes reguladores vegetais na cultura de tecidos têm o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz. Simultaneamente, a adição de reguladores vegetais estimula certa resposta como crescimento, alongamento e multiplicação da parte aérea. A adição de citocinina é favorável e até necessária em algumas culturas.

Citocininas são rotineiramente usadas em combinação com auxinas na iniciação e também na manutenção de cultura de calos. No caso da cultura de embrião, gemas de ápices e gemas axilares, as citocininas são utilizadas para promover a multiplicação das gemas. Gemas adventícias podem ser induzidas com o seu uso a partir de segmentos internodais, folhas e cotilédones. O BA e a KIN são as citocininas mais utilizadas na micropropagação de espécies arbóreas (Minocha, 1982)

2.3.2.1. UTILIZAÇÃO DE BA E KIN EM EXPLANTES DE *EUCALYPTUS* SPP CULTIVADOS *IN VITRO*

Os estudos preliminares com cultura de órgãos de eucalipto podem ser encontrados a partir de 1970. Inicialmente, cultura de plantas adultas de *Eucalyptus melliodora* foram utilizadas, porém sem sucesso devido à dificuldade de desinfestação dos tecidos. Depois foram testados ápices de

plântulas de *Eucalyptus bancroftii*, *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus deglupta*, produzindo raiz *in vitro*. Paralelamente muitos outros sucessos foram relatados à partir de cultura de órgãos (Cresswell et al., 1985).

Em trabalho com *Eucalyptus citriodora* Hook, Gupta et al. (1981) utilizaram várias concentrações de BA, para multiplicação de gemas em brotações terminais de árvores com 20 anos de idade. Outros explantes utilizados foram plântulas, com presença de 2 a 3 gemas, cultivado por 14 dias em meio de cultura MS. Quando este material foi inoculado em meio contendo $0,3 \text{ mgL}^{-1}$ de BA e $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ de KIN, foram observadas entre 5 e 10 gemas se desenvolvendo, após 3 a 4 semanas. Gemas individualizadas foram transferidas e subcultivadas produzindo de 20 a 30 novas gemas. Já no material originário de árvores adultas, os testes foram feitos com 0,1 e $3,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BA, obtendo-se de 5 a 8 gemas de 15 a 20 mm por explante, após 2 meses.

Pinedo (1989), ao estudar as diversas combinações de auxinas e citocininas para a indução e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus tereticornis*, observou que para a primeira espécie o ideal seria o uso de $0,25 \text{ mgL}^{-1}$ de BA e $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA; enquanto para a segunda, $0,25 \text{ mgL}^{-1}$ de BA e $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA. No processo multiplicação do *Eucalyptus citriodora*, as melhores concentrações seriam de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BA e $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de AIA e, para *Eucalyptus tereticornis*, $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de BA sem a presença de auxinas. O autor observa que a redução do

nível de regulador vegetal no meio (BA a $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ e ANA a $0,1 \text{ mgL}^{-1}$) facilitou o alongamento das gemas. Nota-se a variação entre as concentrações e as relações entre auxinas e citocininas para as diferentes fases, visando a multiplicação e o alongamento das gemas.

Rao (1988) utilizou várias combinações de reguladores vegetais (BA, AIA, 2iP, KIN, ANA) na indução e alongamento de explantes nodais de *Eucalyptus tereticornis*. As combinações testadas foram: $5,7 \mu\text{M}$ ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) de AIA e $4,4$ ou $8,8 \mu\text{M}$ ($1,0$ ou $2,0 \text{ mgL}^{-1}$) de BA (40-45 dias de cultivo); $5,3 \mu\text{M}$ ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) de ANA e $4,4 \mu\text{M}$ ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) de BA; $5,3 \mu\text{M}$ ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) de ANA e $8,8 \mu\text{M}$ ($2,0 \text{ mgL}^{-1}$) de BA; $5,3 \mu\text{M}$ ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) de ANA e $4,4 \mu\text{M}$ ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) de BA com $2,8 \mu\text{M}$ ($0,5 \text{ mgL}^{-1}$) de AIA; $5,3 \mu\text{M}$ ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) de ANA e $4,4 \mu\text{M}$ ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) de BA com $1,1 \mu\text{M}$ ($0,2 \text{ mgL}^{-1}$) de AIA. O resultado, mostrou que, com excessão da primeira combinação, todas foram adequadas para o alongamento das gemas axilares, produção de gemas e para aumentar a porcentagem de gemas formadas por explante.

Em trabalho com *Eucalyptus tereticornis*, Das & Mitra (1990) obtiveram de 18 a 22 gemas por explante com a utilização de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de BA e ANA, na fase de multiplicação, porém produziram-se gemas pequenas e que não se desenvolveram adequadamente, indicando que $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de BA e $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA seria mais adequado. Diferindo de valores encontrados por Pinedo (1989) que indica a ausência de auxinas como melhor resultado para o cultivo *in vitro* da mesma espécie.

Híbridos de *Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus camaldulensis* foram cultivados *in vitro* com meio de cultura MS, suplementado com BA 0.5 a 2.0 mgL⁻¹ ou com KIN 0,5 mgL⁻¹ e BA 0,5 mgL⁻¹. A multiplicação das gemas foi melhor com 1 a 2 mgL⁻¹ de BA e para o alongamento das gemas as melhores concentrações foram com 0,5 mgL⁻¹ de BA e não foram maiores com adição de KIN (Chauhan et al., 1996).

Trabalhando com *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus tereticornis*, *Eucalyptus torelliana* e *Eucalyptus citriodora*, Gupta & Mascarenhas (1987), utilizaram combinações de auxinas e citocinas para indução de gemas em segmentos nodais (15-20 mm). Foram testados os seguintes tratamentos: KIN (0,2 mgL⁻¹) + BA (0,3 mgL⁻¹); KIN (0,2 mgL⁻¹) + BA (0,5 mgL⁻¹); KIN (0,05 mgL⁻¹) + BA (0,1 mgL⁻¹), obtendo-se após 30 a 35 dias de cultivo, entre 35 e 40% de segmentos nodais produzindo gemas, com média de 5 a 8 por explante.

Em trabalho com sementes de *Eucalyptus nova-anglica* e *Eucalyptus viminalis*, Palta (1982) verificou a ação de várias citocininas, entre elas o BA, na indução de gemas. As concentrações abaixo de 2,0 mgL⁻¹ foram mais adequadas do que altas concentrações (5,0 mgL⁻¹), sendo a maior porcentagem de gemas adventícias obtida com 1,0 mgL⁻¹ de ZEA; 2,0 mgL⁻¹ de 2iP; 2,0 mgL⁻¹ de KIN e 0,5 mgL⁻¹ de BA. Em relação a maior eficiência na multiplicação de gemas, observou-se em ordem decrescente, a ZEA, o 2iP, a KIN e o BA.

Trabalhando com *Eucalyptus viminalis*, Wiecheteck (1990) observou que com doses de $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ de BA e 0,5 ou $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA, obtinham-se 5 gemas por explante, porém quando usava-se $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ de BA ou mais, o número de gemas diminuía. Para a obtenção de maior número de gemas, este autor indica $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de BA e $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA, resultado que mostrou a obtenção de 6,2 gemas alongadas por explante.

Le Roux & Van Staden (1991) utilizaram para indução de gemas em *Eucalyptus macarthurii*, *Eucalyptus smithii* e *Eucalyptus saligna*, $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de BA e na fase de alongamento, $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ de BA em combinação com $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA, observando que o ideal seria diminuir a dosagem após a observação da vitrificação nas subculturas.

Em trabalho com *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*, Yang et al. (1995) utilizaram combinações de BA e ANA para indução e alongamento de gemas, originárias de explantes de árvores com 3 anos de idade. Os resultados mais adequados foram conseguidos em meio MS a $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de BA e $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA (13,7 gemas por explante). Após 40 dias de cultivo, o alongamento das gemas obtidas foi realizado em MS com metade da concentração de nitrato de potássio e sacarose.

Sita & Rani (1985) testaram combinações de auxinas (AIA, IBA e ANA) e citocininas (KIN, BA e 2iP) para indução de gemas de *Eucalyptus grandis*. Os melhores resultados obtidos pelos autores foi com a

combinação de 0,5 a 2,0 mgL⁻¹ de BA e 0,1 ou 1,0 mgL⁻¹ de ANA, após 5 a 6 semanas de cultivo, com média de 10 a 15 mm de comprimento por gema.

Segundo Carvalho (1988), que testou combinações de BA e ANA em *Eucalyptus grandis*, os melhores resultados obtidos para a fase de indução foram a 0,5 mgL⁻¹ de BA e 0,01 mgL⁻¹ de ANA.

Warrag et al. (1991) também trabalhando com *Eucalyptus grandis* obtiveram na fase de multiplicação melhores resultados com a aplicação de 0,6 mgL⁻¹ de BA na ausência de ANA, com aumento da produção de gemas, após período de 6 semanas. O trabalho indicou também que altas doses de BA (1,0 mgL⁻¹) poderiam diminuir a taxa de multiplicação.

Cresswell et al. (1985), trabalhando com *Eucalyptus grandis*, utilizaram dosagens de 0,1 mgL⁻¹ de BA e 0,1 mgL⁻¹ de ANA, na multiplicação de *Eucalyptus grandis*, observando que subcultivos sucessivos provocavam no material desequilíbrio fisiológico, indicando a necessidade de doses menores ou ausência de reguladores de crescimento na próxima repicagem intercalando diferentes concentrações, nos diferentes subcultivos.

Também trabalhando com *Eucalyptus grandis*, Rao & Venkateswara (1985) observaram que 100 µM (22,53 mgL⁻¹) de BA e 50 µM (9,3 mgL⁻¹) de ANA produziram brotos em vez de formar calos, com produção de 8 a 10 gemas alongadas.

