**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Otimização da propagação clonal de *Eucalyptus globulus* Labill

Germana Marcelino Cordeiro

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2013**

Germana Marcelino Cordeiro
Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

Otimização da propagação clonal de *Eucalyptus globulus* Labill

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **MARCÍLIO DE ALMEIDA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Cordeiro, Germana Marcelino

Otimização da propagação clonal de *Eucalyptus globulus* Labill / Germana Marcelino Cordeiro.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

101 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Clonagem 2. Enraizamento adventício 3. Micropropagação 4. Regulador de crescimento I. Título

CDD 634.9734
C794o

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

*Aos meus pais, que me concederam os
maiores bens: a vida e o estudo,*

Ofereço

Dedico

*Ao Rudah, pelo carinho e por estar sempre
pronto a me ajudar em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida, pela orientação, confiança, paciência, sábios conselhos e amizade demonstrada durante a elaboração deste trabalho;

A Dra. Cristina Vieira de Almeida pela colaboração, amizade, conselhos e por todo carinho e apoio;

Ao Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves, pelos ensinamentos e pela disponibilização do espaço físico para realização deste trabalho;

Aos técnicos José Roberto Romanini (LAFISA) e Eveline Calderan Meneghetti (Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas) pelo auxílio nas atividades laboratoriais, pela convivência, paciência, carinho e amizade;

À Maria Solizete Granziol Silva, pela atenção e carinho dedicados durante todos esses anos de pós-graduação.

A Universidade de São Paulo (USP/ESALQ) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela oportunidade concedida, contribuindo desta forma, com o acréscimo em minha formação;

Aos meus queridos amigos, Gabriela F. Leone, Marília Z. Romão, Rafaella Z. Dias, Lívia A. Baccarin, Natalia P. Espósito Polesi, Katherine D. Batagin Piotto, Fernando Piotto, Fabiane A. Artioli Coelho, Erika M. Graner, Priscilla Antonelli, Raquel Ribeiro, Leandro Silva de Oliveira, Francisco J. B. Baccarin e Gilvano E. Brondani, pelos momentos e histórias divertidas, pela troca de conhecimentos e amparo em todos os momentos, pela amizade, carinho e as lembranças que levarei para sempre;

Ao Rudah, não só pelo carinho e compreensão em todos esses anos, mas também por ser essencial em minha vida;

Aos meus pais José Antônio e Aparecida pela educação que me proporcionaram, pelo apoio e incentivo durante todas as etapas da minha vida;

A minha amiga Raquel Massaro, que mesmo longe sempre esteve presente, agradeço pelo carinho e apoio;

As minhas irmãs, Jéssica e Lorena, pelo carinho e compreensão;

À minha família, pelo amor, carinho e alicerce para minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) – Processo 2011/15891-2, pelo auxílio financeiro a este estudo.

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

A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.1 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 O <i>Eucalyptus</i>	21
3.2 Ocorrência natural do <i>Eucalyptus globulus</i>	22
3.2.1 Importância silvicultural do <i>Eucalyptus globulus</i>	23
3.3 Micropropagação de <i>Eucalyptus</i>	25
3.3.1 Meios de cultura.....	29
3.3.2 Reguladores de crescimento vegetal	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Localização da área experimental.....	37
4.2 Material vegetal.....	37
4.3 Estabelecimento e condução do minijardim clonal.....	37
4.4 Micropropagação de <i>Eucalyptus globulus</i>	38
4.4.1 Coleta e preparo dos explantes	40
4.4.2 Estabelecimento <i>in vitro</i>	40
4.4.3 Preparo dos meios de cultura e condições <i>in vitro</i>	41
4.4.4 Multiplicação	41
4.4.5 Alongamento.....	44
4.4.6 Enraizamento <i>in vitro</i>	45
4.4.7 Procedimentos estatísticos	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 Micropropagação de <i>Eucalyptus globulus</i>	47
5.1.1 Estabelecimento <i>in vitro</i>	47
5.1.2 Multiplicação	50
5.1.3 Alongamento.....	71

5.1.4 Enraizamento <i>in vitro</i>	76
6 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS.....	81

RESUMO

Otimização da propagação clonal de *Eucalyptus globulus* Labill

Poucas espécies de *Eucalyptus* apresentam aptidão ao cultivo em regiões de baixas temperaturas e geadas frequentes, limitando seu cultivo em algumas regiões do Brasil. Genótipos de *Eucalyptus globulus* podem representar opções futuras para plantios florestais, tendo em vista o seu ótimo desempenho silvicultural nessas condições. No entanto, informações quanto à obtenção de mudas clonais são escassas, e se focarmos as espécies recomendadas para plantio em condições subtropicais, tal carência é ainda maior, principalmente em termos endógenos e exógenos de enraizamento de propágulos. Esta espécie se destaca também, pelo grande interesse no setor florestal, sobretudo em relação às características de sua madeira para obtenção de celulose, porém, é considerada recalcitrante ao enraizamento de estacas, especialmente quando envolve material adulto, dificultando o aproveitamento dos benefícios da clonagem. Por essa razão, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a técnica de micropropagação de clones de *E. globulus*, visando a reversão à juvenilidade, aumentando os índices de enraizamento e, consequentemente a produção de mudas clonais. Para tanto, os clones (USP 01, USP 24 e USP 33) foram estudados e apresentaram estabelecimento satisfatório, onde avaliou-se: (a) a multiplicação *in vitro*, testando-se três meios de cultura (WPM, JADS e MS) suplementados com concentrações do regulador de crescimento BAP (0; 0,50 e 1,0 mg L⁻¹) combinado com ANA (0; 0,05 e 0,10 mg L⁻¹); (b) o alongamento *in vitro*, testando-se o meio de cultura WPM suplementado com concentrações de BAP (0; 0,05 e 0,10 mg L⁻¹) combinadas com ANA (0; 0,1; 0,2 e 0,3 mg L⁻¹); (c) e o enraizamento *in vitro*, em que brotações alongadas *in vitro* dos clones foram coletadas e transferidas para meio de cultura WPM, suplementado com 0 e 0,05 mg L⁻¹ de BAP combinado com 0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de AIB. Os resultados revelaram comportamentos diferenciados dos clones quanto à multiplicação e alongamento *in vitro*. As taxas de multiplicação *in vitro* dos clones variaram ao longo dos 10 subcultivos, com uma estabilização a partir do 6º subcultivo para todos os clones avaliados, sendo a maior taxa de multiplicação (número médio de 13 gemas) na concentração de 0,7 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA no meio de cultura WPM. O meio de cultura WPM avaliado no alongamento *in vitro*, contribuiu favoravelmente para o alongamento das brotações, assim como ANA na concentração de 0,3 mg L⁻¹ combinando com 0,1 mg L⁻¹ de BAP. Portanto, o protocolo desenvolvido mostrou-se eficiente para micropropagação via proliferação de gemas axilares dos clones avaliados, porém, em relação ao enraizamento constatou-se apenas uma raiz emitida na concentração de 0,5 mg L⁻¹ de AIB no clone 01. De forma geral, em razão dos resultados observados, conclui-se que apesar de mostrar-se viável, a micropropagação não promoveu rejuvenescimento significativo dos clones de *E. globulus*, uma vez que não foi observado enraizamento expressivo das microestacas para as características avaliadas.

Palavras-chave: Clonagem; Enraizamento adventício; Micropropagação; Regulador de crescimento

ABSTRACT

Clonal propagation optimization of *Eucalyptus globulus* Labill

Few *Eucalyptus* species present adaptation for cultivation in regions with low temperatures and frequent frosts, limiting their cultivation in some regions of Brazil. *E. globulus* genotypes may represent future options for forest plantations, in view of its optimal silvicultural performance in these conditions. However, information about obtaining clonal seedlings are scarce, and considering the species recommended for planting in subtropical conditions, this lack of information is even greater, mainly when considering the endogenous and exogenous factors for the rooting. This species is distinguished by great interest in forestry, particularly in relation to characteristics of its wood to obtain cellulose, however, it is considered recalcitrant to rooting, especially when it involves adult material, making it difficult to utilize the cloning benefits. Therefore, this study aimed to evaluate the micropropagation technique of *E. globulus* clones, in order to revert to juvenility, increasing the rate of rooting and consequently the clonal production. For this, the clones (USP 01, USP 24 and USP 33) were studied and showed satisfactory *in vitro* culture establishment, where it was evaluated: (a) the *in vitro* multiplication, testing three culture media (WPM, JADS and MS) supplemented with concentrations plant growth regulator BAP (0; 0,50 and 1,0 mg L⁻¹) combined with NAA (0; 0,05 and 0,10 mg L⁻¹); (b) the *in vitro* elongation, testing the WPM medium culture supplemented with BAP concentrations (0; 0,05 and 0,10 mg L⁻¹) combined with NAA (0; 0,1; 0,2 and 0,3 mg L⁻¹); and (c) *in vitro* rooting, where elongated shoots *in vitro* of the clones were collected and transferred to WPM, supplemented with 0 and 0,05 mg L⁻¹ BAP combined with 0; 0,1, 0,5 and 1,0 mg L⁻¹ IBA. The results showed different behaviors of clones as *in vitro* multiplication and elongation. Rates of clones *in vitro* multiplication varied over the 10 subcultures, with the stabilization from the sixth subculture for all clones, the largest rate multiplication (average number of 13 buds) in the concentration of 0,7 mg L⁻¹ BAP and 0,05 mg L⁻¹ NAA in WPM. The culture media WPM evaluated *in vitro* elongation, contributed positively to the shoots elongation, with 0,3 mg L⁻¹ NAA and 0,1 mg L⁻¹ BAP. Therefore, with the micropropagation protocol using axillary buds proliferation of these clones showed be well developed, however, in relation to rooting, only one root was emitted at 0,5 mg L⁻¹ IBA in clone 01. In general, it is possible concluded that despite viable, the micropropagation did not promote significant rejuvenation of *E. globulus* clones, due to the not expressive rooting for the microcutting evaluated.

Keywords: Cloning; Adventitious rooting; Micropropagation; Growth regulator

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Evolução da área plantada com florestas de *Eucalyptus* spp. no Brasil (2005 – 2011). Fonte: ABRAF (2012)..... 23
- Figura 2 - Representação esquemática da sequência metodológica utilizada para o estabelecimento *in vitro* das microcepas de *E. globulus*..... 39
- Figura 3 - Obtenção de explantes para iniciação da micropropagação de clones de *E. globulus*: (A) brotação recém coletada das minicepas, destacando a porção utilizada para a obtenção dos explantes; (B) segmento nodal após preparo e padronização para introdução *in vitro*. Barra = 1 cm..... 40
- Figura 4 - Aspectos indesejados dos explantes de *E. globulus* aos 30 dias após a introdução *in vitro*; (A) explante contaminado por fungo; (B) explante contaminado por bactéria; (C) explante oxidado. Barra = 1 cm..... 41
- Figura 5 - Porcentagem de: (A) explantes estabelecidos; (B) contaminação fúngica; (C) manifestação bacteriana endofítica e (D) oxidação, de segmentos nodais de *E. globulus* aos 30 dias após a introdução *in vitro* 49
- Figura 6 - Detalhe da emissão de brotações axilares em segmento nodal de *E. globulus* aos 30 dias após a introdução *in vitro* (setas vermelhas). Barra = 1 cm 49
- Figura 7 - Valores médios aos 84 dias de cultivo *in vitro* do número de gemas (NG) por explante do clone 01 em função da combinação de concentrações de BAP e ANA nos três meios de cultura avaliados. A: meio de cultura WPM, B: meio de cultura JADS, C: meio de cultura MS. 51
- Figura 8 - Valores médios aos 84 dias de cultivo *in vitro* do número de gemas (NG) por explante do clone 24 em função da combinação de concentrações de BAP e ANA nos três meios de cultura avaliados. A: meio de cultura WPM, B: meio de cultura JADS, C: meio de cultura MS. 52
- Figura 9 - Valores médios aos 84 dias de cultivo *in vitro* do número de gemas (NG) por explante do clone 33 em função da combinação de concentrações de BAP e ANA nos três meios de cultura avaliados. A: meio de cultura WPM, B: meio de cultura JADS, C: meio de cultura MS. 53
- Figura 10 - Detalhe de indução de gemas axilares em explantes de *E. globulus* aos 84 dias após a inoculação, nas combinações de concentrações de 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA em meio WPM. (A) clone 01; (B) clone 24; (C) clone 33. Barra = 1 cm..... 56
- Figura 11 - Detalhe do alongamento das brotações de *E. globulus* aos 42 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura WPM na presença (A) e ausência (B) de BAP. Barra = 1 cm 72

Figura 12 - Número médio de brotações alongadas por explante de três clones de *E. globulus* aos 63 dias de subcultivo em meio de cultura WPM. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro 74

Figura 13 - Detalhe do alongamento das brotações de *E. globulus* aos 63 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura WPM. (A) clone 01; (B) clone 24; (C) clone 33. Barra = 0,5 cm.... 74

Figura 14 - Número médio das brotações alongadas de três clones *E. globulus* aos 63 dias de subcultivo em meio de cultura WPM em três diferentes tratamentos (T1 = 0,1 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA; T2 = 0,1 mg L⁻¹ de BAP e 0,2 mg L⁻¹ de ANA; T3 = 0,1 mg L⁻¹ de BAP e 0,3 mg L⁻¹ de ANA). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro..... 75