Warrag et al. (1990) trabalharam com *Eucalyptus grandis*, buscando adequar os níveis de citocinas e auxinas necessárias nas fases de indução, multiplicação e enraizamento. Seus resultados demonstraram que a aplicação de $0,6 \text{ mgL}^{-1}$ de BA, apresentava melhores resultados do que a combinação de BA e ANA. Por outro lado, o aumento da concentração de BA para $1,0 \text{ mgL}^{-1}$, provocava um aumento no número de gemas para 40%. Concentrações de $0,4 \text{ mgL}^{-1}$ e $0,8 \text{ mgL}^{-1}$ de BA também reduziram o número de gemas, porém não houve diferença estatística.

2.4. AÇÃO DO TDZ

Em estudo da ação do TDZ como desfoliante em algodão, observou-se a produção de altas taxas de etileno, provocando o aparecimento de uma camada de abscisão no pecíolo das folhas. Estes estudos, realizados em plântulas, demonstraram que o aumento de produção do gás, ocorria 24 horas após o tratamento e a camada de abscisão se formava 40 horas depois. Relata o autor, revendo a literatura, que as ações do TDZ não se restringem apenas a estas. Ocorre também formação de calo em soja e aumento da ação das citocininas (Suttle, 1985). Segundo Sankhla et al. (1994), o TDZ possui estrutura diferente das citocininas, as adeninas-purinas, sendo sua estrutura principal a fenil-urea. Para estes autores outras ações além da desfolia em algodão são: germinação de sementes de alface, quebra da dormência das gemas laterais, promove o desenvolvimento de

calos, induz a formação de gemas, estimula a produção de etileno, retarda a senescência foliar e reduz a atividade da nitrato redutase.

O regulador de crescimento vegetal N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea, o thidiazuron (TDZ), possui alta atividade na promoção do crescimento em cultura de calos, em *Phaseolus lunatis* cv. Kengstor. A ação do TDZ é similar a ação dos derivados do N-phenyl-N'-4'pyridylurea mostrando atividade de citocinina do tipo adenina. O TDZ é um composto presente nos desfolhante utilizados em algodão (Mok et al., 1982).

Segundo Murthy et al. (1998) o TDZ, graças às suas características estruturais, tem efeito de auxinas e de citocininas no crescimento e diferenciação de explantes em culturas para indução de calos e embriões somáticos. Porém, seu modo de ação não é conhecido, assim eventos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na morfogênese não podem ser atribuídos a ele. Algumas possibilidades de ação inclui a modificação da membrana celular, ascensão e assimilação de nutrientes.

Em cultura de tecidos, o TDZ traz efeitos morfogênicos no desenvolvimento de plantas (Sankhla et al., 1994). Segundo Huetteman & Preece (1993) em trabalhos com TDZ em cultura de tecidos de plantas lenhosas, observou-se que é uma potente citocinina que pode ser utilizada nestes tipos de plantas, *in vitro* estabiliza e permite a proliferação de espécies considerada de difícil propagação. Em muitos casos, explantes que

normalmente não se desenvolveriam em meio de cultura contendo amino-purina, apresentam bom resultados com o TDZ. A concentração deste produto nestes casos é exigida em pequenas doses, de 10 a 1.000 vezes menores do que as quantidades de citocininas normalmente utilizadas. Lógico é que esta concentração está na dependência da espécie, condições do explante e objetivos. O ideal é o uso de concentração reduzida deste fitoregulador na segunda ou terceira subcultura, em comparação à primeira para proliferação celular.

2.5. AÇÕES DO TDZ EM COMBINAÇÃO COM OUTROS REGULADORES VEGETAIS

A utilização de TDZ em meio de cultura foi relatado como adequada por Nielsen et al. (1995). O experimento constituiu-se na utilização de TDZ e BA nas fases de subculturas, após período de indução em solução contendo 20 μM (4,5 mgL^{-1}) de BA, em planta de *Miscanthus x Ogiformis* Honda “Giganteus”. A constatação foi que o uso sinérgico de BA e TDZ na primeira subcultura e em subculturas seguintes, melhorava a indução e alongamento das gemas axilares. Obteve-se de 10 a 12 gemas axilares com 20 μM de BA e transferência para meio com 30 μM (6,6 mgL^{-1}) de TDZ. Na fase de alongamento, obteve-se a maior porcentagem de gemas com 2 e 3 cm de comprimento. Segundo os autores, o modelo de ação do TDZ não está bem claro, porém podem ser levantadas algumas hipóteses: 1) o TDZ promoveria a conversão de ribonucleotídeos das citocininas em agentes

biologicamente mais ativos de ribonucleosídeos, isto em calos de *Phaseolus lunatis* L. (Capelle et al. 1983); 2) poderia ocorrer a estimulação pelo TDZ das citocininas endógenas (tipo adeninas) ou inibição de sua degradação (Thomas & Katterman, 1986); 3) os resultados sugerem que a adenina e citocininas do tipo fenil-urea têm um local comum de ação em células de plantas. O BA e o TDZ teriam um receptor comum o CBP (“Cytokinin-binding protein”) com duas pontas de ligação. Em um local de ligação se encaixaria uma citocinina do tipo adenina, endógena, e em outro local se encaixaria a citocinina do tipo fenil-urea. A aplicação de TDZ provocaria a ocupação de um terceiro local no receptor de CBP, o que aumentaria a ação sobre as células, induzindo seu maior desenvolvimento. Porém, a ação separada do TDZ para proliferação celular não se mostrou adequada.

Trabalhos com *Malus domestica* Borkh (maça Gala) observaram que a produção de gemas, assim como o alongamentos destas, foi eficiente com a aplicação de 10,0; 1,0 ou 0,1 μM (2,2, 0,2, 0,02 mgL^{-1}) de TDZ, tanto quanto a aplicação de 4,4 μM (1,0 mgL^{-1}) de BA, após 6 semanas de tratamento, indicando que o TDZ é eficiente da mesma forma que o BA, porém exigindo concentrações menores. O tamanho das gemas obtidas foi menor na presença do TDZ a 0,1 μM (0,02 mgL^{-1}) em relação ao BA a 4,4 μM (1,0 mgL^{-1}) (Nieuwkerk et al., 1986).

Trabalhos comparativos sobre a eficiência do TDZ e BA podem ser encontrados, como o de Le Roux & Van Staden (1991), onde observou-se

que para várias espécies de eucalipto obtiveram-se resultados diferentes de eficiência no processo de organogênese, após 28 dias de cultivo. Os híbridos de *Eucalyptus smithii* x *Eucalyptus saligna* se desenvolveram melhor com $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ de TDZ, enquanto que concentrações de $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ produziram melhores resultados em *Eucalyptus macarthurii* e *Eucalyptus smithii*. Porém, a concentração de $0,2 \text{ mgL}^{-1}$ de BA foi mais eficiente que o TDZ, induzindo maior número de gemas em híbridos de *Eucalyptus smithii* x *Eucalyptus saligna*.

Teste de eficiência do TDZ e comparações do seu comportamento em relação a AIA e ao BA, através da medição da produção de etileno, demonstraram que BA a $10 \text{ } \mu\text{M}$ ($2,2 \text{ mgL}^{-1}$) e TDZ também a $10 \text{ } \mu\text{M}$ ($2,2 \text{ mgL}^{-1}$) produziram 14,5 nL e 17,7 nL de etileno, respectivamente, sendo que o uso de Ca^{+2} a 10 mM (10 mgL^{-1}) em combinação com as concentrações dos fitorreguladores acima citados, produziram 84,7 nL (BA + Ca^{+2}) e 123,9 nL (TDZ + Ca^{+2}). Derivados do TDZ na presença de Ca^{+2} também demonstraram eficiência na produção de etileno. Segundo estes autores, isto indica que o TDZ e seus derivados produzem ação similar ao BA, promovendo portanto proliferação de calos em *Vigna radiata* L. Concentrações de TDZ a $10 \text{ } \mu\text{M}$ ($2,2 \text{ mgL}^{-1}$) + AIA a $10 \text{ } \mu\text{M}$ ($1,75 \text{ mgL}^{-1}$) produziram 130,6 nL de etileno, enquanto BA a $10 \text{ } \mu\text{M}$ ($2,2 \text{ mgL}^{-1}$) + AIA a $10 \text{ } \mu\text{M}$ ($1,75 \text{ mgL}^{-1}$) produziram 91,4 nL do gás, demonstrando que o TDZ é altamente ativo e que a produção de etileno é similar à das amino-purinas (Yip & Yang, 1986).

Azmi et al. (1997) trabalharam com *Eucalyptus globulus* e obtiveram ótimos resultados tanto com 0,01 ou 1 mgL⁻¹ de ANA + 0,2 mgL⁻¹ de BA, como com 0,2 mgL⁻¹ de BA + 0,2 mgL⁻¹ TDZ em meio MS. A taxa de regeneração de hipocótilos foi acima de 70 % em materiais com 5 a 20 gemas.

Quatro clones de *Eucalyptus* spp. foram cultivados por Lima (1998) em meio de cultura com a presença de TDZ. Híbridos de *E. urophylla* x *E. grandis* e de *E. grandis* x *E. urophylla* foram testados com as concentrações de 0; 0,001; 0,01; 0,1 e 1,0 mgL⁻¹ de TDZ associadas a duas concentrações de AIA 0 e 0,1 mgL⁻¹. Foram avaliados o peso de material fresco, o peso de material seco e o comprimento médio das gemas. Concluiu-se que a concentração de TDZ mais adequada para a fase de multiplicação foi de 0,01 mgL⁻¹ para todos os clones testados.