Figura 15 - Secções transversais sucessivas da base caulinar de *E. globulus* evidenciando a rizogênese indireta aos 42 dias em meio de cultura WPM suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de AIB. A. Presença de células calogênicas (CC) sem conexão vascular com a base caulinar. B. Detalhe das células calogênicas isodiamétricas. C. Diferenciação das células calogênicas em centros meristemáticos (CM). D. Detalhe dos centros meristemáticos (setas). E. Corte transversal de raiz adventícia provenientes da organogênese indireta, evidenciando medula (Me) e cilindro vascular (VC). F. Detalhe da raiz adventícia 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constituição química da adubação aplicada no minijardim clonal de <i>Eucalyptus globulus</i>	38
Tabela 2 - Composição básica dos meios nutritivos MS, WPM e JADS utilizados para os experimentos de micopropagação de <i>Eucalyptus globulus</i>	42
Tabela 3 - Diferentes concentrações e combinações dos reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético) acrescidos aos meios de cultura (MS, JADS, WPM), visando à indução de resposta morfogênica em três genótipos de <i>E. globulus</i>	43
Tabela 4 - Diferentes concentrações e combinações dos reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético) acrescidos ao meio de cultura WPM, visando a indução de resposta morfogênica em três genótipos de <i>E. globulus</i>	44
Tabela 5 - Concentrações e combinações dos reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) e AIB (ácido indolbutírico) acrescidos ao meio de cultura WPM, visando a indução de resposta morfogênica em três genótipos de <i>E. globulus</i>	45
Tabela 6 - Resumo da análise de variância do número de gemas emitidas por explante de <i>E. globulus</i> cultivados <i>in vitro</i> em função do clone, meio de cultura e concentrações combinadas de reguladores de crescimento, aos 84 dias de cultivo <i>in vitro</i>	50
Tabela 7 - Resumo da análise de variância para o número de microcepas com manifestação bacteriana endofítica (NBM), de três clones de <i>E. globulus</i> cultivadas em três diferentes meios de cultura no decorrer de 10 subcultivos na fase de multiplicação <i>in vitro</i>	55
Tabela 8 - Número médio de microcepas de três clones de <i>E. globulus</i> em três diferentes meios de cultura, apresentando manifestação bacteriana endofítica no decorrer de 10 subcultivos na fase de multiplicação <i>in vitro</i>	56
Tabela 9 - Número médio de gemas formadas do clone 01 de <i>E. globulus</i> , ao longo de 10 subcultivos em três diferentes meios de cultura (WPM, JADS e MS)	58
Tabela 10 - Número médio de gemas formadas do clone 24 de <i>E. globulus</i> , ao longo de 10 subcultivos em três diferentes meios de cultura (WPM, JADS e MS)	59
Tabela 11 - Número médio de gemas formadas do clone 33 de <i>E. globulus</i> , ao longo de 10 subcultivos em três diferentes meios de cultura (WPM, JADS e MS)	60
Tabela 12 - Resumo da análise de variância para o teor de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) em brotações de minicepas de três clones de <i>E. globulus</i> em três diferentes meios de cultura (MS, JADS e WPM) com 0,7 mg L ⁻¹ de BAP e 0,05 mg L ⁻¹ de ANA na fase de multiplicação <i>in vitro</i>	61

Tabela 13 - Média dos acúmulos de nitrogênio por explante de <i>E. globulus</i> em relação ao meio de cultura e ao clone	62
Tabela 14 - Média dos acúmulos de cálcio por explante de <i>E. globulus</i> em relação ao meio de cultura e ao clone	63
Tabela 15 - Média dos acúmulos de fósforo por explante de <i>E. globulus</i> em relação ao meio de cultura e clone	63
Tabela 16 - Média dos acúmulos de potássio por explante de <i>E. globulus</i> em relação ao meio de cultura e clone	64
Tabela 17 - Média dos acúmulos de magnésio por explante de <i>E. globulus</i> em relação ao meio de cultura e clone	65
Tabela 21 - Média dos acúmulos de cobre por explante de <i>E. globulus</i> em relação ao meio de cultura e ao clone	67
Tabela 22 - Média dos acúmulos de ferro por explante de <i>E. globulus</i> em relação ao meio de cultura e clone	67
Tabela 23 - Média dos acúmulos de manganês por explante de <i>E. globulus</i> em relação ao meio de cultura e ao clone.....	68
Tabela 24 - Média dos acúmulos de zinco por explante de <i>E. globulus</i> em relação ao meio de cultura e clone.....	68
Tabela 25 - Resumo da análise de variância na fase de multiplicação <i>in vitro</i> para os valores médios de peso de matéria seca de microcepas (MS) de três clones de <i>E. globulus</i> em três diferentes meios de cultura no decorrer de 10 subcultivos	69
Tabela 36 - Valores médios de peso de matéria seca na fase de multiplicação <i>in vitro</i> de microcepas de três clones de <i>E. globulus</i> cultivadas em três diferentes meios de cultura no decorrer de 10 subcultivos.....	69
Tabela 28 - Valores médios do número de brotações de três clones de <i>E. globulus</i> , em função das diferentes concentrações combinadas de BAP e ANA no alongamento após 42 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de cultura WPM.....	72
Tabela 29 - Valores médios dos três clones de <i>E. globulus</i> para o número de brotos alongados em função das diferentes concentrações combinadas de BAP e ANA no alongamento após 42 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de cultura WPM	73
Tabela 30 - Resultados da análise de variância do número de brotações alongadas por explante (NBA), comprimento das brotações (CB), número de nós das brotações alongadas (NNBA) de <i>E. globulus</i> , em função dos tratamentos testados em 63 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de cultura WPM	73

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de propagação têm proporcionado inúmeros benefícios ao setor florestal, principalmente pela formação de plantios clonais produtivos, vinculado à melhoria da qualidade da madeira e derivados. Dessa forma, devido ao potencial das espécies de *Eucalyptus* em produzir madeira para diversos fins, esse gênero adquiriu relevância comercial impulsionando o investimento em programas de melhoramento genético para atender o mercado.

Para a formação de uma floresta clonal, com alto padrão de qualidade e produtividade, inúmeras etapas da silvicultura devem ser realizadas de forma criteriosa, desde a seleção da matriz até os processos de clonagem. Tendo em vista que a seleção de clones é, na maioria das vezes, realizada na fase adulta, a propagação encontra limitações, principalmente no que se refere à variação de genótipos entre e dentro das espécies florestais, como por exemplo, a redução gradual da capacidade de enraizamento de estacas, associada ao envelhecimento ontogênico.

No Brasil, as regiões Sul e Sudeste concentram a maior parte dos plantios florestais para finalidades industriais. No entanto, as espécies de eucalipto economicamente importantes e adaptadas às condições climáticas mais frias constituem um grupo muito restrito. Dentre essas espécies se inclui o *Eucalyptus globulus*, o qual se apresenta como uma espécie potencial para essa finalidade, pois além de apresentar um bom desenvolvimento sob condições de baixas temperaturas, produz madeira que permite a fabricação de celulose e papel de elevada qualidade. Contudo, por se tratar de uma espécie tipicamente de clima temperado, o *E. globulus* tem apresentado certa restrição quanto à adaptação às regiões em que ocorrem altas temperaturas, nas quais o seu desenvolvimento não tem sido satisfatório. Diante do exposto, no Brasil o *E. globulus* foi introduzido e possui plantios comerciais como espécie pura apenas no Rio Grande do Sul, por apresentar condições climáticas adequadas ao seu cultivo, favorecendo a produção madeireira.

Todavia, o *E. globulus*, como várias espécies florestais, apresenta recalcitrância ao enraizamento, com índices inferiores aos desejados e que compensem a escala comercial em viveiros florestais. Para tanto, o desenvolvimento da técnica de micro estaquia vem sendo aplicado com frequência, principalmente visando à reversão a juvenilidade para aumentar os índices de enraizamento e, consequentemente a produção de mudas clonais de eucalipto. Essa técnica apresenta-se como uma ferramenta potencial para os programas de melhoramento,

que, na maioria das vezes, objetivam a maximização ou a manutenção do valor genético do clone a ser propagado, permitindo, assim, acelerar os métodos convencionais de propagação.

Dentre as técnicas de micropropagação, a proliferação de gemas axilares tem sido a mais utilizada no desenvolvimento de protocolos de cultivo *in vitro* de *Eucalyptus* para superar as deficiências encontradas quanto ao enraizamento adventício através dos métodos de propagação convencionais. O rejuvenescimento e/ou revigoramento de tecidos adultos pode ser obtido pelos sucessivos subcultivos *in vitro* através da proliferação de gemas axilares, promovendo homogeneização fisiológica dos tecidos, quer em potencial de enraizamento, bem como na qualidade do sistema radicular.

A tecnologia de produção de mudas de espécies florestais está em constante desenvolvimento, sendo que novos avanços podem ser esperados a cada ano. Atualmente, o desafio do setor florestal brasileiro não é apenas o de investimentos na área industrial, mas também, o aumento de produtividade pela seleção de novas variedades, sendo que a biotecnologia, por meio da propagação clonal, está contribuindo significativamente para o desenvolvimento e aprimoramento do setor.

O *E. globulus* apresenta reconhecida importância no melhoramento genético, em razão das características tecnológicas da madeira para a fabricação de celulose. No entanto, a reconhecida recalcitrância ao enraizamento por parte dessa espécie tem justificado as pesquisas no sentido de tornar a sua propagação efetiva em nível comercial.

Diante do exposto, o trabalho visa com o uso da técnica de micropropagação, acelerar os métodos de clonagem de propágulos oriundos de árvores adultas selecionadas de *E. globulus*, por meio do controle nutricional testando três meios de cultura básicos suplementados com concentrações combinadas de auxinas e citocininas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir para o aperfeiçoamento da técnica de micropropagação de *Eucalyptus globulus* Labill, visando a reversão à juvenilidade de genótipo selecionado.

2.1 Objetivos específicos

- (i) Determinar a multiplicação de gemas em função das concentrações de BAP e ANA, clone e meio de cultura;
- (ii) Avaliar o alongamento de brotações em função das concentrações de BAP e ANA de acordo com o clone;
- (iii) Avaliar morfológicamente as microcepas desenvolvidas;
- (iv) Avaliar histologicamente o sistema radicular das microestacas;
- (iii) Avaliar o enraizamento *in vitro* dos clones testados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O *Eucalyptus*

A família Myrtaceae compõe grande parte da vegetação natural australiana e ilhas adjacentes, desempenhando papel fundamental para a formação de diversos padrões ecológicos (KELLY, 1982; MYERSCOUGH, 1998; BRONDANI, 2008). Dentre os mais variados membros, essa família inclui o gênero *Eucalyptus*, o qual apresenta mais de 600 espécies, variedades e híbridos naturais, sendo algumas endêmicas a essa região (PRYOR, 1976; BOLAND et al., 1984; BRONDANI, 2008). Segundo Foelkel et al. (1975), dissemina-se por quase todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, vindo a se destacar em maior escala no Brasil, mais especificamente na região centro-sul.

Em virtude de apresentarem excelentes características silviculturais, adaptativas e rápido crescimento (PALUDZYSZYN FILHO et al., 2006; JAEGER; ZIGER, 2007) as espécies desse gênero foram amplamente plantadas no Brasil (ROCHA; TRUGILHO, 2006; FOELKEL, 2007) nas mais variadas condições de clima e solo (ANDRADE et al., 2003).

O cultivo iniciou-se em 1903, atendendo à Companhia Paulista de Estradas de Ferro e desde a sua introdução até o momento em que passou a ser cultivado em escala comercial, estima-se que o Brasil tenha atingido naquele momento histórico 400.000 hectares em área de eucalipto plantado (PENCHEL et al., 1995; MORA; GARCIA, 2000). O aumento da área de plantio foi devido principalmente à lei dos incentivos fiscais ao reflorestamento, incrementando a área plantada em até 3 milhões de hectares (ANDRADE, 1961; PEREIRA et al., 2000).

Estima-se que 90 países usam este gênero em plantios comerciais, os quais se destinam para diversas finalidades, sendo a principal utilização voltada ao abastecimento de matéria-prima para as indústrias de celulose; papel; utilização da madeira como escoras, móveis, estruturas, caixotaria, postes, dormentes, mourões e lenha na construção civil; além da produção de carvão vegetal, sendo que o Brasil corresponde a 21% das áreas plantadas com *Eucalyptus* do mundo, atrás apenas da Índia, que representa 22%, dos 20 milhões de hectares de eucaliptos plantados no mundo (VITAL et al., 1992; EVANS, 1993; FERREIRA et al., 1997; ANDRADE; GOMES, 2000; ROCHA; TOMASELLI, 2002; MAFIA et al., 2005; ROCHA; TRUGILHO, 2006; FOELKEL, 2007; GODOY, 2007; LIMA et al., 2007; GFC, 2010).

O plantio de mais de 19,5 milhões de hectares de florestas de eucalipto tem uma contribuição importante na redução da utilização de espécies nativas, beneficiando assim, a sua preservação e a dos recursos naturais nelas existentes (ANDRADE et al., 2003; PEDROSA et al., 2005; ROCHA; TRUGILHO, 2006; GFC, 2010). Adicionalmente, o eucalipto pode ser utilizado para produção de óleos na indústria farmacêutica, apicultura e para a formação de quebra-vento (SANTOS et al., 2001). Utiliza-se também a casca e as folhas de muitas espécies para a extração de compostos medicinais, como tanino e óleos essenciais (SCARPINELLA, 2002), destacando o *E. globulus* (BRITO et al., 2006). Recentemente, o setor privado demonstrou interesse pelo uso das florestas de eucalipto para fixação de carbono, visando reduzir a concentração de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera (ALFENAS et al., 2004).

3.2 Ocorrência natural do *Eucalyptus globulus*

A distribuição natural do *E. globulus* está restrita ao sudeste da Austrália, incluindo a ilha da Tasmânia, o sul de Vitória e as ilhas de Bass Strait (VITTI; BRITO, 2003; BARRELA, 2011), e desde 2004 está sendo cultivado em países como Espanha e Portugal, com mais de 1,3 milhões de hectares; Chile e Uruguai, com cerca de 0,5 hectares; e áreas menores em Marrocos, China, Argentina e Austrália, visando a produção de madeira para fins industriais (DEL PONTE et al., 2001; POTTS et al., 2004).

Segundo Braga (1971), o *E. globulus* foi a primeira espécie de eucalipto introduzida no Brasil, em 1855. Até o início deste século, o eucalipto foi plantado com a finalidade de ornamentação ou para servir de quebra-ventos, pelo seu extraordinário desenvolvimento. No entanto, o responsável por incentivar as plantações comerciais foi o silvicultor Edmundo Navarro de Andrade, depois de estudar várias espécies nativas - como péroba, cabreúva, jequitibá, jacarandá paulista, pinheiro-do-paraná e cedro - e outras exóticas, como *E. globulus*, implantado com sementes trazidas de Portugal. Mas foi somente em 1903 que o eucalipto se destacou de tal forma, que grandes plantações foram iniciadas pela antiga Companhia Paulista de Estradas de Ferro, visando à produção de madeira.

Peña e Pérez (1999) citam que o *E. globulus* pertence ao grupo “Southern Blue Gum”, em que refere-se a aparência azulada das folhas juvenis e da localidade onde ocorre mais comumente. Este tipo de árvore cresce bem em clima temperado frio, com precipitações de 500 a 1500 milímetros por ano, em solos de pH 5,0, aproximadamente. A árvore desta

espécie é considerada frondosa e de grande porte; a casca é lisa e branca e vai se descascando e renovando ao longo do tempo. A folha juvenil é ovalada e de coloração prata-azulada. As folhas adultas são brilhantes, têm formato de foice e medem até 25 cm de comprimento. A madeira oferece boa resistência mecânica e é moderadamente durável, sendo usada em construções que exigem grandes esforços (ROSADO, 1996). Uma característica própria das espécies deste grupo é o seu rápido crescimento e sua facilidade para rebrotar, o que as tornam interessantes para uma produção de madeira para celulose em rotações curtas (PEÑA; PÉREZ; 1999).

3.2.1 Importância silvicultural do *Eucalyptus globulus*

O eucalipto é amplamente plantado no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste, as quais formam o maior polo consumidor e exportador de madeira oriunda de plantios florestais (PALUDZYSZYN FILHO et al., 2006; ABRAF, 2012). Segundo dados da ABRAF (2012), em 2011 os plantios de *Eucalyptus* no Brasil totalizaram cerca de 4,8 milhões de hectares, apresentando acréscimo de 2,5% em relação ao ano base de 2010, sendo que a área plantada está em contínuo crescimento desde o ano de 2005 (Figura 1).

Figura 1 – Evolução da área plantada com florestas de *Eucalyptus* spp. no Brasil (2005 – 2011). Fonte: ABRAF (2012)

No entanto, as condições climáticas limitam a expansão nas regiões mais frias e de elevada altitude do Brasil, principalmente devido a ocorrência de temperaturas mais baixas e as geadas frequentes, comprometendo significativamente os plantios. Buscando contornar

esse problema, o *E. globulus* apresenta-se como alternativa para plantios florestais destinados para finalidades industriais nessas regiões, por suportar invernos chuvosos e temperaturas baixas (XAVIER et al., 2007), e também por ser uma espécie de grande interesse na produção de papel e celulose, por possuir características químicas, físicas e anatômicas de excelente qualidade, principalmente alto rendimento em celulose e baixo teor de lignina (CARDOSO, 2002; ROSA, 2003; ALFENAS et al., 2004; XAVIER et al., 2007). Esta espécie florestal é também muito utilizada em função das suas características tecnológicas como a alta densidade básica da madeira, incremento volumétrico, alta capacidade de brotação e como produtora de óleo essencial, encontrado principalmente nas folhas, cujo componente principal é o cineol (ANDRADE; GOMES, 2000; CHAGAS et al., 2002; VITTI; BRITO, 2003). Sua capacidade de produção elevada é o fator mais importante que levou as indústrias de celulose de diversos países a optar por essa espécie. Segundo Schumacher (1995), esta espécie suporta três ou mais conduções de brotação e, em solos de boa fertilidade, pode atingir uma produção anual entre 30 e 40 m³ por hectare.

No Brasil, o *E. globulus* foi introduzido no Rio Grande do Sul devido às condições climáticas favoráveis ao seu cultivo, uma vez que este é de difícil adaptabilidade em climas tropicais (SHIMIZU, 1986; ROSA, 2003). Essa espécie é considerada de difícil enraizamento de estacas. No entanto, a variabilidade genética intraespecífica para crescimento, resistência a doenças e qualidade da madeira são exploradas com mais aplicabilidade industrial, mediante a clonagem de matrizes superiores (ALFENAS et al., 2004). De acordo com Sasse (1995), os índices de enraizamento de estacas de *E. globulus* Labill variam de 5 a 90%, com média de 47% de enraizamento, em virtude da variabilidade genética dos diferentes clones, os quais apresentam diferentes aptidões ao enraizamento, e com apenas 1 a 2 % das árvores-elite selecionadas apresentando enraizamento médio igual ou superior a 60 % (ALFENAS et al., 2004; BORGES et al., 2011b).

A carência de estudos com espécies recalcitrantes ao enraizamento de estacas, como o *E. globulus* (ALFENAS et al., 2004), e também sobre o processo de enraizamento dos atuais híbridos dessa espécie, tem incentivado o desenvolvimento de técnicas alternativas de propagação, como a micropropagação. Essa técnica constitui uma ferramenta de grande utilidade para a produção de mudas comerciais ou matrizes doadoras de estacas ou miniestacas, visto ser uma alternativa recomendável quando existem alto grau de maturação do material genético (DEL PONTE et al., 2001; GOMES; CANHOTO, 2003).

3.3 Micropropagação de *Eucalyptus*

Dentre as técnicas de propagação, a micropropagação ou cultura de tecidos tem sido bastante utilizada com aplicação no setor florestal, sendo uma ferramenta de grande utilidade para a produção de mudas comerciais ou matrizes doadoras de estacas ou miniestacas (HIGASHI et al., 2000; DEL PONTE et al., 2001). Esta técnica envolve a produção de plantas a partir de órgãos, tecidos ou células, os quais são cultivados *in vitro*, sob condições assépticas, em meio nutritivo adequado e com rigoroso controle das condições ambientais e nutricionais (GEORGE, 1993; MERKLE; NAIRN, 2005; THORPE, 2007).

A micropropagação possibilita a obtenção de grande número de plantas a partir de poucas matrizes, em curto espaço de tempo e em área reduzida (HARTMANN et al., 2002), sendo a técnica de cultura de tecidos de maior destaque e com aplicações comprovadas no setor florestal (XAVIER et al., 2007), especialmente pelo fato de permitir menores variações genéticas em relação ao explante original (NEHRA et al., 2005). Sua aplicabilidade está relacionada à possibilidade de propagar genótipos desejáveis sem a perda da árvore matriz, obtendo-se alta taxa de multiplicação com o uso da reversão a juvenilidade, reduzindo-se o tempo para obtenção de genótipos e estabelecendo-se alternativas a estratégia de melhoramento genético (GONÇALVES, 1982).

O *Eucalyptus* é o gênero florestal que mais possui estudos relacionados a micropropagação (DUTRA et al., 2009). Essa técnica encontra-se ligada a programas de melhoramento que objetivam a maximização ou manutenção do valor genético, permitindo acelerar os métodos de clonagem de propágulos oriundos de árvores adultas selecionadas (DEL PONTE et al., 2001; JOSHI et al., 2003; WATT et al., 2003; BUNN et al., 2005; THORPE, 2007). Já que, em algumas espécies vegetais, especialmente as lenhosas, existe um gradiente de juvenilidade em direção à base da árvore, que é variável entre espécies (ZOBEL; TALBERT, 1984; ELDRIDGE et al., 1994). Segundo estes autores, isto traduz o aumento da maturação em função da maior proximidade com o meristema apical. De acordo com Hartmann et al. (2002), a maior juvenilidade da região basal deve-se ao fato de que os meristemas basais das plantas formaram-se em épocas mais próximas à germinação da semente que os das regiões terminais.

Um dos objetivos da micropropagação é clonar espécies ou híbridos que apresentem características especiais como: elevadas taxas de crescimento, tolerância a baixas temperaturas e salinidade, resistência a pragas e doenças e, principalmente, para induzir o rejuvenescimento de clones com dificuldades de enraizamento (BENNETT et al., 1994;

KLERK, 2002; GOMES; CANHOTO, 2003; NOURISSIER; MONTEUUIS, 2008; DUTRA et al., 2009). Em *Eucalyptus* esta técnica tem sido usada em três situações: quando a espécie apresenta dificuldades de propagação pela macropropagação (estaquia, por exemplo); quando a árvore selecionada não permite o uso satisfatório de outras técnicas de propagação em seu resgate e multiplicação; e quando se deseja aumentar a taxa de propagação, abreviando o tempo para seu uso comercial (CHAPERON, 1987).

As principais vantagens do emprego dessa técnica relacionam-se a possibilidade de propagação maciça de clones em curto espaço de tempo; maior controle nutricional, ambiental e fitopatológico; maiores índices de enraizamento; melhor qualidade do sistema radicular; redução das atividades operacionais; redução dos investimentos, principalmente em casa de vegetação, em razão do menor tempo de permanência para enraizamento; transporte do material clonal por grandes distâncias sem danos; armazenamento por longos períodos e retenção do vigor híbrido (GEORGE, 1993; COMÉRIO et al., 1996; XAVIER; COMÉRIO, 1996; ASSIS, 1997; BISHT et al., 1999). Além disso, os problemas de enraizamento de estacas, principalmente observados em árvores adultas devido a alta produção de inibidores ao enraizamento, metabólitos secundários e fenóis, podem ser minimizados ou até solucionados pelo emprego da micropropagação (JOSHI et al., 2003). Através de sucessivos subcultivos também é possível reverter a juvenilidade do tecido vegetal (XAVIER; COMÉRIO, 1996), o que melhora de maneira significativa os índices de enraizamento (DUTRA et al., 2009). Outras aplicações que também merecem destaque, refere-se a conservação de germoplasma *in vitro*, obtenção de sementes sintéticas, limpeza clonal e possibilidade de patenteamento (XAVIER et al., 2007).

Entretanto, uma das grandes limitações da micropropagação é o alto investimento em instalações e manutenção de um laboratório, resultando em aumento do custo de produção das mudas e também, a necessidade de desenvolvimento de protocolos específicos para diferentes espécies ou grupos de clones, bem como a recalcitrância de espécies lenhosas à propagação *in vitro* e os riscos de contaminação acidental das culturas por microrganismos, não sendo viável sob o ponto de vista econômico para o uso em larga escala (XAVIER et al. 2007; DUTRA et al., 2009). No entanto, plantas com alto valor agregado e com grande demanda pelo mercado, como é o caso do eucalipto, a técnica tem sido altamente compensatória. Por essa razão estudos mais aprofundados às necessidades específicas para micropropagação de eucalipto são extremamente importantes.

De maneira geral, Grattapaglia e Machado (1998) dividem a micropropagação em fases, sendo designada Fase 0, a fase de condicionamento das matrizes, avaliações de seus

aspectos fisiológicos, e suas condições de sanidade. As matrizes com aspecto vigoroso, sadias e isentas de qualquer tipo de estresse e em pleno crescimento são aquelas que fornecem os melhores explantes, pois a nutrição das plantas é um fator chave para o sucesso do estabelecimento do cultivo *in vitro*, comentam os autores. Na chamada Fase I inicia-se o estabelecimento *in vitro*, onde neste estágio é selecionado o explante, fonte de propagação, que deve ser totalmente livre de contaminação. As próximas fases devem ser realizadas em condições de assepsia e em câmaras de fluxo laminar. A Fase II é considerada a fase de multiplicação dos explantes. Nela, ressaltam os autores, o objetivo é a produção do maior número de propágulos possível, em menor espaço de tempo, e máxima uniformidade das partes aéreas produzidas. Na fase III é realizado o alongamento das brotações obtidas por multiplicação, onde as microestacas são preparadas para a indução ao enraizamento, completando assim a Fase IV, ou última etapa, e está relacionada a indução do enraizamento das brotações. O enraizamento pode também ser feito em condições *ex vitro*, onde as microcepas são enraizadas em substratos diretamente em condições de alta umidade (casa de vegetação).

Um dos fatores mais críticos da técnica *in vitro* é a fase de introdução e estabelecimento dos explantes em razão dos altos níveis de contaminação dos tecidos, inclusive por bactérias endógenas, as quais são difíceis de serem eliminadas (NIEDZ; BAUSHER, 2002; WATT et al., 2003).

Inúmeros procedimentos e produtos são utilizados para a desinfestação *in vitro* de explantes de *Eucalyptus* spp., sendo que os mais utilizados são o etanol (70%) e o hipoclorito de sódio em diversas concentrações (BRONDANI et al., 2009; DUTRA et al., 2009), de maneira que as concentrações e os produtos podem variar conforme o tipo de explante a ser utilizado, bem como, em função da origem (XAVIER et al., 2007). De acordo com George (1993), a concentração e o tempo de exposição aos desinfetantes dependem do material vegetal e diferentes partes da planta, apresentando respostas variadas quanto a sensibilidade dos tecidos.

Outro problema que ocorre durante a fase de introdução é a oxidação dos explantes. Segundo George et al. (2008), isso se deve ao fato que algumas plantas, particularmente espécies tropicais, conterem altas concentrações de substâncias fenólicas que são oxidadas quando as células são injuriadas ou senescentes, o tecido isolado torna-se marrom ou preto e não cresce. A oxidação leva ao aumento na formação de radicais livres que segundo Benson (2000), são responsáveis por danos irreparáveis ao DNA, proteínas e enzimas, causando disfunção celular e levando a morte do explante. Entretanto, alguns tratamentos são

recomendados para a remoção das substâncias fenólicas, como por exemplo, a incubação inicial no escuro, a transferência frequente dos explantes pela renovação do meio de cultura e a utilização de substâncias antioxidantes como o ácido ascórbico e o PVP (polivinilpirrolidona) são medidas que reduzem a oxidação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Visto que, o efeito do antioxidante consiste na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metabólicos ou na redução dos peróxidos para produtos incapazes de formar radicais livres com potencial de se oxidar (ARAÚJO, 1985).

Em termos de controle morfogênico, em condições *in vitro*, tem-se utilizado preferencialmente na fase de multiplicação de gemas, os reguladores de crescimento vegetais pertencentes ao grupo das auxinas e citocininas, as quais são indispensáveis para a quebra de dominância apical e indução e proliferação de gemas axilares, considerando que o tipo e concentrações de citocinina caracterizam os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro* (BRONDANI et al., 2009). Nesta fase, normalmente, a concentração da auxina é sempre menor do que a da citocinina, para não promover a formação de calo na base do explante. ANA e AIB normalmente são utilizados em concentrações abaixo de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e o AIA, em virtude de sua baixa estabilidade, em concentrações maiores (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PONTE, 1999). Para finalidades de micropropagação clonal, a formação de calos é indesejável uma vez que a constituição cromossômica deste material é, em geral, instável, podendo originar variantes genéticas, por meio do processo denominado variação somaclonal (LARKIN; SCOWCROFT, 1981). Neste caso, o período de crescimento desorganizado deve ser o menor possível, ou preferencialmente eliminado (MURASHIGE, 1974; STREET, 1977).

Na fase de alongamento *in vitro* tem sido obtido sucesso para *Eucalyptus* utilizando diversas combinações e proporções de reguladores de crescimento, bem como diferentes formulações de meios de cultura. Além disso, outras metodologias como o uso de carvão ativado no meio de multiplicação, ou a permanência das culturas no escuro por alguns dias, pode contribuir para alongar brotações de *Eucalyptus* (CALDERÓN-BALTIERRA, 1994; SHARMA; RAMAMURTHY, 2000; GLOCKE et al., 2006).