Thomas & Katterman (1986) estudaram as ações do TDZ e de citocininas em *Raphanus sativus* L.. Segundo estes autores, concentrações de 10⁻⁷ M (0,02 mgL⁻¹) e 10⁻⁵ M (2,2 mgL⁻¹) de TDZ, produziram maiores quantidades de peso fresco, em comparação às mesmas concentrações de BA. Aplicação exógena das adenina-purinas ZEA ou BA é eficiente quanto a aplicação de TDZ, produzindo os efeitos tradicionais. Concentrações menores de TDZ, quando comparadas a outras citocininas, produzem crescimento e divisão celular. Análises cromatográficas indicaram que o TDZ estimulam o acúmulo de citocinina amino-purina e/ou sua síntese.

Após o tratamento com TDZ, em culturas de calos da espécie citada, adenina-purinas foram encontradas em quantidades similares às aquelas observadas quando o material era testado com zeatina e zeatina ribose. Isto poderia indicar que o TDZ estimula a conversão de citocininas nucleotídeos para nucleosídeos. Isto explica a não necessidade de utilização de citocinina exógena na presença de TDZ.

Tibok et al. (1995), trabalharam com hipocótilos de *Eucalyptus urophylla*, em meio de cultura MS. Explantes de plântulas de 14 dias foram cultivados em meio suplementado com 0,1 a 0,5 mgL⁻¹ de ANA e 0,1 a 1,0 mgL⁻¹ de BA ou 0,05 a 2,0 mgL⁻¹ de ANA e 0,01 a 2,0 mgL⁻¹ de TDZ. O melhor resultado foi obtido foram 37,5% de regeneração das brotações em meio contendo 0,2 mgL⁻¹ de ANA e 0,2 mgL⁻¹ de BA .

O processo de diferenciação de embriões somáticos em plântulas de *Arachis hypogaeae* L. foi obtido a partir de sementes germinadas em meio suplementado com TDZ a 10 µM (2,2 mgL⁻¹). Embriogênese somática foi observada em todas as plântulas, sendo que os embriões ocorreram na região apical dos cotilédones e hipocótilos. Segundo estes autores, a ação do TDZ pode ser explicada pela sua regulação da biossíntese ou acumulação de citocinina, ou mesmo pelo fato deste composto químico balancear o equilíbrio de auxina e citocinina requerido para o processo (Saxena et al., 1992).

Segundo Capelle et al. (1983) o TDZ é extremamente eficiente e estimularia o crescimento de calos em *Phaseolus lunatis*. A sua atividade é tão grande quanto a da zeatina, como ficou demonstrado no trabalho realizado pelos autores, através da atividade N⁶ do derivado de adenina. Os resultados mensurados pelo [¹⁴C] TDZ e [¹⁴C] ZEA, indicam também, atividade maior do TDZ.

Murthy et al. (1995) estudaram o comportamento das plântulas de *Arachis hypogaea* (amendoim) em relação à presença de TDZ. A dose que permitiu o maior número de embriões foi a 5,0 μM (1,1 mgL⁻¹), sendo que o tempo de exposição para indução foi de 2 dias, e o mais adequado 10 dias (10,0 μM (2,2 mgL⁻¹) de TDZ). A presença deste regulador vegetal no meio de cultura provocou alterações na concentração de adenina, que aumentou, adenosina, DHZ (dihidrozeatina) e diminuiu a concentração de 2iP endógeno, em tecidos de cotilédones, suplementado com 10 μM (2,2 mgL⁻¹) de TDZ, durante 7 dias. A análise feita no tecido de hipocótilo demonstrou aumento nos níveis de adenina, AIA e tripamina, com diminuição de DHZ, com presença de 10 μM de TDZ (2,2 mgL⁻¹) pelo período de 5 semanas. Segundo os autores, esta modificação nos níveis de hormônios endógenos podem explicar a ação do TDZ. Fato importante é notar que ocorre aumento da tripamina, precursor do AIA.

Laloue & Fox (1989) estudaram o comportamento de uma proteína que se liga a citocininas, presente em grandes quantidades em embriões de

trigo, a citocinina-oxidase. A alta afinidade desta proteína a citocininas e seu peso molecular, indica sua diferença com as outras citocinina-oxidases já estudadas. Porém, assim como nos casos já conhecidos, o oxigênio é requerido para a reação. O 2iP e a ZEA são degradadas, o BA é menos intensamente degradado e tem alguma influência na inibição da degradação do 2iP. O TDZ inibe fortemente a degradação do 2iP e é altamente ativo.

Sankhla et al. (1994) utilizaram diversas concentrações de TDZ, obtendo melhores resultados com 0,1 μM (0,02 mgL^{-1}) em epicótilo e hipocótilo, de *Albizia julibrissin*. Outras citocininas foram utilizadas, como a KIN, BA, 2iP e ZEA. Observaram que o TDZ poderia induzir a formação de fenil-ureas que inibem a ação da citocinina oxidase, permitido equilíbrio e ou aumento de citocinina endógena.

Para indução e alongamento de gemas em *Acer saccharinum* L., Preece et al. (1991) utilizaram concentrações de 1 a 500 nM (2×10^{-4} a 0,1 mgL^{-1}) de TDZ obtendo os melhores resultados para número de gemas a 100 e 500 nM (0,02 e 0,1 mgL^{-1}); comprimento de gemas maiores que 5 mm em concentrações de 50 e 100 nM (0,01 e 0,02 mgL^{-1}); volume de calo em mm^3 a 100 nM (0,02 mgL^{-1}), após o período de 2 meses de cultura. Outras citocininas também foram utilizadas, sendo que o BA a 10nM e 50nM (0,002 e 0,01 mgL^{-1}) apresentou os melhores resultados para número de gemas; KIN a 10 e 50 nM (0,002 e 0,01 mgL^{-1}); ZEA a 10 e 50 nM (0,002 e 0,01 mgL^{-1}); 2iP a 50 e 100 nM (0,01 e 0,02 mgL^{-1}).

Al-Juboory et al. (1991) utilizaram varias concentrações de TDZ em combinação com ANA, para formação de raíz, gema e calo em *Hedera camariensis* L., obtendo melhor combinação com 40 μM (7,4 mgL^{-1}) de ANA e 0,1 e/ou 0,5 μM (0,02 e/ou 0,1 mgL^{-1}) de TDZ, após 4 semanas de cultivo.

Preece & Imel (1991) utilizaram vários níveis de AIB e TDZ para indução de calo e formação de gemas adventícias em *Rhododendron*. Após 16 semanas de tratamento, as folhas exibiam a presença de maior quantidade de calos quando se combinavam 1,0 μM (0,2 mgL^{-1}) de AIB e TDZ ou 10 μM (2,0 mgL^{-1}) de IBA e 0,1 μM (0,02 mgL^{-1}) de TDZ ou 100 μM (20,4 mgL^{-1}) de AIB e 0,1; 1,0; 10,0 μM (0,02, 0,22, 2,2 mgL^{-1}) de TDZ. A maior quantidade de gemas foi obtida com 1 μM (0,2 mgL^{-1}) de AIB e 10,0 μM (2,2 mgL^{-1}) TDZ. A combinação de 10 μM (2,0 mgL^{-1}) de AIB e 50 μM (10,16 mgL^{-1}) de 2iP forneceu o maior número de gemas maiores que 5 mm. Quando se combinou AIB e TDZ, ocorreu maior número gemas maiores que 5 mm nas concentrações de 1 μM (0,2 mgL^{-1}) de AIB e TDZ.

Zhou et al. (1994) utilizaram TDZ em combinação com 2,4-D na embriogênese somática de *Cayratia japonicas*. As observações permitiam identificar a ação do TDZ, que segundo os autores estimularam os meristemas e a formação de gemas *in vitro*. Segundo estes, houve uma

otimização do balanço de citocinina. O TDZ estimulou a ação das citocininas e aumentou sinergismo com as auxinas (2,4-D ou ANA).

Fiola et al. (1990) utilizaram TDZ na organogênese de cotilédones e folha de *Rubus*, observando que concentrações de 5-10 μM (1,1 - 2,2 mgL^{-1}) e 5-20 μM (1,1 - 4,4 mgL^{-1}), respectivamente, seriam mais adequados. Comparando-se BA ao TDZ, a 20 μM (4,4 mgL^{-1}), o TDZ apresentou 18% de organogênese em folhas, enquanto o BA obteve zero. Para 5 μM (1,1 mgL^{-1}), o TDZ mostrou 8%, enquanto o BA somente 3%.

Nielsen et al. (1993) testaram a eficiência do TDZ em gemas axilares de *Miscanthus sinensis* (Thumb.) Anderss, após a utilização de 20 μM (4,5 mgL^{-1}) de BA. Os resultados mostram que há influência da interação do BA e o TDZ, sendo este último mais eficiente que a KIN e o 2iP nas subculturas, para número de gemas, tamanho e porcentagem de gemas clorofiliadas. A concentração ideal de BA está próxima de 10 μM (2,25 mgL^{-1}), mesmo valor observado para o TDZ. Em relação ao tamanho de gemas, o ótimo para o BA foi de 0,01 a 0,1 μM (0,002 a 0,02 mgL^{-1}), mesmo resultado para o TDZ. Estes dados mostram que a ação do TDZ se equivale à ação do BA, contrariando outros trabalhos, com outras espécies, que identificaram melhores resultados com o uso do TDZ no crescimento de gemas.