Quanto ao meio nutritivo para o cultivo *in vitro* dos explantes, o mesmo deve proporcionar condições adequadas ao crescimento e desenvolvimento. Os meios de cultura se baseiam nas exigências nutricionais das plantas, sendo adequados às necessidades de cada espécie e etapas *in vitro* (SANTOS-SEREJO et al., 2006; FICK, 2007). Meios de cultura não adequados podem causar sintomas de deficiência mineral e até a morte dos propágulos (MONTEIRO et al., 2000). Deste modo, os componentes do meio de cultura de natureza

definida são: sais minerais (macro e micronutrientes), vitaminas (biotina, ácido fólico, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, tiamina e inositol), reguladores de crescimento (AIA; AIB; ANA, BAP; GA3; 2,4-D e TDZ), aminoácidos (asparagina, glicina e ácido glutâmico), ácidos orgânicos (ácido citérico, ácido tartárico) e açúcares (sacarose e glicose) (CALDAS et al., 1998). Conforme a literatura existe uma grande variedade de meios de cultura adaptados para diversas espécies, diferindo, sobretudo na constituição e concentração de nutrientes (MANTOVANI; FRANCO, 1998). Dentre os meios de cultura mais utilizados para a micropropagação de *Eucalyptus*, destacam-se o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), JADS (CORREIA et al., 1995) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980).

3.3.1 Meios de cultura

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controla, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (TORRES et al., 1998). As mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas, que funcionam nas plantas, são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células (CALDAS et al., 1998). Geralmente, os meios consistem em uma mistura balanceada de sais minerais (macronutrientes e micronutrientes), carboidratos, fontes orgânicas de nitrogênio, vitaminas e reguladores de crescimento (GAMBORG; SHYLUK, 1981).

Um dos primeiros meios de cultura desenvolvidos foi o de White (1942), o qual apresenta baixo nível de nitrogênio e de potássio, restringindo o seu uso para muitas células (GUERRA; NODARI, 2006). O meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) foi uma das primeiras formulações melhoradas e usadas frequentemente em cultura de tecidos de plantas, apresentando concentrações relativamente altas de macronutrientes e micronutrientes quando comparada a outras formulações salinas (GEORGE, 1993). Segundo Leifert et al. (1991), o meio MS e suas adaptações representam, comercialmente, cerca de 50% da utilização na micropropagação.

Para plantas lenhosas em geral, foi elaborado o meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), que apresenta uma proporção e composição salina inferior ao MS e maior disponibilidade da vitamina Tiamina – HCl em concentrações superiores à do meio MS, a qual apresenta resultados benéficos para a multiplicação (MANTOVANI; FRANCO, 1998; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O meio de cultura JADS é específico para o cultivo *in vitro* de *Eucalyptus* spp. (CORREIA et al., 1995). A definição deste meio de cultura baseou-se em informações bibliográficas de teores de nutrientes minerais de *Eucalyptus grandis* Hill, os quais foram obtidos em diferentes estudos conduzidos com material juvenil (CORREIA, 2006). As exigências nutricionais consideradas ideais variam amplamente entre os genótipos das plantas e sistemas de cultivo (KANASHIRO, 2005). No entanto, os meios de cultura utilizados na propagação *in vitro* são em grande parte baseados em modificações empíricas de formulações básicas (RAMAGE; WILLIAMS, 2002; KANASHIRO, 2005; CORREIA, 2006; KANASHIRO et al., 2007).

Basicamente, o meio de cultura não fornece apenas macro e micronutrientes, também pode ser fonte de carboidratos, geralmente representados pela sacarose, a qual sua concentração pode variar de acordo com as fases de multiplicação, alongamento e enraizamento, mas em geral são mantidas entre 20 e 30 g.L⁻¹ (McCOWN, 1988; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Adicionalmente, visando o maior crescimento, incluem-se compostos orgânicos, como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento. Porém as concentrações desses compostos irão depender das respostas dos diversos materiais genéticos e condições ambientais (BRONDANI et al., 2010).

Os meios de cultura podem ser utilizados nas formas semi-sólida ou líquida. Nos meios semi-sólidos, a substância utilizada na micropropagação é o ágar, um polissacarídeo extraído de algas marinhas que dá consistência ao meio servindo de suporte às culturas. O pH do meio induz mudanças na permeabilidade das membranas o que influencia a absorção de certos compostos. Valores de pH mais baixos dificultam a utilização do amônio, enquanto que valores mais altos diminuem a utilização do nitrato, o que influencia também na solidificação do ágar no meio (MARTIN; ROSE, 1976; AMARAL, 2006).

Portanto, a resposta ao tipo e composição do meio de cultura varia não somente de acordo com a espécie, mas entre genótipos de uma mesma espécie e até entre explantes de um mesmo genótipo, que apresentam demandas específicas (SOUZA et al., 2006). Correia et al. (1995) verificaram a importância da especificidade do meio de cultura para cada material genético, quando se deseja a proliferação de gemas com uniformidade e vigor. Além disso, fatores ambientais como a qualidade e intensidade da luz e o fotoperíodo podem influenciar no crescimento e desenvolvimento dos explantes, assim como a idade ontogenética e o estado de maturação da cultura (OLIVEIRA et al., 2011). Dessa maneira, fica clara a necessidade de ajuste do protocolo de micropropagação, de acordo com o material genético de interesse.

3.3.2 Reguladores de crescimento vegetal

Os vegetais produzem moléculas sinalizadoras, os hormônios, substâncias orgânicas com influência na morfologia e fisiologia da planta, que atuam em baixas concentrações (10^{-4} M a 10^{-3} M) (DAVIES, 1995). Estes compostos promovem, inibem ou modificam processos metabólicos dos vegetais. Para Castro e Vieira (2001), reguladores de crescimento vegetais são substâncias sintetizadas que aplicadas exogenamente possuem ações similares aos grupos de hormônios vegetais conhecidos.

O objetivo principal dos reguladores de crescimento é suprir possíveis deficiências nos teores endógenos de hormônio nos explantes isolados, e estimular certas respostas como a multiplicação da parte aérea ou a formação de raízes adventícias (GRATTAPAGLIA; MACHADO; 1998).

Os reguladores de crescimento influenciam processos de desenvolvimento através da sua interação com receptores dentro da célula vegetal, e atuam em muitos processos fisiológicos pela ativação ou repressão de certos grupos de genes, influenciando a taxa e a direção da expansão, bem como, a taxa de divisão celular. Estes efeitos na célula são regulados através de vias de respostas bioquímicas complexas, frequentemente envolvendo mensageiros secundários (DAVIES, 1995).

A complexidade do envolvimento dos reguladores de crescimento em processos diferenciados ao longo do crescimento e desenvolvimento vegetal é refletida através da contribuição de síntese dos reguladores, transporte e vias de sinalização, bem como pela diversidade de interações entre os reguladores para controlar as respostas de crescimento (SANTNER; ESTELLE, 2009).

A ação dos reguladores de crescimento pode ocorrer diretamente, provocando mudanças físicas nas estruturas celulares ao interagir com elas ou, indiretamente, interferindo com o caminho metabólico que conduz a um determinado tipo de estrutura (HERTWIG, 1977). Ainda segundo Hertwig (1977), a célula vegetal é envolvida por uma parede celular que pode vir a sofrer alterações por ação dos reguladores que interfiram nos fenômenos de expansão celular. Os reguladores vegetais podem atuar diretamente nas diferentes estruturas celulares e nelas provocar alterações físicas, químicas e metabólicas, assim os hormônios agem primeiro na membrana plasmática, na qual se encontram as proteínas (SALISBURY; ROSS, 1994).

A percepção do sinal refere-se a ligação do regulador de crescimento a um receptor específico, o qual, normalmente, é uma proteína, localizada na membrana celular ou

citoplasma, que se liga com mensageiros químicos de forma específica e reversível. Uma mudança conformacional do receptor poderá ocorrer após a ligação do regulador de crescimento, alterando-o para o estágio ativado, que desencadeará uma série de eventos bioquímicos e moleculares, caracterizando o evento de transdução do sinal, o qual culminará numa resposta característica. Apesar de décadas de estudo, apenas recentemente foram identificados os receptores para muitos dos reguladores de crescimento existentes, revelando novos mecanismos de percepção de sinais químicos e fornecendo uma ideia mais clara do controle hormonal sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal (SPARTZ; GRAY, 2008).

Até pouco tempo acreditava-se que o desenvolvimento vegetal era regulado por cinco tipos de hormônios (auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico). Entretanto, atualmente há fortes evidências indicando a existência de hormônios vegetais esteróides, os brassinoesteróides, que possuem uma ampla gama de efeitos morfológicos no desenvolvimento vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2009).

No entanto, os mais utilizados na cultura de tecidos e que desempenham importante papel na regeneração de plantas em várias espécies vegetais estão as auxinas, as quais controlam o alongamento celular e a rizogênese, entre outros processos (HINOJOSA, 2000); as citocininas, que são promotoras da divisão celular e da emissão de gemas adventícias (BARRUETO CID, 2000); e as giberelinas, as quais são utilizadas para promover o alongamento das brotações (GEORGE et al., 2008; HARTMANN et al., 2011).

Considerando os reguladores de crescimento mais utilizados na micropropagação de *Eucalyptus*, o BAP (benzilaminopurina) e o ANA (ácido nafalenoacético) merecem amplo destaque, onde são suplementados ao meio de cultura nas mais variadas relações (DEL PONTE et al., 2001; BRONDANI et al., 2009; DUTRA et al., 2009). A disponibilidade e a interação desses dois reguladores de crescimento podem modular a formação de raiz e parte aérea, além de proporcionar maior controle morfogênico (SKOOG; MILLER, 1957; GEORGE, 1993; TAIZ; ZEIGER, 2009).

As auxinas são sintetizadas, principalmente, em tecidos meristemáticos de órgãos aéreos dos vegetais e são responsáveis pelo alongamento celular, fototropismo, geotropismo, dominância apical, diferenciação dos tecidos vasculares, extensibilidade da parede celular, embriogênese, síntese de etileno, desenvolvimento das gemas florais e dos frutos, partenocarpia, abscisão, bem como, indução dos processos rizogênicos com a formação de raízes laterais e adventícias (LUDWIG-MÜLLER, 2000; MÜLLER; WEILER, 2000; COOKE et al., 2002; VIEIRA; MONTEIRO, 2002; HARTMANN et al., 2002;

WOODWARD; BARTEL, 2005; ALABADÍ; BLÁZQUEZ, 2009; POLLMANN et al., 2009; RUBIO et al., 2009; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Uma das mais rápidas respostas hormonais observadas em plantas é a indução do crescimento provocada por auxinas, uma vez que a auxina induz à extrusão de prótons que acidifica e afrouxa a parede celular, e através da entrada da água há um aumento da extensão da célula (SANTOS; DOMINGUES, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2009). O uso das auxinas na cultura de tecidos de plantas tem sido constatado objetivando, principalmente, o enraizamento de plantas micropropagadas, visto que o controle do enraizamento adventício em propágulos ocorre, em especial, devido aos teores endógenos de auxinas (LI et al., 2009). Segundo Bandel (1979), o efeito das auxinas sobre o enraizamento não é devido meramente à sua ação sobre a expansão celular, mas ao estímulo que exerce sobre a divisão das células, fazendo com que grupos delas se desdiferenciem e se determinem para desencadear o processo rizogênico.

Existem diversas auxinas conhecidas, apenas duas naturais, o ácido indolacético (AIA), bastante utilizado na cultura de tecidos, e o indolacetonitrilo, pouco utilizado. As sintéticas são mais comuns, dentre elas temos o ácido indolbutírico (AIB), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido nafataleno acético (ANA) os mais aplicados em cultivos *in vitro* (VIEIRA; MONTEIRO, 2002; ALMEIDA NETO; TAVARES, 2002).

As citocininas constituem uma classe de hormônios vegetais que estão envolvidas no desenvolvimento de numerosos processos de divisão e expansão celular, sendo crucial o papel desempenhado no desenvolvimento de diversos órgãos (GUPTA; RASHOTTE, 2012). Estão presentes, sobretudo em regiões meristemáticas e órgãos em crescimento como nas folhas jovens, sementes, frutos e principalmente no meristema apical da raiz, sítio de biossíntese desta substância (HU; WANG, 1983; VIEIRA; MONTEIRO, 2002).

Tanto a citocinina, como a interação desta com outras vias de sinalização, regulam o crescimento de órgãos essenciais à planta, incluindo raiz, caule, folha e flor (GUPTA; RASHOTTE, 2012). Além disso, as citocininas apresentam influência direta na senescência foliar, na mobilização de nutrientes, na dominância apical, formação e atividade dos meristemas apicais, germinação de sementes e quebra de dormência das gemas; também induzem a divisão, diferenciação e alongamento celular na presença de auxina (CASTRO et al., 2005) e, em células vegetais diferenciadas como as do córtex e/ou floema, promovem o retorno da divisão para formarem meristemas secundários, como câmbio vascular e o felogênio (TAIZ; ZAIGER, 2009). Na cultura de tecidos de plantas, as citocininas são geralmente utilizadas em conjunto com as auxinas, visando a formação de gemas e raízes.

Como principal estimulante da divisão celular, a citocinina promove um grande número de brotações por meio do crescimento de meristemas laterais, aumentando a taxa de multiplicação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Os efeitos das citocininas nos vegetais são bastante variáveis, em virtude à sua grande quantidade de metabólicos presentes em diversos tipos de tecidos, variando inclusive entre as diferentes espécies da natureza (BRITO; CASTRO, 2002). A primeira citocinina isolada foi a cinetina (6-furfurilaminopurina), com grande capacidade promotora de divisão celular ou citocinese. A zeatina (6-(4-hidroxi-3-trans-metil-2-amino-butenil) purina) foi a primeira citocinina natural identificada presente em sementes verdes de milho. As citocininas sintéticas são as mais conhecidas, como o BAP (6-benzilamino purina), 2iP (6-dimetilamino purina) e PBA (6-(benzilamino)-9-(2-tetrahidronipiranil)- 9H-purina), todas elas ligadas a promoção do crescimento, divisão, alongamento e diferenciação celular (VIEIRA; MONTEIRO, 2002).

De acordo com Grattapaglia e Machado (1990), o BAP (6-benzilaminopurina) parece ser a citocinina por excelência para multiplicação de partes aéreas e gemas adventícias em diversas espécies, seguidos pela cinetina (KIN) e 2iP (2-isopenteniladenina). Todavia, para Handro e Floh (1990), em geral, as respostas às diferentes citocininas são muito semelhantes na maioria dos casos, optando-se por citocininas de baixo custo, como o BAP e KIN (cinetina).