Alguns trabalhos podem ser encontrados utilizando TDZ em *Nicotiana tabacum* L., onde a concentração de $0,10 \mu\text{M}$ ($0,02 \text{ mgL}^{-1}$) se mostrou mais adequada para a embriogênese somática, após 4 semanas de cultivo. Combinações de BA e ANA foram utilizados e comparadas ao TDZ. BA a $4,4 \mu\text{M}$ ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) + ANA a $0,54 \mu\text{M}$ ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) produziram média de $80 \pm 4,5$ embriões somáticos por disco de folha; BA a $4,4 \mu\text{M}$ ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) + ANA a $0,54 \mu\text{M}$ ($1,0 \text{ mgL}^{-1}$) produziram $34 \pm 3,8$ enquanto TDZ a $1,0 \mu\text{M}$ ($0,22 \text{ mgL}^{-1}$) produziu $170 \pm 6,5$ embriões em média (Gill & Saxena, 1993). Resalta os autores a possibilidade de substituição do BA e ANA pelo TDZ neste processo, incluindo que sua ação induziria citocinina endógena, como os trabalhos em *Phaseolus lunatis* mostrou, alterando, segundo os autores, o metabolismo da citocinina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

O trabalho experimental foi desenvolvido no laboratório de Cultura de Tecidos da Champion Papel e Celulose Ltda., sediada em Mogi Guaçu - SP (latitude 22° 21' S, longitude 48°58' e altitude 639 m), nos meses de maio e junho de 1997, de acordo com o processo comercial de produção de mudas.

Os clones utilizados no processo foram árvores selecionadas pelo volume e qualidade da polpa. O material vegetal foi coletado da copa das árvores superiores. Para facilitar o manejo e assepsia do material vegetal, foram feitos enxertos, que após um mês emitiram brotações. As brotações foram coletadas e submetidas ao processo de desinfestação para introdução no laboratório:

- Solução detergente comum (23%), agitados por 15 minutos.
- Enxague em água destilada.
- Solução de benlate 0,1% , agitados por 15 minutos.
- Enxague em água destilada
- Em câmara asséptica: Foram necessários 5 beakers previamente autoclavados, sendo que um deles possuía uma solução de hipoclorito de sódio 23% com a adição de 8 gotas de Tween 20 para cada litro. Os demais frascos continham água autoclavada.
- Os ramos, envoltos em gaze, foram submersos em solução de hipoclorito de sódio, e agitados por 15 minutos.
- Na última etapa, os ramos foram passados nos frascos com água para retirar o hipoclorito.

Após a desinfestação, os ramos foram segmentados em câmara de fluxo laminar, produzindo os explantes iniciais, com as regiões nodais de onde se desenvolvem as brotações. Estas brotações foram cultivadas em meio de cultura JADS (Correia, 1993), suplementado com sacarose, 0,5 mgL⁻¹ de BA , ágar (5 mg L⁻¹) e as seguintes vitaminas e aminoácidos:

- Piridoxina.....0,5 mgL⁻¹
- Ácido nicotínico.....0,5 mgL⁻¹
- Tiamina.....5,0 mgL⁻¹

- Myo-inositol.....100 mgL⁻¹
- Pantetonato de Cálcio.....2,5 mgL⁻¹
- Glicina.....2,0 mgL⁻¹
- L-glutamina.....146 mgL⁻¹
- L-arginina.....7,0 mgL⁻¹
- L-cisteína.....2,5 mgL⁻¹
- Ácido ascórbico.....10,0 mgL⁻¹
- Adenina.....10,0 mgL⁻¹

Para o preparo do meio de cultura, o primeiro passo foi a preparação das soluções estoque (Tabela 5), as soluções de macronutrientes e micronutrientes, guardadas em frascos âmbar e mantidas a 8° C. Os demais elementos do meio de cultura foram pesados e dissolvidos diretamente no meio de cultura, com excessão do ágar, que foi dissolvido em água sob aquecimento e agitação e posteriormente adicionado às soluções. O pH foi calibrado em 5,8 (na ausência do ágar). O meio de cultura foi distribuído com o uso de dispensador, marcando 15 ml por tubos de ensaio (18x15), e fechados com tufos de algodão. A esterilização deste material foi feita em autoclave com temperatura de 127° C e 1,5 atm por 15 minutos.

Tabela 5 : Concentrações (g L^{-1}) das soluções nutrientes para preparo do meio JADS

SAL	QUANTIDADE	DILUIÇÃO
Nitrato de Amônia (NH_4NO_3)	32,40 g	Para 1 Litro
Nitrato de Potássio (KNO_3)	80,90 g	Para 1 Litro
Nitrato de Cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	118,10 g	Para 2 Litros
Fosfato de Potássio (KH_2PO_4)	40,80 g	Para 1 Litro
Ácido Bórico (H_3BO_3)	310 mg	Para 1 Litro
Molibdato de Sódio ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	15 mg	Para 1 Litro
Cloreto de Cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	25 mg	Para 1 Litro
Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	73,95 g	Para 2 litros
Sulfato de Manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1,69 g	Para 1 Litro
Sulfato de Zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	432 mg	Para 1 Litro
Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	125 mg	Para 1 Litro
Sulfato de Ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	5,56 g	Para 2 Litros
Na_2 EDTA	7,45 g	

Os explantes foram introduzidos e repicados a cada 25 dias de cultivo. Nas repicagens, os tecidos oxidados foram retirados dos nós epicórmicos.

3.2. EXPERIMENTOS PRELIMINARES

Foram realizados experimentos preliminares para se conhecer melhor a ação do TDZ como citocinina. Foram utilizados 5 clones, testando diferentes concentrações de BA e TDZ, na fase de multiplicação, utilizando como meio de cultura o JADS. As doses utilizadas foram, 0,2; 0,5 e 0,7 mgL^{-1} para cada uma das fontes.

Os resultados mostraram que as concentrações de TDZ utilizadas foram muito altas, causando formação intensa de calos, deformidades das estruturas, vigor ruim com folhas secas e quebradiças. Os tratamentos com maiores concentrações, apresentaram grande calosidade e deformação das estruturas, e os tratamentos com menores concentrações que apresentaram vitrificação, com folhas enrijecidas e quebradiças.

3.3. EXPERIMENTOS DESENVOLVIDOS

Os materiais genéticos utilizados foram os clones A, B e C, potenciais para o programa de melhoramento genético e produção comercial da empresa, selecionados pelo crescimento em volume e qualidade da polpa

para produção de celulose. Os clones utilizados são híbridos de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, utilizados em plantios comerciais da empresa. O material vegetal foi introduzido no laboratório nos anos 1996, 1993 e 1994, respectivamente.

Este experimento foi desenvolvido durante a fase de multiplicação *in vitro*. Os explantes utilizados para estes experimentos foram manipulados em câmaras de fluxo laminar (após cultivo por 7 dias em meio contendo somente água, ágar e açúcar), sob papel absorvente esterilizado em autoclave, a repicagem foi feita com pinças e bisturis autoclavados e flambados eventualmente para manter a assepsia.

Os explantes iniciais utilizados constavam de tufo de gemas, apresentavam diâmetro de 8 a 10 mm, quando separadas as partes aéreas e após a extração de tecidos oxidados dos explantes originais. Burger (1987) em trabalhos com *Eucalyptus sideroxylon*, utilizou explantes de 15 mm de diâmetro. Correia (1993), trabalhando com *Eucalyptus grandis*, utilizou explantes iniciais de 10 mm de diâmetro e Trindade et al. (1990), também utilizaram explantes de 10 mm de diâmetro para *Eucalyptus globulus*.

O procedimento adotado para a confecção do meio de cultura foi o mesmo descrito no item 3.1., variando somente os tratamentos de citocininas descritos abaixo. Os tratamentos foram definidos utilizando-se três reguladores de crescimento (KIN, BA e TDZ), variando-se as

concentrações:

T01 - ausência de citocininas ($0,0 \text{ mgL}^{-1}$)

T02 - $0,25 \text{ mgL}^{-1}$ de KIN

T03 - $0,50 \text{ mgL}^{-1}$ de KIN

T04 - $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ de KIN

T05 - $0,25 \text{ mgL}^{-1}$ de BA

T06 - $0,50 \text{ mgL}^{-1}$ de BA

T07 - $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ de BA

T08 - $0,001 \text{ mgL}^{-1}$ de TDZ

T09 - $0,003 \text{ mgL}^{-1}$ de TDZ

T10 - $0,005 \text{ mgL}^{-1}$ de TDZ

O uso de KIN e BA, como fontes de amino-purinas nos tratamentos acima é que são citocininas muito indicadas para espécies florestais como observado por experiências anteriores e por autores como Minocha (1982) e Palta (1982), que comparou ZEA, 2iP, KIN e o BA, observando como melhores resultados o BA e depois a KIN.

As baixas concentrações de TDZ escolhidas foram devido aos resultados dos testes preliminares e ao trabalho realizado por Huetteman & Preece (1983), que sugerem a utilização de concentrações de 10 a 1000 vezes menores que outras citocininas em meio de cultura. Nieuwkerk et al. (1986) também sugere menores concentrações deste produto.

Os explantes foram cultivados em tubos de ensaio de 18 x 150 mm, com 15 ml de meio de cultura JADS (Correia, 1993), e fechados com tufos de algodão. Cada tubo de ensaio continha um nó epicórmico. As culturas foram mantidas por 28 dias em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, com lâmpadas Branco Real Plus, iluminância de 3000 lux e temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. As avaliações foram realizadas aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias após o início do experimento, medindo-se:

- Peso de Material Fresco (mg)
- Peso de Material Seco (mg)
- Altura média das gemas (mm)
- Diâmetro médio dos nós epicórmicos (mm)

3.4. TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO (TCR)

Cálculo da taxa de crescimento relativo, considerando a equação definida por HUNT (1982):

$$\text{TCR} = (\ln \text{PMS2} - \ln \text{PMS1} / \text{T2-T1}) * 100$$

Onde : $\ln$ = logaritmo neperiano

PMS2 = produção de matéria seca no período de tempo
final

PMS1 = produção de matéria seca no período de tempo
inicial

T2 = tempo final

T1 = tempo inicial

Os valores definidos por esta taxa mostram o crescimento das culturas a cada 7 dias, a partir do peso de material seco, possibilitando a definição da melhor fase do crescimento para a nova manipulação do material vegetal.