As citocininas constituem o grupo de reguladores vegetais imprescindíveis à quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares, cujos tipos e concentrações são os que mais influenciam na multiplicação *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990), embora elevadas concentrações possam ser tóxicas (LANE; 1979; LESHEM et al., 1988; LIMA; GONÇALVES, 1998; DZAZIO et al., 2002; ALFENAS et al., 2004), como o BAP, que em concentrações elevadas, promove sintomas de hiperidricidade (PICOLI et al., 2001; DZAZIO et al., 2002; FERNADEZ-GARCIA et al., 2011); proporciona elevada taxa de multiplicação de brotos, porém, com tamanhos reduzidos (VILLA et al., 2005), além de promover nestas últimas, tamanhos e formas atípicos, como a formação de roseta (falta de alongamento) (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PONTE, 1999).

Na micropropagação das espécies de *Eucalyptus*, as concentrações desses reguladores variam entre 0,006 μM ($\cong$ 0,001 mg L^{-1}) a 8,8 μM ($\cong$ 1,98 mg L^{-1}) de benzilaminopurina (BAP) para induzir a proliferação de gemas. No entanto, outras citocininas, como cinetina (0,23 μM a 2,5 μM), o tidiazuron (TDZ) (0,045 μM a 0,05 μM) e o 2iP (2,5 μM) também tem sido utilizadas (DUTRA et al., 2009).

As combinações das citocininas tem sido feita com as auxinas ácido naftalenoacético (ANA) ($0,01 \mu\text{M}$ ($\cong 0,001 \text{ mg L}^{-1}$) a $5,3 \mu\text{M}$ ($\cong 0,98 \text{ mg L}^{-1}$), ácido indolbutírico (AIB) ($0,05 \mu\text{M}$ ($\cong 0,01 \text{ mg L}^{-1}$) e 2,4-D ($0,2 \mu\text{M}$) (DUTRA et al., 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Infraestrutura

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, no Departamento de Ciências Biológicas, e Laboratório de Fisiologia das Árvores e Viveiro Florestal pertencentes ao Departamento de Recursos Florestais, ambos na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)/USP, Piracicaba – SP.

4.2 Material vegetal

O trabalho foi conduzido a partir de brotações obtidas em minijardim clonal de três clones de *Eucalyptus globulus* (USP 01; USP 24 e USP 33). As estacas de procedência de cepas cultivadas em sistema de minijardim no viveiro do Departamento de Ciências Florestais na ESALQ foram obtidas a partir de sementes australianas de acordo com os dados descritos por Gabriel (2009).

4.3 Estabelecimento e condução do minijardim clonal

O minijardim clonal foi instalado a partir de mudas de genótipo selecionado de *E. globulus* da Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga – SP, fornecido pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), as quais foram propagadas pelo processo de miniestaquia.

As minicepas foram irrigadas manualmente todos os dias no período da manhã e no final do dia e a cada dois meses foram realizadas podas das brotações. Uma vez por semana, as plantas foram adubadas com 250 mL de fertilizante líquido, com composição química apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Constituição química da adubação aplicada no minijardim clonal de *Eucalyptus globulus*

Macronutrientes	Quantidade (mg.L⁻¹)	Micronutrientes	Quantidade (mg.L⁻¹)
N-NO₃⁻	60	Fe	2
N-NH₄⁺	30	Cu	0,1
P	12	Mn	1,6
Ca	40	Mo	0,02
K	80	B	1
Mg	12	Zn	1
S	10		

4.4 Micropropagação de *Eucalyptus globulus*

A Figura 2 representa um esquema resumido do procedimento metodológico utilizado no presente trabalho.

Figura 2 - Representação esquemática da sequência metodológica utilizada para o estabelecimento *in vitro* das microcepas de *E. globulus*

4.4.1 Coleta e preparo dos explantes

As minicepas dos clones de *E. globulus* propagadas por estaquia foram pulverizadas com fungicida CERCONIL 500 WP® a 0,2 g L⁻¹ (p/v) 7 e 14 dias antes da coleta das brotações (Fig. 3A). As brotações utilizadas foram provenientes da segunda coleta, as quais foram mantidas úmidas até a retirada das folhas. No laboratório, realizou-se o preparo dos explantes (segmento nodal) com a remoção das folhas (Fig. 3B) e lavagem superficial com água desionizada.

Figura 3 - Obtenção de explantes para iniciação da micropropagação de clones de *E. globulus*: (A) brotação recém coletada das minicepas, destacando a porção utilizada para a obtenção dos explantes; (B) segmento nodal após preparo e padronização para introdução *in vitro*. Barra = 1 cm

4.4.2 Estabelecimento *in vitro*

Segmentos nodais da porção mediana da brotação, contendo um par de gemas axilares, com as folhas removidas e tamanho médio de 1,5 cm (Fig. 3 B) foram lavados em água corrente durante 10 minutos. Posteriormente, os segmentos nodais foram imersos em solução hidroalcoólica 70% (água:álcool, v/v) por 10 segundos, enxaguados com água desionizada e autoclavada e, submetidos em solução de fungicida CERCONIL 500 WP® a 0,2 g L⁻¹ (p/v) acrescida de duas gotas de Tween 20 (0,05% v/v) durante 10 minutos. Os explantes foram enxaguados novamente com água desionizada e desinfestados em solução de cloro ativo (NaOCl) 1,0% (v/v) acrescida de duas gotas de Tween 20 (0,05% v/v) durante 5 minutos. Ao final do tratamento, foram enxaguados três vezes com água desionizada e autoclavada e inoculados no meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), isento de reguladores de crescimento, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 5 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,8.

Aos 30 dias após a inoculação foram considerados estabelecidos os explantes que não apresentaram contaminação fúngica, bacteriana e/ou oxidação do explante (Fig. 4).

Figura 4 - Aspectos indesejados dos explantes de *E. globulus* aos 30 dias após a introdução *in vitro*; (A) explante contaminado por fungo; (B) explante contaminado por bactéria; (C) explante oxidado. Barra = 1 cm

4.4.3 Preparo dos meios de cultura e condições *in vitro*

Os meios de cultura foram preparados com água desionizada, adicionando-se 4,5 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose e 800 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP - Synth Ltda). O valor do pH foi ajustando para 5,8 com HCl (0,1M) e NaOH (0,1M) anterior a adição do ágar ao meio nutritivo, e então autoclavados a temperatura de 121 °C ($\approx 1,0 \text{ kgf cm}^{-2}$) durante 20 minutos. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 23°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 16 horas luz e radiação fotossinteticamente ativa de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

4.4.4 Multiplicação

Brotações provenientes da fase de estabelecimento contendo um nó com duas gemas axilares foram inoculadas em tubos de ensaio de 10 cm x 2 cm, contendo 10 mL dos meios de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981) e JADS (CORREIA et al., 1995) (Tabela 2), os quais foram suplementados com a combinação de 0; 0,50 e 1,0 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0; 0,050 e 0,100 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) (Tabela 3). Aos 21 dias realizou-se o subcultivo dos explantes para renovação do meio de cultura mantendo-se os tratamentos. O número de gemas formadas por explante foi avaliado aos 84 dias após a inoculação.

O experimento de multiplicação foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x3x3x3), testando-se três clones, três meios de cultura, três concentrações de BAP combinadas com três concentrações de ANA, contendo cinco repetições compostas de um explante.

Tabela 2 - Composição básica dos meios nutritivos MS, WPM e JADS utilizados para os experimentos de micopropagação de *Eucalyptus globulus*

COMPONENTE	PESO MOLECULAR	MS ⁽¹⁾	WPM ⁽²⁾	JADS ⁽³⁾
Macronutrientes	(g)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	80,04	1.650,00	400,00	320,00
KNO ₃	101,11	1.900,00	–	809,00
CaCl ₂ .2H ₂ O	147,02	440,00	96,00	–
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,15	–	556,00	1.181,00
KH ₂ PO ₄	136,09	170,00	170,00	408,00
K ₂ SO ₄	174,26	–	990,00	–
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,48	370,00	370,00	739,50
Micronutrientes	(g)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	372,24	37,300	37,300	74,500
Fe(SO ₄).7H ₂ O	278,02	27,800	27,800	55,600
MnSO ₄ .H ₂ O	169,01	16,900	16,900	16,900
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287,54	8,600	8,600	4,320
H ₃ BO ₃	61,83	6,200	6,200	3,100
KI	165,99	0,830	–	–
CuSO ₄ .5H ₂ O	249,68	0,025	0,250	1,250
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241,95	0,250	0,250	0,150
CoCl ₂ .6H ₂ O	237,93	0,025	–	0,250
Vitaminas	(g)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
Tiamina-HCl	337,30	0,10	1,00	5,00
Piridoxina-HCl	205,60	0,50	1,00	0,50
Ácido Nicotínico	123,11	0,50	1,00	0,50
Pantotenato Ca ²⁺	476,54	–	1,00	2,40
Biotina	244,30	–	0,01	–
Aminoácidos	(g)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
Cisteína	121,16	–	–	5,00
Glicina	75,07	2,00	1,00	–
Fonte de carbono	(g)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
Mio-inositol	180,16	100,00	100,00	100,00
Sacarose	342,30	30.000,00	30.000,00	30.000,00

⁽¹⁾ adaptado segundo MURASHIGE e SKOOG (1962), ⁽²⁾ adaptado segundo LLOYD e MCCOWN (1980), ⁽³⁾ adaptado segundo CORREIA et al. (1995).

Tabela 3 - Diferentes concentrações e combinações dos reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético) acrescidos aos meios de cultura (MS, JADS, WPM), visando à indução de resposta morfogênica em três genótipos de *E. globulus*

Tratamentos	Reguladores de crescimento (mg L ⁻¹)	
	BAP	ANA
T1	0	0
T2	0	0,05
T3	0	0,1
T4	0,5	0
T5	0,5	0,05
T6	0,5	0,1
T7	1,0	0
T8	1,0	0,05
T9	1,0	0,1

4.4.4.1 Avaliação dos Aspectos Fisiológicos

A cada subcultivo (21 dias) foram avaliados o número de brotos por microcepa, taxas de oxidação, contaminação e manifestações bacterianas endofíticas em todos os tratamentos analisados.

Após doze subcultivos com intervalos de 21 dias, 5 repetições (número de frascos) com quatro explantes, de cada clone e de cada meio (suplementado com 0,70 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ ANA) foram separadas para avaliação dos parâmetros fisiológicos (peso da matéria seca e número de brotos por microcepa).

Cabe destacar que o termo microcepa será utilizado para se referir ao “tufo” de brotações formadas durante a etapa de multiplicação, independente da formação ou não de raízes.

4.4.4.2 Avaliação Nutricional

Após a mensuração do peso de massa fresca, as microcepas foram armazenadas em sacos de papel e acondicionadas em estufa a 60°C até manutenção de peso constante. Em seguida, as microcepas foram pesadas e então moídas para o preparo das amostras para posterior análise química do teor nutricional no Laboratório de Tecidos Vegetais, do Departamento Ciência do Solo ESALQ/USP, sendo que as amostras foram analisadas seguindo metodologia desenvolvida por Sarruge e Haag (1974).

4.4.5 Alongamento

Um experimento inicial foi elaborado utilizando-se microcepas obtidas na fase de multiplicação, contendo 10 gemas axilares foram pré testadas em meio de cultura WPM suplementado com a combinação de 0; 0,05 e 0,10 mg L⁻¹ de BAP e 0; 0,1; 0,2 e 0,3 mg L⁻¹ ANA (Tabela 4).

Este experimento de alongamento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x3x4), testando-se três clones, três concentrações de BAP combinadas com quatro concentrações de ANA, contendo dez repetições com um explante.

Os resultados obtidos neste primeiro experimento (após dois subcultivos, totalizando 42 dias) serviram como base para elaborar o segundo experimento de alongamento, no qual foram selecionados os três melhores tratamentos para esta fase, sendo a concentração de 0,10 mg L⁻¹ de BAP combinado com concentrações de 0,1; 0,2 e 0,3 mg L⁻¹ ANA.

O segundo experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x3), testando-se três clones, uma concentração de BAP combinada com três concentrações de ANA, contendo 40 repetições com um explante.

Tabela 4 - Diferentes concentrações e combinações dos reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético) acrescidos ao meio de cultura WPM, visando a indução de resposta morfogênica em três genótipos de *E. globulus*

Tratamentos	Reguladores de crescimento (mg L ⁻¹)	
	BAP	ANA
T1	0	0
T2	0	0,1
T3	0	0,2
T4	0	0,3
T5	0,5	0
T6	0,5	0,1
T7	0,5	0,2
T8	0,5	0,3
T9	0,1	0
T10	0,1	0,1
T11	0,1	0,2
T12	0,1	0,3

4.4.6 Enraizamento *in vitro*

Brotações alongadas *in vitro* dos clones 01, 24 e 33 com tamanho de 0,5 cm a 1 cm foram coletadas e transferidas para meio de cultura WPM, o qual foi suplementado com a combinação de 0 e 0,05 mg L⁻¹ de BAP com 0; 0,1; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de AIB; 20 g L⁻¹ de sacarose e 4,5 mg L⁻¹ de ágar (Tabela 5). Os tubos de ensaio apresentaram dimensões de 10 cm x 2 cm sendo adicionado 5 mL do meio nutritivo para o enraizamento.

Tabela 5 - Concentrações e combinações dos reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina) e AIB (ácido indolbutírico) acrescidos ao meio de cultura WPM, visando a indução de resposta morfogênica em três genótipos de *E. globulus*

Tratamentos	Reguladores de crescimento (mg L ⁻¹)	
	BAP	AIB
T1	0	0
T2	0	0,1
T3	0	0,5
T4	0	1,0
T5	0,05	0
T6	0,05	0,1
T7	0,05	0,5
T8	0,05	1,0

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x2x4), testando-se três clones, duas concentrações de BAP combinadas com quatro concentrações de AIB, contendo 12 repetições com dois explantes por repetição.

4.4.6.1 Análise histológica

Um segmento radicular da raiz desenvolvida de *E. globulus* aos 42 dias de cultivo nos tratamentos, foi fixado em solução de Karnovsky (1965), seguida de desidratação alcoólica-etílica em concentrações crescentes de 10 a 100% (v/v), permanecendo 10 minutos em cada uma delas. Em seguida, as amostras foram inclusas em resina de hidroxiethylmetacrilato (Leica) de acordo com as recomendações do fabricante. O bloco contendo a amostra foi seccionado em micrótomo rotativo manual (Leica), com secções longitudinais de 5 µm de espessura.

Os cortes de material emblocado foram aderidos em lâminas histológicas e submetidos à coloração de azul de toluidina, resultando em uma coloração azul esverdeado para esclerênquima, verde azulado para elementos traqueais e púrpura avermelhado para colênquima e parênquima.

As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2) sendo as imagens capturadas na mesma escala com câmera SAMSUNG (SDC-313).