3.5. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Foram utilizados 200 nós epicórmicos, para cada clone. Os resultados foram colhidos a cada 7 dias, sendo então sorteados, coletados os resultados e descartados 4 nós epicórmicos, por cada clone, por cada tratamento, por dia de avaliação.

Os resultados foram submetidos a teste de comparação de médias para tratamentos e tratamentos dentro de cada avaliação.

Os tubos foram dispostos em prateleiras em sala asséptica, com grande homogeneidade em luz e temperatura, não sendo necessário a divisão em blocos. O delineamento estatístico adotado foi inteiramente casualizado.

3.6. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos são apresentados de acordo com os itens avaliados: peso de material seco, diâmetro, altura e taxa de crescimento relativo.

O peso de material seco mostra o crescimento das culturas em diâmetro, altura das gemas e a quantidade de calosidade formada na base dos nós epicórmicos. O diâmetro dos nós epicórmicos expressa de forma indireta o número de gemas e número das gemas que formam os nós epicórmicos.

Os melhores tratamentos devem ser aqueles que possuem maiores valores de peso de material seco, porém observando-se a altura das gemas não está influenciando neste valor. Isto porque na fase de multiplicação, espera-se maior número de gemas, porém com altura uniforme. Altura desuniforme entre as gemas de um nó epicórmico leva à dominância de

algumas gemas e consequente inibição do desenvolvimento das outras.

As taxas de crescimento relativo são indicadas pelas médias dos pesos de material seco dos tratamentos nos diferentes períodos, indicando o comportamento das culturas.

É importante também comentar a dificuldade de padronização dos explantes, já que o processo é manual e todas as calosidades e oxidações devem ser descartadas, além disso o número de gemas, tamanho de gemas não são controladas no processo. Este fator influiu muito na variação que surge mesmo entre as repetições de um mesmo tratamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segue abaixo a apresentação dos resultados de acordo com as formas de avaliação.

4.1. AVALIAÇÃO VISUAL DOS CLONES

As Figura 5, 6 e 7 mostram o desenvolvimento das culturas dos clones A, B e C, respectivamente nos dias de avaliação. É interessante notar que nos tratamentos com atuação mais efetiva da citocinina há maior multiplicação das gemas e menor alongamento, que não é desejado nesta fase do processo pelo desenvolvimento da dominância apical, como explicado por Salisbury & Ross (1991).

As taxas de alongamentos para o clone A não são muito altas, como podemos observar aos 28 dias. Porém, a ausência de citocininas, a KIN e o TDZ mostram uma tendência ao alongamento.

Figura 5: Cultivo do clone A; **a.** aos 0 dias, mostrando o padrão inicial dos nós epicórmicos utilizados, **b.** aos 7 dias, **c.** aos 14 dias, **d.** aos 21 dias pode-se observar a atuação dos diferentes tratamentos, **e.** aos 28 dias, as gemas alongadas não aparecem nos tratamentos 5, 6 e 7, com utilização de BA.

Figura 6: Cultivo do clone B; **a.** aos 0 dias, mostrando o padrão inicial dos nós epicórmicos utilizados, **b.** aos 7 dias, **c.** aos 14 dias, **d.** aos 21 dias pode-se observar a atuação dos diferentes tratamentos, **e.** aos 28 dias, as gemas alongadas aparecem em menor quantidade nos tratamentos 5, 6 e 7, com utilização de BA.

Os tratamentos com BA (tratamentos 5, 6 e 7), na figura 5, ilustram o material vegetal esperado nesta fase de cultivo, com grande número de gemas uniformes, reduzindo o desenvolvimento de gemas alongadas.

No clone B observa-se uma tendência de melhor qualidade na formação de gemas nos tratamentos com BA (tratamentos 5, 6 e 7), pois os nós epicórmicos não apresentaram gemas alongadas. Na ausência de citocininas, porém, houve uma grande tendência ao alongamento já desde as primeiras semanas de cultivo.

Os tratamentos com TDZ (tratamentos de 8 a 10) e KIN (tratamentos 2 a 4) mostraram, na figura 6, grande tendência ao alongamento, logo nas primeiras semanas de cultivo, sugerindo que as concentrações utilizadas podem ter sido muito baixas.

Fica muito claro após a comparação das figuras 5 e 6 que há uma visível diferença de respostas entre os clones A e B, em relação aos tratamentos submetidos, sendo que o clone B apresentou maior necessidade da atuação de reguladores vegetais em maiores concentrações.

Observa-se a diferença entre os clones A e B com relação ao seu comportamento na cultura de tecidos. A figura 7 mostra o clone C nos diferentes dias de avaliação.

Figura 7: Cultivo do clone C; **a.** aos 0 dias, mostrando o padrão inicial dos nós epicórmicos utilizados, **b.** aos 7 dias, **c.** aos 14 dias, **d.** aos 21 dias pode-se observar a atuação dos diferentes tratamentos, **e.** aos 28 dias, as gemas alongadas aparecem em menor quantidade nos tratamentos 5, 6 e 7, com utilização de BA.

Como já observado nos clones A e B, o uso do TDZ levou ao alongamento das gemas a partir da terceira semana de cultivo, e neste clone foi maior o alongamento das gemas com TDZ, do que na ausência de citocininas. O comportamento deste clone, portanto, é ligeiramente diferente dos dois anteriores.

Visualmente, observa-se que o diâmetro dos nós epicórmicos e o tamanho das gemas para o clone C é superior aos clones anteriormente apresentados.

4.2. AVALIAÇÃO NOS DIFERENTES TRATAMENTOS

4.2.1. PESO DE MATERIAL SECO

A Tabela 6 mostra os resultados médios de peso de material seco (mg) obtidos em cada tratamento, com as letras indicando os resultados do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Tabela 6: Média do peso de material seco (mg) nos diferentes tratamentos(1)

Tratamentos	Clone A	Clone B	Clone C
1. testemunha	28,89 A	13,93 D	29,10 A
2. 0,25 KIN	28,37 A	20,83 ABC	39,28 A
3. 0,50 KIN	30,09 A	21,82 ABC	34,75 A
4. 0,75 KIN	30,95 A	24,29 AB	40,21 A
5. 0,25 BA	30,45 A	22,36 ABC	37,92 A
6. 0,50 BA	35,71 A	19,26 ABCD	34,03 A
7. 0,75 BA	34,85 A	20,64 ABC	40,22 A
8. 0,001 TDZ	30,53 A	15,75 CD	29,80 A
9. 0,003 TDZ	27,35 A	18,30 BCD	34,24 A
10. 0,005 TDZ	30,72 A	25,66 A	37,82 A

(1) Teste de Tukey $\alpha = 0,05$, letras diferentes indicam diferenças significativas.

Não houve diferença significativa entre as médias obtidas nos tratamentos para o clone A, porém pode-se observar as maiores médias nos tratamentos 6 e 7 referentes aos cultivos em meio de cultura com as maiores concentrações de BA, confirmando as observação visuais.

Os valores obtidos para o clone B, são muito menores quando comparados aos clones A e C. Este clone apresentou as maiores diferenças significativas entre tratamentos, pelo teste de média realizado. A maior média apresentada é o tratamento 10, e o tratamento 1 (cultivo na ausência de citocininas) apresentou a menor média.

Observa-se que os valores obtidos para o clone C, são superiores aos valores das médias de peso de material seco dos outros clones. Assim como no clone A não houve diferença significativa apresentada quando analisado pelo teste de tukey a 5%. Os maiores valores foram obtidos pelos tratamentos com maiores concentrações de BA e KIN.

A Figura 8 mostra os valores médios de peso de material seco obtidos após 28 dias de cultivo nos diferentes meios de cultura de acordo com os tratamentos.

Figura 8: Médias do peso de material seco dos nós epicórmicos nos diferentes tratamentos

Para o clone A observa-se maiores valores de peso de material seco nos tratamentos 6 e 7 que utilizaram BA, nas maiores concentrações, e como já discutido anteriormente a partir da Figura 5, há uma maior taxa de multiplicação nestes tratamentos mostrando que os valores obtidos de peso de material seco foram referentes a número de gemas e não foi mascarado pelo alongamento das gemas, confirmando o resultado obtido por Palta (1982), que obteve o BA, como melhor indutor de gemas entre as citocininas.

É importante notar que no clone B o maior valor para peso de material seco está no tratamento 10, que recebeu maior concentração de

TDZ. Porém a partir da Figura 6 pode-se perceber que o maior alongamento das gemas também aconteceu neste tratamento, levando a maiores valores de peso de material seco. Conforme citado anteriormente, não é interessante o alongamento das gemas na fase de multiplicação.

Correia (1993) também observou grandes variações no peso de material seco nos diferentes clones utilizados. Segundo Minocha (1982), a KIN é uma das fontes de citocininas mais utilizadas para espécies florestais pela sua eficiência na produção de gemas.

O tratamento 4 que também se destacou, no clone B, deve ser avaliado com relação ao diâmetro e altura.

Para o clone C os maiores valores para peso de material seco foram obtidos para o tratamento 4, com maior concentração de KIN e o tratamento 7 com a maior concentração de BA. Há uma grande desuniformidade nos valores de peso de material seco para este clone.