4.4.7 Procedimentos estatísticos

Os dados mensurados de todos os experimentos foram submetidos ao teste de Hartley ($p < 0,05$) e, em seguida, realizou-se a análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$ e $p < 0,01$). De acordo com a significância, para o dado número de gemas foram realizadas a análise de regressão polinomial ($p < 0,01$ e $p < 0,05$), enquanto as médias dos demais dados avaliados foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software *Statistica* 8 (Statsoft Inc. 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Micropropagação de *Eucalyptus globulus*

5.1.1 Estabelecimento *in vitro*

O estabelecimento do cultivo *in vitro* de *E. globulus* foi satisfatório, considerando que a taxa média de sobrevivência dos segmentos nodais foi de 80% (Fig. 5A), independente do clone. Aos 30 dias após a introdução *in vitro* as brotações axilares apresentaram comprimento médio variando entre 1 e 2 cm (Fig. 6). Nessa época, as brotações axilares emitidas foram cortadas e transferidas para meio de multiplicação.

Um dos entraves ao estabelecimento do cultivo *in vitro* é a contaminação que acarreta a perda dos explantes, prejudicando o sucesso dos resultados e tornando a técnica onerosa. Neste experimento as porcentagens de contaminação fúngica atingiram índices de 33%, enquanto a manifestação bacteriana endofítica foi de 5% (figuras 5B e 5C). No entanto, observa-se que os percentuais destas contaminações foram consideravelmente baixos, provavelmente em função dos segmentos nodais serem advindos de minicepas mantidas em casa de vegetação até o surgimento das brotações, assegurando um controle fitossanitário mais efetivo. Fato este que corrobora as observações de Brondani et al. (2009), que afirmam que os índices de estabelecimento *in vitro* de explantes (no caso de segmentos nodais) geralmente são elevados quando as brotações são originadas de minicepas cultivadas em minijardim clonal protegido, devido ao maior controle ambiental e nutricional, em comparação aos explantes originados de árvores adultas coletados diretamente no campo.

Analizando o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *E. globulus*, os valores foram semelhantes aos reportados na literatura, os quais podem ser considerados elevados, e adequados para a micropropagação de *Eucalyptus* (DUTRA et al., 2009). Brondani et al. (2009) obteve 41,33% de contaminação fúngica ao utilizar 0,5% de cloro ativo (NaOCl) durante 10 minutos para a assepsia de segmentos nodais de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, sendo que a porcentagem de estabelecimento dos segmentos nodais ficou acima de 45%. Joshi et al. (2003) ao trabalhar com segmentos nodais de 2 cm a 3 cm de comprimento, coletados a campo de árvores de *E. tereticornis* x *E. grandis* de 30 anos de idade, obtiveram 50% de segmentos nodais não contaminados, quando expostos durante 20 minutos na concentração de 30% (v/v) de NaOCl₂. Fantini Junior e Graça (1990) ao inocular segmentos nodais de *E. saligna* obtidos de estacas enraizadas de 11 plantas-matrizes,

definiram o protocolo de estabelecimento ao expor os segmentos nodais em solução de NaOCl a 1% (v/v) durante 15 minutos.

Tratamento semelhante foi realizado por Bennett et al. (1994) que utilizaram hipoclorito de sódio a concentração de 1% (v/v) durante 20 minutos para assepsia de segmentos nodais de *E. globulus* de árvores de 4 a 5 anos de idade. Borges et al. (2012) utilizaram solução à 1% (v/v) de NaOCl acrescida com 3 gotas de Tween 20 durante 15 minutos para assepsia de segmentos nodais de híbridos de *E. globulus*.

A oxidação dos explantes constitui outro fator que influencia negativamente no estabelecimento *in vitro*, porém, os percentuais obtidos neste experimento durante a introdução *in vitro* de *E. globulus* foram baixos, permanecendo em torno de 6 % (Fig. 5D). Resultados semelhantes foram obtidos para *E. benthamii* X *E. dunnii* com 6% dos explantes oxidados (BRONDANI, 2008). No entanto, para alguns genótipos de *E. dunnii*, Navroski (2011) obteve valores inferiores a 30% de oxidação fenólica, o mesmo observado por Borges (2009) para híbridos de *E. globulus*. Segundo Benson (2000), a oxidação leva ao aumento na formação de radicais livres que são responsáveis por danos irreparáveis ao DNA, proteínas e enzimas, causando disfunção celular, levando a morte do explante. De acordo com Andrade et al. (2000) a oxidação fenólica é um fator comum no cultivo de espécies lenhosas, sendo os compostos fenólicos, muitas vezes, produzidos em áreas injuriadas dos explantes. Para Ledo et al. (2002), além de ferimentos e outros fatores inerentes ao explante, a oxidação pode ser provocada pelos componentes do meio nutritivo. Além disso, a atividade da fenilalanina amoniliase (PAL), enzima que atua no metabolismo de compostos fenólicos, é aumentada pela exposição de tecidos a injúrias (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Todavia, em espécies florestais, as contaminações e a oxidação fenólica são apontadas como os principais agentes que afetam o sucesso do estabelecimento de cultivos *in vitro*, considerando-se, apesar disso, que níveis reduzidos de contaminação e de oxidação não inviabilizam a cultura de tecidos (XAVIER et al., 2009).

Contudo, o êxito de um protocolo de micropropagação depende claramente da fase de estabelecimento *in vitro*. Isso porque as etapas seguintes de multiplicação, alongamento, enraizamento e posterior transferência para condições *ex vitro* só podem ser executadas após o estabelecimento de culturas assépticas e dotadas de bom vigor vegetativo (GEORGE; DEBERGH, 2008).

Figura 5 - Porcentagem de: (A) explantes estabelecidos; (B) contaminação fúngica; (C) manifestação bacteriana endofítica e (D) oxidação, de segmentos nodais de *E. globulus* aos 30 dias após a introdução *in vitro*

Figura 6 - Detalhe da emissão de brotações axilares em segmento nodal de *E. globulus* aos 30 dias após a introdução *in vitro* (setas vermelhas). Barra = 1 cm

5.1.2 Multiplicação

A análise de variância dos dados amostrados na fase de multiplicação de gemas axilares de explantes de *E. globulus* revelou que houve interação entre os fatores clone, meio e concentrações de BAP e ANA (Tabela 6).

Tabela 6 - Resumo da análise de variância do número de gemas emitidas por explante de *E. globulus* cultivados *in vitro* em função do clone, meio de cultura e concentrações combinadas de reguladores de crescimento, aos 84 dias de cultivo *in vitro*

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios
		NB ⁽¹⁾ (gemas explante ⁻¹)
Clone (CLO)	2	77,6048**
Meio (MEI)	2	9,4294**
BAP	2	104,2812**
ANA	2	0,0109 ^{ns}
CLO*MEI	4	13,3404**
CLO*BAP	4	4,9932**
CLO*ANA	4	0,8598 ^{ns}
MEI*BAP	4	2,4418**
MEI*ANA	4	0,2427 ^{ns}
BAP*ANA	4	0,3021 ^{ns}
CLO*MEI*BAP	8	3,7683**
CLO*MEI*ANA	8	1,5312**
CLO*BAP*ANA	8	0,6236 ^{ns}
MEI*BAP*ANA	8	0,9331*
CLO*MEI*BAP*ANA	16	1,4266**
Resíduo	329	0,4544
Média	-	8,26
CVexp.(%)	-	26,32

^{ns} valor não significativo em nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

* e ** valor significativo em nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F.

⁽¹⁾ dados transformados por $n^{0,5}$ onde n = dado coletado.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

O clone 01 quando cultivado em meio de cultura WPM apresentou a formação de cerca de 6 gemas por explante (Fig. 7A), enquanto que em meio JADS observou-se a formação de 5 gemas (Fig. 7B) e em meio de cultura MS, 4 gemas foram emitidas por explante (Fig. 7C). Independente do meio de cultura utilizado, a combinação dos reguladores de crescimento nas concentrações próximas de 0,70 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA foram as que apresentaram os melhores resultados (Fig. 7).

Figura 7 - Valores médios aos 84 dias de cultivo *in vitro* do número de gemas (NG) por explante do clone 01 em função da combinação de concentrações de BAP e ANA nos três meios de cultura avaliados. A: meio de cultura WPM, B: meio de cultura JADS, C: meio de cultura MS.

O clone 24 apresentou a emissão de cerca de 13 gemas por explante quando cultivado em meio nutritivo WPM (Fig. 8A), cerca de 23 gemas por explante em meio JADS (Fig. 8B) e em meio de cultura MS, o valor foi de 4 gemas por explante (Fig. 8C). Independente do meio de cultura utilizado, a combinação dos reguladores de crescimento nas concentrações próximas de $0,70 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, semelhante ao observado para o clone 01, também foram as que apresentaram os melhores resultados (Fig. 8).

Figura 8 - Valores médios aos 84 dias de cultivo *in vitro* do número de gemas (NG) por explante do clone 24 em função da combinação de concentrações de BAP e ANA nos três meios de cultura avaliados. A: meio de cultura WPM, B: meio de cultura JADS, C: meio de cultura MS.

O clone 33 apresentou 20 gemas emitidas por explante quando cultivado em meio nutritivo WPM (Fig. 9A), cerca de 14 gemas por explante em meio JADS (Fig. 9B), e em meio de cultura MS, o valor foi de 19 gemas emitidas por explante (Fig. 9C), sendo este clone o que emitiu maior número de gemas comparado aos demais, considerando-se o mesmo período (84 dias) de cultivo *in vitro*, demonstrando ser um material mais responsivo durante a fase de multiplicação. Independente do meio de cultura utilizado, novamente as combinações de concentrações de $0,70 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA foram as que apresentaram os melhores resultados (Fig. 9).

Figura 9 - Valores médios aos 84 dias de cultivo *in vitro* do número de gemas (NG) por explante do clone 33 em função da combinação de concentrações de BAP e ANA nos três meios de cultura avaliados. A: meio de cultura WPM, B: meio de cultura JADS, C: meio de cultura MS.

A multiplicação *in vitro* de *E. globulus* em diferentes combinações de ANA e BAP, revelaram que as concentrações próximas a $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA no meio de cultura WPM, mostraram-se mais eficientes para a obtenção de gemas axilares em quantidade e qualidade adequadas. Em contrapartida, Bennett et al. (1994) ao trabalhar com segmentos nodais de árvores de *E. globulus*, observaram decréscimos na média de gemas multiplicadas por explante nas concentrações de BAP acima de $2,5 \text{ } \mu\text{mol}$ ($0,56 \text{ mg L}^{-1}$) em meio MS.

Graça et al. (2001), ao compararem o efeito de BAP e thidiazuron (TDZ) na multiplicação *in vitro* de brotações de *E. dunnii*, relataram que BAP apresentou efeito superior quanto à produção de brotações, e minimizou a formação de calos. Esse mesmo comportamento foi relatado por Andrade et al. (2006) na multiplicação de *E. grandis* sob o estímulo de BAP, observando que concentrações elevadas dessa citocinina promovem ação inibitória na multiplicação de *Eucalyptus* spp., corroborando o observado por Del Ponte et al.

(2001) e Brondani et al. (2011), uma vez que, o efeito da concentração dos reguladores de crescimento varia de acordo com a espécie (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Pode-se observar que a presença de ANA promoveu resultados positivos quanto a produção de brotações ao interagir em determinadas concentrações com o BAP. Esse comportamento está de acordo com as observações de George (1993), segundo o qual o balanço entre citocininas e auxinas regula a fase de proliferação de gemas axilares. Joshi et al. (2003) obtiveram de 20 a 25 gemas por explante aos 150 dias em meio MS na concentração de 1 mg L⁻¹ de BAP combinado com 1 mg L⁻¹ de ANA para *E. tereticornis* x *E. grandis*. Resultados semelhantes foram obtidos por Bisht et al. (1999) para *E. tereticornis* x *E. camaldulensis*, onde a maior taxa de multiplicação para todos os clones ocorreu nas combinações de 1 mg L⁻¹ de BAP com 1 mg L⁻¹ de ANA, aos 120 dias de cultivo em meio MS.

Dessa forma, pode-se inferir que as citocininas são indispensáveis para a quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares, sendo a sua concentração e a combinação com as auxinas os fatores que mais influenciaram no sucesso da multiplicação *in vitro* de *E. globulus*, que também foi afetada de maneira diferenciada pelos diferentes tipos de meio de cultura.

A clorose de folhas nos explantes provenientes dos clones 01 e 24 foi mais característica em meio nutritivo MS, independente da combinação de regulador de crescimento avaliada. Entretanto, não foi verificado clorose nas folhas dos explantes de *E. globulus* quando cultivados nos meios WPM e JADS, os quais corresponderam as melhores características morfológicas, tanto em termos de formação de gemas, quanto em relação ao padrão de desenvolvimento de folhas. A insuficiência na quantidade de um determinado elemento químico essencial para a vida da planta, ou combinações que o tornem pouco disponível, provocará distúrbios no metabolismo, que podem ser evidenciados externamente, através da diminuição do crescimento, clorose foliar ou outras anomalias (EPSTEIN, 1975).

Além disso, quanto a manifestação bacteriana endofítica, a análise de variância revelou efeito significativo na interação entre clone e meio de cultura em relação ao número de microcepas com manifestação bacteriana endofítica (Tabela 7). Observou-se elevada presença de microrganismos endofíticos quando se utilizou o meio nutritivo JADS, sendo que a competição por nutrientes dos microrganismos endofíticos com o explante pode ter retardado o crescimento e emissão de gemas, exceto para o clone 24 (Tabela 8). Até o momento não se sabe qual o fator ou fatores que desencadeiam a manifestação bacteriana no meio de cultura, levanta-se apenas a hipótese, que esses endófitos permanecem latentes *in*

vitro, sem causar sintomas nas microplantas e posteriormente passam a competir por nutrientes minerais e carboidratos do meio de cultura, comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento das plantas (BATAGIN-PIOTTO, 2013). No entanto, segundo o mesmo autor, após diversas pesquisas visando elucidar a interação entre plantas e microrganismos é possível inferir que todas as plantas apresentam relações simbióticas com microrganismos. Bactérias promotoras de crescimento, por exemplo, têm sido mencionadas em diferentes espécies de interesse comercial como arroz (HUREK et al., 1994), cana-de-açúcar (MAGNANI et al., 2010), tomate (ARDANOV et al., 2011), abacaxi (ABREU-TARAZI, 2010), pupunha (ALMEIDA et al., 2009), citros (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004; ANDREOTE et al., 2004), mamão (THOMAS; KUMARI, 2010), banana (THOMAS; SOLY, 2009) e eucaliptos (FERREIRA et al., 2008; ANDREOTE et al., 2008; PROCÓPIO et al., 2009).