4.2.2. DIÂMETRO DOS NÓS EPICÓRMICOS

A Tabela 7 mostra os valores médios de diâmetro de acordo com os tratamentos. Para todos os clones, houve diferença significativa entre os

tratamentos. Pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) os melhores tratamentos para o clone A, foram os que receberam as maiores concentrações de KIN, que apresentam diferenças significativas com relação aos outros tratamentos.

Tabela 7: Média dos diâmetros dos nós epicórmicos nos diferentes tratamentos (1)

Tratamentos	Clone A	Clone B	Clone C
1. testemunha	15,40 AB	14,45 AB	16,73 A
2. 0,25 KIN	15,45 AB	15,50 AB	17,88 A
3. 0,50 KIN	15,95 A	17,33 A	16,50 A
4. 0,75 KIN	15,83 A	16,93 A	17,77 A
5. 0,25 BA	14,80 AB	14,33 AB	16,88 A
6. 0,50 BA	15,18 AB	12,98 B	14,90 A
7. 0,75 BA	14,68 AB	13,18 B	16,95 A
8. 0,001 TDZ	14,33 AB	14,28 AB	17,86 A
9. 0,003 TDZ	12,85 B	15,18 AB	16,38 A
10. 0,005 TDZ	14,68 AB	15,80 AB	15,78 A

(1) Teste de Tukey $\alpha = 0,05$, letras diferentes indicam diferenças significativas.

Nos resultados do clone B pode-se observar que há diferenças estatística entre os maiores valores com KIN e os menores com BA.

A Figura 9 mostra o diâmetro obtido dos nós epicórmicos nos diferentes tratamentos e clones.

Figura 9: Médias dos diâmetros dos nós epicórmicos nos diferentes tratamentos

Para o clone A, as maiores médias estão presentes nos tratamentos com KIN. Os tratamentos com BA que apresentaram os melhores resultados para peso de material seco, quando analisados na Figura 8 também apresentam bons valores de diâmetro.

Os valores de diâmetro, podem ser mascarados, pelo tamanho das gemas. Logo, a KIN, que apresentou tendência ao alongamento na Figura 5, pode apresentar maior valor de diâmetro devido ao tamanho das folhas e das gemas.

Os maiores valores de diâmetro para o clone B, foram obtidos nos tratamentos com as maiores concentrações de KIN, observa-se os menores valores nos tratamentos com BA. Os valores de diâmetro estão sujeitos às influências do material inicial e também ao tamanho das gemas e das folhas.

É interessante notar que o crescimento em diâmetro estagnou nos últimos 7 dias de cultivo. Os valores das médias de diâmetro para 21 e 28 dias apresentaram-se semelhantes para o clone B. Pode-se deduzir que houve um esgotamento de citocininas no meio de cultura e a divisão celular para aumentar o número de gemas cessou. Segundo Caldas et al. (1990), Salisbury & Ross (1991) e Taiz & Zeiger (1991) a formação da parte aérea em cultura de tecidos é regulada pela disponibilidade e interação de duas classes de reguladores vegetais. Se a relação auxinas/citocininas for mantida em taxas mais altas o alongamento é favorecido. Logo, a relação auxinas/citocininas aumentou e favoreceu o alongamento celular, principalmente nos tratamentos onde indica já um alongamento logo no início do cultivo.

É interessante comparar as médias obtidas após os 28 dias de cultivo para os 3 diferentes clones. O clone C apresenta valores maiores de diâmetro quando comparado aos outros. Também os valores de diâmetro para este clone foi muito superior quando comparado a valores obtidos por Gupta et al. (1981) em *Eucalyptus citriodora*.

4.2.3. ALTURA DAS GEMAS

A Tabela 8 mostra os valores médios das alturas de acordo com os tratamentos. Não houve diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5%, entre os tratamentos para o clone A, enquanto para os outros materiais genéticos, houve.

Tabela 8: Média das alturas das gemas nos diferentes tratamentos (1)

Tratamentos	Clone A	Clone B	Clone C
1. testemunha	12,35 A	13,73 ABC	14,28 ABC
2. 0,25 KIN	12,00 A	12,70 BC	12,95 ABC
3. 0,50 KIN	12,13 A	14,50 AB	13,60 ABC
4. 0,75 KIN	12,58 A	14,20 ABC	13,33 ABC
5. 0,25 BA	11,70A	11,95 C	12,60 BC
6. 0,50 BA	11,63A	12,10 C	12,08 C
7. 0,75 BA	11,55A	11,93 C	13,10 ABC
8. 0,001 TDZ	12,20 A	13,70 ABC	16,10 A
9. 0,003 TDZ	11,88 A	14,20 ABC	14,23 ABC
10. 0,005 TDZ	12,03 A	15,10 A	15,78 AB

(1) Teste de Tukey $\alpha = 0,05$, letras diferentes indicam diferenças significativas.

A Figura abaixo mostra o comportamento dos clones com relação à altura das gemas de acordo com os diferentes tratamentos.

Figura 10: Médias das alturas (mm) dos clones nos tratamentos

Deve ficar claro que quanto maior a altura dos explantes, mais indesejável é o tratamento, isto porque com o alongamento das gemas ocorre o problema da dominância apical, que segundo Salisbury & Ross (1991), leva a uma inibição das gemas laterais pela redução da ação das citocininas, logo maiores concentrações de citocininas no meio de cultura reduz o desenvolvimento de gemas alongadas.

Pode-se observar na Figura 10 e na Tabela 8, a grande variação entre as alturas. No clone A, a relação concentração de citocinina com alongamento está demonstrado claramente nos tratamentos com BA (tratamentos 5, 6 e 7), onde menores concentrações de BA resultaram em maiores taxas de alongamento. Observa-se também, que o tratamento 4, com KIN, que apresentou altos valores de diâmetro apresenta a mais alta

média para altura das gemas. Isto mostra que houve um grande desenvolvimento das folhas, aumentando o diâmetro dos nós epicórmicos.

No clone B, altos valores de alturas foram obtidos no tratamento 10, confirmando os comentários anteriores a respeito dos altos valores de peso de material seco. Os tratamentos com altas doses de KIN também apresentaram altos valores para as médias das alturas. Observa-se para este clone que os valores médios das alturas de acordo com os tratamentos. Os maiores valores são encontrados no tratamento 10 e os menores valores são encontrados nos tratamentos com BA, mostrando, então a maior homogeneidade das gemas.

Com estes resultados fica claro que o BA foi a citocinina mais efetiva para o desenvolvimento do clone B, assim como para o clone anteriormente discutido, porém na maior concentração utilizada.

Gupta et al. (1981), fazendo experimentos em cultura de tecidos com BA, em explantes de árvores adultas definiu a variação de concentração de 0,1 a 3,0 mgL⁻¹ como indicados para o cultivo de *Eucalyptus citriodora*. Esta variação deve ser definida por clone, como observa-se no comparação dos clones A e B.

Para o clone C, nota-se que o melhor valor para altura é apresentado pelo tratamento 6, com 0,5 mgL⁻¹ de BA, que também apresentou bons valores de peso de material seco.

Os tratamentos 4 e 7, com $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ de KIN e $0,75$ de BA, respectivamente, que apresentaram os melhores resultados de peso de material seco, também apresentaram bons resultados de diâmetro.

Os piores tratamentos foram novamente os de TDZ. A testemunha se apresentou com menor taxa de alongamento do que no clone B. Talvez este clone possua um nível de citocininas endógenas mais alto que o clone B, por acúmulo, capacidade de produção ou capacidade de absorção do meio de cultura.

Novamente, o BA nas concentrações testadas mostrou-se a melhor fonte para um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* ser cultivado na fase de multiplicação *in vitro*.

Para este clone, assim como para os clones anteriormente analisados o BA, se mostrou mais eficiente, mostrando similaridade com os resultados obtidos por Grattapaglia & Machado (1990), Palta (1982), Sita & Rani (1985), Pinedo (1989), Warrag et al. (1991) e Warrag et al. (1990).

4.3. AVALIAÇÃO NOS DIFERENTES DIAS

4.3.1. PESO DE MATERIAL SECO

A Tabela 9 mostra através das médias de peso de material seco (mg) por dia de avaliação o crescimento dos explantes durante os 28 dias de cultivo. Observa-se a grande diferença das médias de peso de material seco para as últimas avaliações nos itens diâmetro e altura.

Os altos valores de peso de material seco, para o clone B, aos 21 e 28 dias teve influência pela grande presença de gemas alongadas, como já observado na Figura 6.

Tabela 9: Médias dos peso de material seco nas diferentes avaliações (1)

Dias	clone A	clone B	clone C
0	18,16 D	9,79 E	16,00 E
7	22,50 CD	15,77 D	26,38 D
14	27,70 C	19,81 C	34,37 C
21	37,67 B	24,25 B	46,77 B
28	48,22 A	31,79 A	55,17 A

(1) Teste de Tukey $\alpha = 0,05$, letras diferentes indicam diferenças significativas.

A partir do teste de Tukey, pode-se observar que houve diferenças significativas a 5% em todos os clones, nas diferentes avaliações. Para os três materiais genéticos trabalhados as avaliações do dia 28 apresentaram maiores valores de peso de material seco.

A Figura 11 mostra os valores de peso de material seco nas diferentes avaliações.

Figura 11: Médias de peso de material seco (mg) nos diferentes clones nas avaliações

A Figura 11, mostra para o clone C, que o crescimento dos nós epicórmicos mostrados nas avaliações foi homogêneo. Observa-se menores influencias das alturas nestes valores do que foi observada no clone B.

Observa-se no clone A, o crescimento em peso de material seco nos últimos períodos, que pode ser influência do diâmetro, da altura dos nós epicórmicos ou das formações de calos.

4.3.2. DIÂMETRO DOS NÓS EPICÓRMICOS

A Tabela 10 mostra as médias de diâmetro obtidas pela medição das culturas durante os cinco dias de medição.