Contudo, por essas características e pela análise das equações ajustadas, o meio nutritivo WPM (Fig. 10) foi adotado como padrão para as demais fases da micropropagação de *Eucalyptus globulus*, pois apesar deste meio apresentar microcepas com manifestações bacterianas, foi o que apresentou um melhor desenvolvimento das microcepas para todos os genótipos avaliados.

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para o número de microcepas com manifestação bacteriana endofítica (NBM), de três clones de *E. globulus* cultivadas em três diferentes meios de cultura no decorrer de 10 subcultivos na fase de multiplicação *in vitro*

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios
		NMB ⁽¹⁾
Clone (C)	2	0,1312 ^{ns}
Meio de cultura (M)	2	6,0593 ^{**}
C x M	4	0,5691 ^{ns}
Resíduo	35	0,3428
Total	43	

* e ** valor significativo em nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F.

^{ns} = F não-significativo a 5% de probabilidade; ⁽¹⁾ Dados transformados com $(x+0,5)^{0,5}$; G.L. = graus de liberdade; CV = 25,2 %.

Tabela 8 - Número médio de microcepas de três clones de *E. globulus* em três diferentes meios de cultura, apresentando manifestação bacteriana endofítica no decorrer de 10 subcultivos na fase de multiplicação *in vitro*

Clones	Meios		
	JADS	MS	WPM
1	40,30 Aa	13,39 Ac	14,30 Ab
24	45,91 Aa	5,87 Ac	23,13 Ab
33	29,97 Aa	10,67 Ac	26,57 Ab

Letras maiúsculas iguais nas colunas (verticais) indicam médias iguais, pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas iguais nas linhas (horizontal) indicam médias iguais, pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro

Figura 10 - Detalhe de indução de gemas axilares em explantes de *E. globulus* aos 84 dias após a inoculação, nas combinações de concentrações de 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA em meio WPM. (A) clone 01; (B) clone 24; (C) clone 33. Barra = 1 cm

Os resultados também demonstraram um aumento na taxa de multiplicação a partir do 4º subcultivo para todos os clones, e uma posterior estabilização após o 6º subcultivo (Tabelas 9, 10 e 11), provavelmente os subcultivos influenciaram na capacidade de resposta do material, resultando na reversão da juvenilidade (GONÇALVES, 1982; BONGA; VON ADERKAS, 1992; ASSIS; TEIXEIRA, 1998; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Para *Eucalyptus*, a micropropagação com fins de rejuvenescimento e, ou, revigoramento clonal, é dependente do número de subcultivos *in vitro*, meios de cultura e balanço hormonal necessários, para alcançar respostas satisfatórias quanto à reatividade das gemas, sendo a restauração da competência rizogênica, em geral, obtida de forma significativa a partir do 12º subcultivo. Entretanto, vale salientar que esse rejuvenescimento é progressivo e parcial, bem como dependente da espécie e idade ontogenética do material vegetativo utilizado na micropropagação (XAVIER et al., 2009). Bennett et al. (1994) afirmam que a estabilização das brotações no cultivo *in vitro* é importante para que o posterior enraizamento das gemas

alongadas seja feito com sucesso. Segundo esses autores a duração desse período de estabilização é variável de acordo com a espécie e a idade do material de origem.

De maneira geral, a cada subcultivo as microcepas passam por uma fase de crescimento e multiplicação exponencial, em que se observa o aumento da massa vegetal, que segundo Handro e Floh (1990) estes processos, associados à diferenciação, são mediados por divisões e especializações das células que resultam em uma estrutura organizada. Para cada genótipo em micropropagação, deve-se observar seu crescimento para se determinar o período mais adequado de cada subcultivo, a fim de se obter a resposta desejada com a propagação *in vitro* (XAVIER et al., 2009). Variações entre genótipos são frequentemente relatadas em relação às taxas de multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus* (CORREIA et al., 1995; BENNETT et al., 1994; SOBROSA; CORDER, 2003; BRONDANI et al., 2009), demonstrando ser esse fator o que exerce grande influência na resposta *in vitro*.

A ausência de BAP no meio de cultura aparentemente não resultou em efeito positivo na produção de gemas em todos os genótipos avaliados, ao contrário, as maiores médias foram observadas na presença desta citocinina (Tabelas 9, 10 e 11). Esse fato corrobora as afirmações de Grattapaglia e Machado (1998), de que as citocininas são indispensáveis para a quebra de dormência apical e também para a indução e proliferação de gemas axilares. Ainda segundo estes autores, o tipo e concentração de citocinina são os fatores que mais influenciam no sucesso da multiplicação *in vitro*, uma vez que, são indispensáveis para a quebra de dominância apical e indução e proliferação de gemas axilares, participando inclusive do alongamento e diferenciação celular. Das citocininas utilizadas na cultura de tecidos de *Eucalyptus*, o BAP tem sido muito eficiente em promover a multiplicação de partes aéreas e a indução de gemas axilares e adventícias (HU; WANG, 1983; NAVROSKI, 2011).

Tabela 9 - Número médio de gemas formadas do clone 01 de *E. globulus*, ao longo de 10 subcultivos em três diferentes meios de cultura (WPM, JADS e MS)

Tratamento	Meios de Cultura	Subcultivos									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1	WPM	1,0	1,0	1,0	0,6	1,0	0,8	1,0	1,6	0,8	0,6
	JADS	1,0	1,0	1,0	1,8	1,8	1,0	0,6	0,0	0,0	0,0
	MS	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,8	1,0	1,6
T2	WPM	1,0	1,0	1,0	0,8	1,0	1,0	0,2	0,2	0,0	0,0
	JADS	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,8	0,4	0,2	0,0	0,0
	MS	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,2	0,0	0,0	0,0
T3	WPM	1,0	1,0	1,0	0,8	1,0	1,0	0,6	0,0	0,0	0,0
	JADS	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,4	0,2	0,0	0,0
	MS	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,2	0,2	0,0	0,0
T4	WPM	1,0	7,6	21,0	5,2	5,2	8,0	14,5	19,8	25,6	27,8
	JADS	1,0	8,0	15,2	3,4	3,4	4,6	7,0	8,0	9,3	12,0
	MS	1,0	12,0	23,8	3,6	3,6	7,4	5,8	4,8	5,4	4,8
T5	WPM	1,0	7,4	16,0	3,6	3,6	5,0	9,2	9,0	9,8	9,4
	JADS	1,0	8,2	21,4	5,6	5,6	8,2	7,8	11,7	12,6	11,0
	MS	1,0	9,0	21,6	4,0	4,0	9,2	10,7	11,8	12,5	13,6
T6	WPM	1,0	7,2	14,4	4,4	4,4	7,2	11,0	15,8	16,2	14,0
	JADS	1,0	4,8	12,2	1,8	1,8	4,0	5,5	6,6	8,1	8,8
	MS	1,0	7,6	17,2	4,4	4,4	8,2	8,2	7,2	5,8	4,8
T7	WPM	1,0	8,0	14,0	5,0	5,0	8,6	15,2	19,4	20,6	18,2
	JADS	1,0	5,6	10,0	4,0	4,0	6,4	7,6	5,6	8,8	5,3
	MS	1,0	3,8	7,0	3,0	3,0	7,6	7,3	3,6	2,4	2,2
T8	WPM	1,0	5,2	10,6	7,0	7,0	11,8	14,2	16,9	16,6	12,2
	JADS	1,0	5,4	10,0	4,4	4,4	7,2	10,2	10,3	6,8	4,0
	MS	1,0	3,0	5,2	4,4	4,4	7,2	9,5	4,0	4,0	4,0
T9	WPM	1,0	4,0	10,0	3,4	3,4	6,6	10,7	16,8	16,7	14,6
	JADS	1,0	4,8	9,8	3,0	3,0	4,6	5,0	2,6	2,4	2,2
	MS	1,0	5,4	11,2	3,8	3,8	6,4	8,7	6,7	8,7	6,0

Tabela 10 - Número médio de gemas formadas do clone 24 de *E. globulus*, ao longo de 10 subcultivos em três diferentes meios de cultura (WPM, JADS e MS)

Tratamento	Meios de Cultura	Subcultivos									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1	WPM	1,0	2,0	2,0	2,8	2,8	3,8	1,6	1,4	0,0	0,0
	JADS	1,0	2,6	3,6	4,2	3,0	3,0	1,8	1,0	0,0	0,0
	MS	1,0	4,2	4,2	1,4	1,4	1,4	0,6	0,0	0,0	0,0
T2	WPM	1,0	1,6	1,6	2,8	2,8	3,0	1,0	0,4	0,0	0,0
	JADS	1,0	1,6	3,6	1,8	2,0	1,6	1,8	1,0	0,0	0,0
	MS	1,0	6,6	6,6	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T3	WPM	1,0	1,4	1,6	2,0	2,0	1,8	1,4	0,4	0,0	0,0
	JADS	1,0	2,6	3,8	2,8	3,3	3,5	2,3	1,6	0,0	0,0
	MS	1,0	2,6	2,6	4,6	2,4	2,2	0,6	0,6	0,0	0,0
T4	WPM	1,0	2,0	2,0	8,8	8,8	12,6	17,2	21,2	18,0	29,0
	JADS	1,0	8,2	15,2	21,7	19,3	24,9	20,9	14,8	21,3	28,5
	MS	1,0	7,8	7,8	11,4	4,2	5,8	5,4	7,2	6,2	5,6
T5	WPM	1,0	1,2	2,0	13,6	18,0	19,4	18,8	21,9	22,1	22,3
	JADS	1,0	4,0	10,0	20,7	20,0	23,3	21,6	28,2	27,2	25,2
	MS	1,0	2,2	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T6	WPM	1,0	1,2	3,2	12,6	14,0	21,0	20,0	23,5	25,5	22,3
	JADS	1,0	5,4	17,2	23,3	26,8	24,3	28,5	28,1	26,9	28,8
	MS	1,0	5,6	5,6	4,0	4,4	4,6	4,2	2,8	0,0	0,0
T7	WPM	1,0	5,2	5,2	4,8	4,8	9,0	7,4	9,6	8,8	11,0
	JADS	1,0	6,4	13,8	20,3	15,1	17,5	11,3	11,6	10,6	0,8
	MS	1,0	12,2	12,2	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T8	WPM	1,0	5,4	2,4	7,8	14,3	18,7	19,2	24,6	26,6	28,2
	JADS	1,0	7,0	18,6	19,7	16,6	21,0	20,6	14,0	14,6	5,4
	MS	1,0	11,0	11,0	5,2	1,6	1,6	0,8	0,0	0,0	0,0
T9	WPM	1,0	1,6	1,6	4,0	4,0	6,2	7,8	9,0	9,2	14,4
	JADS	1,0	7,0	14,2	21,5	24,9	26,4	26,8	25,0	20,3	24,0
	MS	1,0	5,2	5,2	9,8	6,6	9,8	11,2	8,0	8,6	5,6

Tabela 11 - Número médio de gemas formadas do clone 33 de *E. globulus*, ao longo de 10 subcultivos em três diferentes meios de cultura (WPM, JADS e MS)

Tratamentos	Meios de Cultura	Subcultivos									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T1	WPM	1,0	1,4	3,8	2,6	2,6	2,8	1,6	0,8	0,0	0,0
	JADS	1,0	2,6	4,8	2,4	0,4	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
	MS	1,0	3,4	4,4	3,6	2,6	0,6	0,4	0,0	0,0	0,0
T2	WPM	1,0	1,8	2,8	2,2	0,8	1,2	1,6	0,6	0,0	0,0
	JADS	1,0	3,0	4,6	2,8	1,0	1,0	0,4	0,0	0,0	0,0
	MS	1,0	4,4	6,6	6,2	2,2	2,0	1,4	1,2	0,0	0,0
T3	WPM	1,0	1,8	3,0	3,4	1,2	1,6	0,6	0,6	0,4	0,0
	JADS	1,0	3,0	4,4	3,6	1,6	1,6	1,0	1,0	0,0	0,0
	MS	1,0	1,6	2,8	2,0	0,8	0,4	0,2	0,2	0,0	0,0
T4	WPM	1,0	3,0	11,4	17,6	21,4	23,9	27,0	25,9	27,9	30,0
	JADS	1,0	9,0	18,4	10,8	9,4	16,6	16,2	16,8	23,2	23,2
	MS	1,0	6,2	13,6	15,3	6,4	4,8	6,4	4,0	3,2	0,0
T5	WPM	1,0	3,2	11,2	20,8	19,7	21,0	25,7	25,5	27,0	29,1
	JADS	1,0	5,6	12,6	10,2	9,2	11,3	12,0	14,0	14,5	14,0
	MS	1,0	5,0	14,0	17,7	4,8	2,6	4,6	2,4	1,4	0,0
T6	WPM	1,0	4,0	9,4	14,6	18,4	18,8	22,4	26,3	26,4	28,3
	JADS	1,0	1,8	18,4	21,2	11,7	12,6	11,9	10,7	10,6	10,4
	MS	1,0	5,6	14,0	17,4	5,2	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T7	WPM	1,0	3,0	9,4	14,4	17,7	20,2	24,7	24,7	30,0	26,1
	JADS	1,0	4,4	14,6	15,5	4,4	5,8	6,0	2,6	3,0	1,0
	MS	1,0	4,8	12,4	12,7	1,6	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0
T8	WPM	1,0	3,4	9,0	12,2	13,2	16,6	20,6	19,8	20,0	28,0
	JADS	1,0	5,6	18,6	13,8	11,6	13,6	12,6	11,8	15,4	5,2
	MS	1,0	6,4	15,6	15,2	5,8	6,4	8,2	6,6	5,6	3,0
T9	WPM	1,0	3,0	9,6	17,6	17,7	16,7	19,7	20,4	25,0	27,5
	JADS	1,0	5,0	15,0	11,4	1,2	1,8	0,0	0,4	0,0	0,0
	MS	1,0	4,6	11,2	11,0	3,6	0,8	0,6	0,4	0,0	0,0

No entanto, durante o cultivo *in vitro*, o desenvolvimento e o crescimento dos explantes são também diretamente influenciados pela composição nutritiva do meio de cultura, que se apresenta composta por combinações de macro e micronutrientes, bem como, vitaminas, aminoácidos, carboidratos e reguladores de crescimento (NEUMANN et al., 2009). O meio de cultura tem por finalidade manter adequadamente as características de crescimento do explante pelo suprimento constante de nutrientes e demais compostos em curto espaço de tempo (DAVEY; ANTHONY, 2010).