Tabela 10: Médias dos diâmetros dos nós epicórmicos nas diferentes avaliações (1)

Dias	clone A	clone B	clone C
0	11,38 D	10,14 C	11,74 D
7	13,30 C	12,83 B	14,48 C
14	15,10 B	16,13 A	16,43 C
21	16,73 AB	17,94 A	19,24 B
28	18,06 A	17,94 A	21,94 A

(1) Teste de Tukey $\alpha = 0,05$, letras diferentes indicam diferenças significativas.

Houve diferenças significativa entre os dias avaliados. As diferenças vão diminuindo quanto mais velhas as culturas.

A Figura abaixo mostra os valores de diâmetro, dos clones cultivados, nas diferentes avaliações.

Figura 12: Médias dos diâmetros dos nós epicórmicos nas avaliações

A Figura 12 mostra as médias dos diâmetros obtidas em cada avaliação. Pode-se observar que o crescimento em diâmetro vai sendo reduzido a cada avaliação, provavelmente há algum problema como: liberação de fenóis dificultando a absorção de nutrientes e reguladores de crescimentos, alteração no meio de cultura devido à reação de alguns compostos que ficam indisponibilizados ou que tem sua estrutura modificada, ou competição entre as gemas por alimento e espaço, ou até mesmo a redução do número de gemas induzidas.

É importante observar que, para o clone A, ao contrário das médias de peso de material seco, as médias de diâmetro decresceu em cada avaliação. Provavelmente a altura tenha aumentado consideravelmente atuando nas médias de peso de material seco.

Gupta et al. (1981), obteve após 2 meses de cultivo, para *Eucalyptus citriodora*, variando de 0,1 a 3,0 mgL⁻¹ de BA no meio de cultura explantes de 15 a 20 mm. Os explantes obtidos com a média dos tratamentos após 28 dias foi de para o clone A 18,06, para o clone B 17,94 e para o clone C 21,94 mm, mostrando então que os resultados obtidos no presente trabalho foram mais efetivos pela redução no tempo de cultivo definida quando comparada pelo autor acima.

É interessante comparar as médias obtidas após os 28 dias de cultivo para os 3 diferentes clones. O clone C apresenta valores muito maiores de diâmetro quando comparado aos outros.

4.3.3. ALTURA DAS GEMAS

A Tabela abaixo mostra a média das alturas das gemas nas diferentes avaliações.

Tabela 11: Médias das alturas nas diferentes avaliações (1)

Dias	clone A	clone B	clone C
0	9,09 D	9,79 C	10,84 C
7	11,20 C	11,10 C	12,53 B
14	11,93 BC	13,85 B	13,10 B
21	13,09 B	15,48 A	15,73 A
28	14,71 A	16,84 A	17,49 A

(1) Teste de Tukey $\alpha = 0,05$, letras diferentes indicam diferenças significativas.

A Figura abaixo mostra o comportamento dos clones nas diferentes avaliações.

Figura 13: Médias das alturas nas diferentes avaliações

A Figura 13 mostra as médias das alturas obtidas nos tratamentos a cada avaliação.

Para o clone A, os resultados mostram um crescimento desuniforme em altura, porém crescente a cada avaliação. Deve-se observar que o crescimento nas médias das alturas não são acentuados. Logo, o grande aumento nas médias de peso de matéria seca deve-se ao alongamento das gemas e tamanho das gemas.

A Figura 13 pode ser comparada à Figura 12, para o clone B, referente à diâmetro. Como já discutido anteriormente, não houve crescimento em diâmetro, provavelmente pela redução das taxas de

citocininas no meio de cultura. Logo, a relação auxinas/citocininas aumentou e levou ao alongamento celular. Para este clone é indicado a redução no tempo de cultivo ou o aumento da concentração das fontes de citocininas, que deve ser definido após novos experimentos.

Analisando os valores da Tabela 11 para 28 dias de cultivo e comparando com valores de Sita & Rani (1985), que obtiveram valores de 10 a 15 mm de gemas alongadas após 6 semanas de cultivo. Conclui-se que os valores obtidos neste experimento, para altura de gemas foi muito superior aos resultados obtidos pelo autor que utilizou 0,5 a 2,0 mgL⁻¹ de BA e 0,1 a 1,0 mgL⁻¹ de ANA (que leva ao alongamento das gemas).

4.4. TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO (TCR)

A Figura 14 mostra a taxa de crescimento relativo do clone A, a partir do peso de material seco, indicando o crescimento entre os dias de avaliação. O período 1 corresponde ao aumento de peso de material seco obtido pelas culturas entre os dias 0 e 7 de cultivo. O período 2 é o crescimento em peso de material seco obtido entre os dias 7 e 14, o período 3 é referente aos dias 14 e 21 e o período 4 refere-se ao período de 21 a 28 dias de cultivo.

Figura 14 : taxa de crescimento relativo para o clone A

Observa-se o grande crescimento em peso de material seco no período 3. Este índice pode indicar que as culturas devem permanecer por até 21 dias em crescimento porque além desta fase por algum motivo há uma redução no

crescimento. Podemos relacionar, problemas com a liberação de fenóis, competição entre as gemas, exaustão de elementos no meio de cultura (inclusive citocininas), formação de compostos no meio de cultura que tornam indisponíveis os elementos.

É importante que para este clone os valores médios de peso de material seco são muito fiéis à realidade, já que o alongamento dos explantes não foi muito significativo, logo este índice (TCR), deve ser grandemente considerado.

Os dados de taxa de crescimento relativo para o clone B, são apresentados na Figura 15.

Figura 15 : taxa de crescimento relativo clone B

É importante lembrar que o período 4 foi grandemente afetado pelos tratamentos que apresentaram altas taxas de alongamento. A redução da taxa de crescimento no período 3, deve estar relacionada à exaustão de reguladores vegetais no meio de cultura.

Este índice mostra também a necessidade de redução do tempo de cultivo. É interessante notar que no primeiro período há um grande crescimento que cai bruscamente nos períodos seguintes. Isto indica que este clone tem a capacidade de absorver e exaurir o meio de cultura nos primeiros dias de cultivo. Diferente do clone A, que necessita de uma fase de adaptação após o estresse da repicagem.

A taxa de crescimento relativo para o clone C está demonstrada na Figura abaixo.

Figura 16: taxa de crescimento relativo clone C

Como já demonstrado no clone B, a taxa inicial de crescimento é muito boa para este clone, principalmente considerando-se que não há alongamento neste período, diferindo do clone A. Observa-se também que nos períodos seguintes, há uma grande redução na taxa de crescimento, devido à problemas já observados anteriormente.

Através desta análise, pode-se indicar para este clone a redução no tempo de cultivo para 21 dias, já que no período 4 também foi observada uma grande redução na TCR, provavelmente devido à exaustão do meio de cultura. Conforme observado na Figura 7 e na Tabela 6, este clone foi o que apresentou maior crescimento dos nós epicórmicos, necessitando para isto, maiores quantidades de nutrientes e fontes de energia.

5. CONCLUSÕES

- Para o clone A, os melhores tratamentos foram os com maiores concentrações de BA ($0,5$ e $0,75 \text{ mgL}^{-1}$), que apresentaram maior uniformidade das gemas. O tempo de cultivo para este clone deve ser de 21 dias.

- Para o clone B, o BA também se mostrou como a melhor fonte de citocininas. A concentração mais indicada é a de $0,75 \text{ mgL}^{-1}$. A redução no tempo de cultivo também deve ocorrer, e deve ser menor que 21 dias.

- Para o clone C, a KIN a $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ mostrou grande potencial para multiplicação deste clone. Outros bons tratamentos foram $0,5$ e $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ de BA. Novamente a redução no tempo de cultivo foi demonstrado por este clone, deve ficar em torno de 21 dias.

O BA trouxe melhores resultados nas concentrações $0,5$ e $0,75 \text{ mgL}^{-1}$ para os três clones estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-JUBOORY, K.H.; WILLIAMS, D.J.; SKIRVIN, R.N. Growth regulators influence root and shoot development of micropropagated Algerian Ivy. **HortScience**. v.26. n.8. p. 1079-1080, 1991.

AZMI, A.; NOIN, M.; LANDRE, P.; PROUTEAU, M.; BOUDET, A. M.; CHRIQUI, D. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. hypocotyls: ontogenesis and ploidy level of the regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.51. n.1. p. 9-16., 1997.

BELL, A.D. Constructional organization Part II. **Plant Form**. Oxford University, NY, 1993. P.240-241.

BURGER, D.W. In vitro micropropagation of *Eucalyptus sideroxylon*. **HortScience** v. 22.n.3, p. 496-497, 1987.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (ed). **Técnica e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/Embrapa - CNPH - 1990, p. 51.

CAPELLE, S.C.; MOK, D.W.S.; KIRCHNER, S.C.; MOK, M.C. Effects of thidiazuron on cytokinins autonomy and the metabolism of $N^6-(\Delta^2\text{-Isopentenyl})$. (8- ^{14}C) adenosine in callus tissue of *Phaseolus lunatus* L. **Plant Physiology**, v. 73, n.3., p. 796-802. 1983.

CARVALHO, D. de. Micropropagação de *Eucalyptus grandis* Hell ex. Maiden, através da cultura *in vitro* de segmentos nodais. Lavras, 1988, 79p. Dissertação - Escola Superior de Agricultura de Lavras.

CHAUHAN, J.M.S.; PRABHA, B.; KAPOOR, M.L.; RAWAT, M.S.; BISHT, P. *In vitro* clonal propagation of Eucalyptus hybrid FRI-4 (*E. tereticornis* Sm. x *E. camaldulensis* Dehn.). **Annals of Forestry**, 1996. v.4. n.2. p. 186-191.

CORREIA, D. Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp. *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido. Piracicaba, 1993, 113p. Dissertação - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz”.

- CRESSWELL, R.D.; BOURLAY, M.; FLANCLET, A. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. (ed). **Tissue Culture in Forestry**. Dordrecht, Martinus Niiyhoff, 1985. cap. 6.
- DAS, T.; MITRA, G.C. Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 1990. v. 2, n.2, p. 95-104.
- DAVIES, P.J. The plant hormones: their nature, occurrence and function. In: DAVIES, P.J. (ed). **Plant hormones and their role in plant growth and development**, Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, 1987. P.1-11.
- FIOLA, J.A.; HASSAN, M.A.; SWARTZ, H.J.; BORS, R.H.; McNICOLS, R. Effect of thidiazuron, light fluence rates and a kanamycin *in vitro* shoot organogenesis from excised **Rubus** cotyledons and leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.20, p. 223-228, 1990.
- FOSKET, D.E. Hormones and growth regulators: cytokinins, ethylene, abscisic acid, and other compounds. In: SALISBURG, F.B. & ROSS, C.V.W. (ed). **Plant Physiology** - 4^a edição, Wads Worth Publishing Company, Belmont, California, 1981. P.382-407.

GIACOMETTI. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (ed). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/Embrapa - CNPH – 1990. p. 19-25.

GILL, R; SAXENA, P.K. Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L.: induction by thidiazuron of direct embryo differentiation from cultured leaf discs. **Plant Cell Reports**. v. 12, n.3., p. 154-159, 1993.

GONÇALVES, A.N. Revisão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake *in vitro*. Piracicaba , 1982. 97 p. Tese- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

GRATTAPAGLIA, D; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES A.C. & CALDAS, L.S. (ed). **Técnica e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/Embrapa - CNPH, 1990. p. 99-169.

GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F. Eucalyptus. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. (ed). **Tissue culture in Forestry**..Dordrecht, Martinus Niiyhoff, 1987. v.3, p. 387-388.

- GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F.; JAGANMATHAN, V. Tissue culture of forest trees - clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook, by tissue culture. **Plant Science Letters**, 1981. v.20, p. 195-201.
- HUETTEMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.33., p. 105-119. 1993.
- HUNT, R. Concepts in plant growth analysis. In: ARNOLD, E. **Plant Growth curves the functional approach to plant growth analysis**. 1982. p. 14-46.
- LALOUE, M.; FOX, J.E. Cytokinin oxidase from wheat. **Plant Physiology**. v.90, n.3, p. 899-903, 1989.
- LE ROUX, J.J.; VAN STADEN, J. Micropropagation of *Eucalyptus* species. **HortScience**, 1991, v.26, n.2, p.199-200.
- LIMA, M.M. Efeito do Thidiazuron na multiplicação in vitro de três híbridos de *Eucalyptus* spp.. Dissertação. Piracicaba, 1998. 91 p., dissertação - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

MANTELL, S.H. Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas. In: MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; McKEE, R.A. (ed). AZEVEDO, J.L. de; PERECIN, M.L.R.A; VELLO, A.N. (Tradução). Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. p. 149.

MASCARENHAS, A.F.; KHUSPE, S.S.; NADGAUDA, R.S.; GUPTA, P.K.; KHAN, B.M. Potential of cell culture in plantation forestry programs. In: HANOVER, J.W. & KEATHLEY, D.E. **Genetic manipulation of woody plants**. Michigan State University-USA, 1984. v.44, p. 391.

McGAW, B. A. Cytokinin Biosynthesis and metabolism. In: DAVIES, P.J. **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Kluwer Academic Publishers, New York, 1987. p.76-93.

MINOCHA, S.C. Plant Growth Regulators and morphogenesis in cell and tissue culture of forest tree. In: BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. (ed). **Cell and tissue culture in forestry**, Martinus Niiyhoff publishers, 1982. v.1, p. 51.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; ARMSTRONG, D.J.; SHUDO, K.; ISOGAI, Y. OKAMOTO, T. Cytokinins activity of N-Phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron). **Phytochemistry**, v.21, n.7., p. 1509-1511, 1982.

MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuron- induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledon. **Physiologia Plantarum**. v.97, p. 268-276, 1995.

MURTHY, B.N.S.; MURCH, S.J.; SAXENA, P.K. Thidiazuron : a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.34, n.4, p. 267 – 275, oct –dec. 1996.

NIELSEN, J.M.; BRANDT, K.; HANSEN, J. Long-term effects of thidiazuron are intermediate between benzyladenine, Kinetin or isopentenyladenine in *Miscanthus sinensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.35, p. 173-179, 1993.

NIELSEN, J.O.; HANSEN, J.; BRANDT, K. Synergism of thidiazuron and benzyladenine in axillary shoot formation depends on sequence of application in *Miscanthus x ogigormis* "Giganteus". **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.41., p. 165-170, 1995.

- NIEUWKERK, J.P. van; ZIMMERMAN, R.H.; FORDHAM, I. Thidiazuron stimulation of Apple shoot proliferation in vitro. **HortScience**, v.21, n.3, p. 516-518, 1986.
- PALTA, A.M. Clonal propagation of Eucalyptus by tissue culture. **Plant Science Letters**, 1982.v.26, p. 1-11.
- PINEDO, D.N.H. Micropropagação de *Eucalytus citriodora* e *Eucalyptus tereticornis*. Curitiba, 1989. 63 p. Dissertação - Universidade Federal do Paraná.
- PREECE, J.E.; IMEL, M.R. Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron P. J.M. Hybrids*. **Scientia Horticulturae**. v.48, p. 159-170, 1991.
- PREECE, J.E.; HUETTEMAN, C.A.; ASHBY, W.C.; ROTH, P.L. Micro- and cutting propagation of *Silver maple*. I. Results with adult and juvenile propagules. **Journal American Society of Horticultural Science**. v. 116, n.1. p. 142-148, 1991.
- RAO, K.A.; VENKATESWARA, R. Tissue culture of forest tree: clonal multiplication of *Eucalyptus grandis* L. **Plant Science**, v.40, n.1, p. 51-55, 1985.

RAO, K.S. *In vitro* meristem cloning of *Eucalyptus tereticornis* Smith. **Plant Cell Reports**, 1988. v.7., n.7., p. 546-549.

ROBERTS, J.A; HOOLEY, R **Plant Growth Regulators**. New York, Blackie and Son. 1988. 190 p.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.V.W. Hormones and growth regulators: Auxins and gibberellins. In: SALISBURG, F.B. & ROSS, C.V.W. (ed). **Plant Physiology** - 4^a edição, Wads Worth Publishing Company, Belmont, California, 1991. p. 357 – 381.

SANKHLA, D.; DAVIS, T.D.; SANKHLA, N. Thidiazuron-induced in vitro shoot formation from roots of intact seedlings of *Albizzia julibrissin*. **Plant Growth Regulation**. v. 14. p. 267-272. 1994.

SBS - Sociedade Brasileira de Silvicultura Estatísticas florestais - 1997
(consulta via internet janeiro de 1998),
<http://www.florestal.ipef.br/sbs/estatistica/>

SITA, G.L. ; RANI, B.S. *In vitro* propagation of *Eucalyptus grandis* L. by tissue culture. **Planta Cell Reports**. v.4., n.2., p. 63-65. 1985.

SAXENA, P.K.; MALIK, K.A.; GILL, R. Induction by thidiazuron of somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut. **Planta**. v.187, n.3., p. 421-424. 1992.

SUTTLE, J.C. Involvement of ethylene in the action of the cotton defoliant thidiazuron. **Plant Physiology**, v. 78, n.2., p. 272-276. 1985.

TAIZ, L. ; ZEIGER, E. Cytokinins **Plant Physiology**. California, Benjamin/Cummings Publishing Company, 1991. P 452 – 472.

THOMAS, J.C.; KATTERMAN, F.R. Cytokinin activity induced by thidiazuron. **Plant Physiology**. v. 81, n.2., p. 681-683, 1986.

TIBOK, A.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. **Plant Science Limerick**, v.110, n.1. p.139-145. 1995.

TRINDADE, H.; FERREIRA, J.G.; PAIS,M.S.; ALONI,R. The role of cytokinin and auxin in rapid multiplication of shoots of *Eucalyptus globulus* grown *in vitro* **Australian Forestry**, 1990. v. 53, n. 4, p.221-3.

WARRAG, E.I.; LESNEY, M.S.; RACKWOOD, D.L. Micropropagation of field tested superior *Eucalyptus grandis* híbridos. **New Forests**. v.4, p. 67-79, 1990.

WARRAG, E.; LENEY, M.S.; RACKWOOD, D.L. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. **Plant Cell Reports**, v. 9(10). p. 586-589, 1991.

WIECHETECK, M.S.S. Micropropagação de *Eucalyptus viminalis* Labele, à partir de material juvenil. Curitiba, 1990. 92 p. Dissertação - Universidade Federal do Paraná.

YANG, J.C.; CHUNG, J.D.; CHEN, Z.Z. Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* and comparasion of growth between micropropagated plantlets and rooted cutting. **Plant Cell Reports**. v.15, n.3/4., p. 170-173. 1995.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. . In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. (ed). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, ABCTP/Embrapa - CNPH – 1990. p. 37-70.

YIP, W.K.; YANG, S.F. Effect of thiadiazuron, a cytokinin active urea derivative, in cytokinin - Dependent ethylene production systems. **Plant Physiology**, v.80, n.2., p. 515-519. 1986.

ZHOU, J.; MA, H.; GUO, F.; LUO, X. Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.36, p. 73-79, 1994.