Dentre os fatores envolvidos na regeneração *in vitro*, a nutrição mineral tem um papel importante na regulação morfogênética (HIGASHI, 1996; RAMAGE; WILLIAMS, 2002) por ser o meio de cultura o componente mais abundante dentre todos os fatores considerados. A disponibilidade, absorção, transporte e metabolismo dos diferentes minerais participam na formação de meristemas e órgãos e no subsequente crescimento. O balanço de nitrogênio, fósforo e cálcio são essenciais tanto para a morfogênese como para o crescimento, e os íons como potássio, magnésio e enxofre parecem cumprir papel de suporte (RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

Para efeito de melhor análise de como os meios de cultura e os nutrientes disponíveis em cada um influenciaram o cultivo *in vitro* de clones de *E. globulus*, as microcepas foram submetidas à análise nutricional. Sendo assim, a análise de variância dos dados amostrados revelou efeito significativo da interação entre clones e meio de cultura em relação aos teores de fósforo, potássio, magnésio e enxofre. Por sua vez, para os teores de nitrogênio e cálcio houve efeito significativo apenas para os fatores clones e meio de cultura (Tabela 12).

Tabela 12 - Resumo da análise de variância para o teor de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) em brotações de minicepas de três clones de *E. globulus* em três diferentes meios de cultura (MS, JADS e WPM) com 0,7 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA na fase de multiplicação *in vitro*

Fonte de variação	G.L.	Quadrados Médios					
		N ¹ (g kg ⁻¹)	P (g kg ⁻¹)	K (g kg ⁻¹)	Ca (g kg ⁻¹)	Mg (g kg ⁻¹)	S (g kg ⁻¹)
Clone (C)	2	0,09*	2,58*	45,50*	13,25*	0,30*	0,11*
Meio de cultura(M)	2	0,53*	40,89*	70,50*	70,05*	5,04*	28,08*
C x M	4	0,05 ^{ns}	1,27*	77,11*	0,93 ^{ns}	0,29*	0,39*
Resíduo	26	0,02	0,31	7,19	0,95	0,09	0,02
Média	-	3,78	6,32	25,6	5,56	1,36	5,77
CV _{exp} (%)	-	3,74	8,81	10,47	17,53	22,06	2,45

* = F significativo a 5% de probabilidade e ^{ns} = F não-significativo a 5% de probabilidade;

⁽¹⁾ Dados transformados por log(x+1); G.L. = graus de liberdade; CV_{exp}(%) = coeficiente de variação experimental.

Na avaliação dos macronutrientes, pode-se notar que o clone 33 tem uma tendência em acumular maiores quantidades de nitrogênio, independente do meio, e o clone 01 apresenta característica inversa, acumulando menores quantidades do nutriente, evidenciando assim, suas exigências nutricionais (Tabela 13). Uma vez que o nitrogênio apresenta função estrutural no vegetal, fazendo parte de muitos componentes celulares, como proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, enzimas, coenzimas, vitaminas e pigmentos, e consequentemente participando de processos como absorção iônica, fotossíntese, respiração,

multiplicação e diferenciação celular (CASTRO, 2007). Quanto ao meio de cultura, a formulação do meio MS por apresentar uma maior quantidade de nitrogênio, seja na forma de NH_4 e NO_3 , explica o seu maior acúmulo nas microcepas cultivadas neste meio (Tabela 13). No entanto, uma desvantagem que tem sido atribuída à utilização de altas concentrações de amônio ou sua utilização como única fonte de nitrogênio, no meio de cultura, é a indução da vitrificação, principalmente nas espécies arbóreas (CAPALDI, 2002), porém não foi observada neste experimento.

Tabela 13 - Média dos acúmulos de nitrogênio por explante de *E. globulus* em relação ao meio de cultura e ao clone

Meios de cultura	Clone		
	1	24	33
MS	42,64 Ab	61,19 Aab	59,05 Aa
JADS	41,69 Bb	43,18 Bab	50,16 Ba
WPM	34,23 Cb	31,85 Cab	36,30 Ca

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

O cálcio é um cátion bivalente (Ca^{+2}), constituinte estrutural da lamela média das células (MARSCHINER, 1995; BORGES et al., 1997; AMARAL, 2003; TREVISAM et al., 2011). Seus íons são considerados um modulador de muitas reações químicas e bioquímicas que ocorrem no desenvolvimento e crescimento de plantas, participando do funcionamento das membranas e da absorção iônica (MARSCHINER, 1986; MALAVOLTA et al., 1997). Para o teor de cálcio avaliado nas microcepas de *E. globulus*, não houve diferença para os clones 01 e 24, os quais apresentaram maior acúmulo deste nutriente nas microcepas (Tabela 14). O meio JADS foi o que apresentou maior valor dentre os outros meios, isso se justifica quando se analisa sua composição, pois a concentração de Ca fornecida é de $200,44 \text{ mg.L}^{-1}$ quase o dobro quando comparada ao WPM ($119,95 \text{ mg L}^{-1}$) e ao MS ($120,54 \text{ mg L}^{-1}$) (Tabela 14). No entanto, é um nutriente não tóxico, mesmo em altas concentrações, sendo muito eficiente em processos de desintoxicação à outros elementos presentes em doses elevadas nas plantas (TREVISAM et al., 2011). Em altas concentrações, o cálcio pode atingir mais de 10% do peso seco, em folhas adultas, por exemplo, sem que ocorram sintomas de toxicidade ou de inibição do crescimento da planta (GABRIEL, 2009).

Tabela 144 - Média dos acúmulos de cálcio por explante de *E. globulus* em relação ao meio de cultura e ao clone

Meios de cultura	Clone		
	1	24	33
MS	5,22 Ba	5,55 Ba	2,68 Bb
JADS	8,65 Aa	8,57 Aa	7,51 Ab
WPM	4,56 Ba	4,09 Ba	2,48 Bb

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Com relação ao fósforo, observou-se que seu acúmulo em microplantas cultivadas em meio JADS se destaca significativamente aos outros meios de cultura que não diferiram entre si. Esse resultado é esperado, já que o meio JADS possui em sua constituição maiores teores de fósforo, com 480 mg.L⁻¹ de KH₂PO₄, enquanto o WPM e o MS possuem 170 mg.L⁻¹, do mesmo composto. O clone 33 apresentou o maior acúmulo deste nutriente, demonstrando desta forma ser o clone mais eficiente para a absorção fósforo (Tabela 15). Trata-se de um elemento essencial para o crescimento das plantas e está envolvido na maioria dos processos metabólicos, uma vez que, é um componente integral de compostos como ésteres de carboidratos, fosfolipídios, coenzimas e ácidos nucleicos, além de estar envolvido em processos de armazenamento e transferência de energia e fixação simbiótica do nitrogênio (RAGHOTHAMA; KARTHIKEYAN, 2005; GABRIEL, 2009).

Tabela 155 - Média dos acúmulos de fósforo por explante de *E. globulus* em relação ao meio de cultura e clone

Meios de cultura	Clone		
	1	24	33
MS	3,9925 Cb	3,9500 Cb	5,8333 Ba
JADS	8,4425 Aa	8,3350 Aa	8,2025 Aa
WPM	5,8250 Bb	5,6245 Bb	6,2575 Ba

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Nota-se que, em relação ao elemento potássio, não houve diferença significativa para os meios JADS e WPM, independentemente dos clones avaliados. Dessa forma, apenas houve acúmulo desse nutriente nos clones 01 e 24 no meio MS. Apesar das concentrações de potássio serem diferentes em cada meio, esta não foi importante no acúmulo para os clones, não observando diferença entre eles, possivelmente devido ao potássio ser um íon monovalente, e por competir com elevadas concentrações de cátions divalentes, como o Ca⁺⁺ e o Mg⁺⁺, sofre inibição competitiva, ou seja, compete com desvantagem pelo mesmo sítio de absorção. Entretanto baixas concentrações de cálcio contribuem para sua absorção (efeito

sinérgico) (CORREIA, 2006) (Tabela 16). Este elemento é um dos cátions mais requerido nos processos fisiológicos das plantas não somente pela sua concentração nos tecidos vegetais, mas também pelas suas funções bioquímicas (LAVRES JÚNIOR, 2001). O seu requerimento considerado ótimo para o bom desenvolvimento das plantas está aproximadamente entre 2 a 5 % na matéria seca (MALAVOLTA, 1980), considerando as plantas de um modo geral. Tal nutriente tem ação fundamental no metabolismo vegetal, pelo papel que exerce na fotossíntese, síntese e translocação de carboidratos e síntese de proteínas, ativando mais de 60 enzimas que participam desses processos metabólicos (EPSTEIN, 1975; BARRETO; BEZERRA NETO, 2000).

Tabela 166 - Média dos acúmulos de potássio por explante de *E. globulus* em relação ao meio de cultura e clone

Meios de cultura	Clone		
	1	24	33
MS	29,2650 Aa	22,3800 Ab	15,5566 Bb
JADS	27,3525 Aa	24,4825 Aa	27,3525 Aa
WPM	26,0125 Aa	25,4375 Aa	29,6450 Aa

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Na constituição dos meios de cultura WPM e MS a concentração de magnésio é de 36,49 mg L⁻¹, sendo no entanto menor que a encontrada no meio JADS que é de 72,93 mg L⁻¹. Isso se reflete no acúmulo deste nutriente para os clones avaliados. Os clones 24 e 33 tiveram maiores acúmulos no meio JADS. Avaliando a significância existente entre os clones, percebe-se que o 01 não difere na absorção de magnésio nos três meios de cultura avaliados (Tabela 17). O magnésio está envolvido em processos como síntese orgânica, balanço eletrolítico e estabilidade dos ribossomos, além de ser ativador de muitas enzimas como, ATPases, RNA polimerases, fosfatases, carboxilases, entre outras (DING et al., 2006), participando também da organização das membranas dos tilacóides e atuando como um co-fator e ativador alostérico de enzimas envolvidas na fixação de CO₂ (HERMANS; VERBRUGGEN, 2004).

Tabela 177 - Média dos acúmulos de magnésio por explante de *E. globulus* em relação ao meio de cultura e clone

Meios de cultura	Clone		
	1	24	33
MS	1,3250 Aa	1,125 Bab	0,6666 Bb
JADS	1,8250 Aa	2,325 Aa	2,1250 Aa
WPM	1,1250 Aa	0,900 Bb	0,6750 Bc

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Em relação ao acúmulo de enxofre, o meio WPM diferiu significativamente dos demais quanto aos clones avaliados. Isso provavelmente se explica, por ser o único meio que possui duas fontes distintas deste nutriente, o K_2SO_4 e o $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Entretanto, quanto aos meios de cultura, as respostas foram diferenciadas para os clones avaliados, sendo que cada clone acumulou mais enxofre em um meio de cultura diferente (Tabela 18). O enxofre é um macronutriente, que nos vegetais participa da síntese de aminoácidos sulfurados (metionina, cisteína e cistina), proteínas, inclusive enzimas, e também é componente da coenzima A (CoA), participante do metabolismo de carboidratos e lipídeos (HAAG, 1984). Segundo Malavolta (1980), o enxofre está envolvido na formação da clorofila, na síntese de vitaminas como tiamina e biotina, e faz parte da ferredoxina, molécula responsável pela transferência de elétrons e que atua na fotossíntese, na fixação de nitrogênio atmosférico e na redução de compostos oxidados.

Tabela 18 - Média dos acúmulos de enxofre por explante de *E. globulus* em relação ao meio de cultura e clone

Meios de cultura	Clone		
	1	24	33
MS	4,2550 Cab	4,445 Ca	4,0766 Cb
JADS	5,8000 Ba	5,670 Ba	5,1250 Bb
WPM	7,1625 Ab	7,310 Ab	7,6450 Aa

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Avaliando as respostas dos acúmulos dos micronutrientes dos clones de *E. globulus* nos três meios utilizados, observou-se pela análise de variância dos dados amostrados que houve efeito significativo da interação entre clones e meio de cultura em relação aos teores de ferro e zinco. Por sua vez, para os teores de boro e cobre houve efeito significativo apenas para os fatores clones e meio de cultura, enquanto para os teores de manganês houve efeito significativo apenas para o fator clone (Tabela 19).

Tabela 19 - Resumo da análise de variância na fase de multiplicação *in vitro* para o teor de boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) em brotações de minicepas de três clones de *E. globulus* em três diferentes meios de cultura (MS, JADS e WPM)

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios				
		B (mg kg ⁻¹)	Cu ⁽¹⁾ (mg kg ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	Mn ⁽¹⁾ (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)
Clone (C)	2	330,82*	0,04*	1059*	0,20*	6503,6*
Meio de cultura(M)	2	1004,58*	9,18*	1520*	0,01 ^{ns}	30088,1*
C x M	4	86,93 ^{ns}	0,02 ^{ns}	3460*	0,01 ^{ns}	1544,0*
Resíduo	26	50,54	0,01	4307	0,02	103,2
Média	-	47,99	2,15	585,07	5,10	127,39
CV _{exp} (%)	-	14,81	4,65	11,22	2,77	7,97

* = F significativo a 5% de probabilidade e ^{ns} = F não-significativo a 5% de probabilidade; ⁽¹⁾ Dados transformados por log(x+1); G.L. = graus de liberdade; CV_{exp}(%) = coeficiente de variação experimental.

Pode-se observar que o boro foi significativo em relação aos clones, sendo o clone 24 o que apresentou maior acúmulo (Tabela 20). Quanto aos meios de cultura, a resposta foi a esperada, pois o meio JADS diferiu significativamente dos demais por possuir menores teores de acúmulo do nutriente, fato este que se explica, por possuir em sua constituição menor quantidade de H₃BO₃ (3,1 mg.L⁻¹) (Tabela 20). Na célula vegetal, o boro participa da divisão celular, aumento no tamanho das células, transporte de carboidratos da folha para outros órgãos (MALAVOLTA, 1980) e atua como agente morfogenético (SPURR, 1957).

Tabela 20 - Média dos acúmulos de boro por explante de *E. globulus* em relação ao meio de cultura e ao clone

Meios de cultura	Clone		
	1	24	33
MS	53,06 Ab	67,97 Aa	53,98 Aab
JADS	31,94 Bb	44,58 Ba	42,56 Bab
WPM	42,70 Bb	46,42 Ba	50,22 Bab

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Para o acúmulo de cobre, observa-se que o clone 33 é o mais exigente, enquanto o 01 e 24 não diferem significativamente (Tabela 21). As respostas obtidas quanto ao meio de cultura já eram esperadas, pois a constituição dos meios disponibiliza quantidades proporcionais ao resultado, em que o meio JADS difere significativamente como o que mais disponibilizou cobre, tendo em sua constituição, 1,25 mg.L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O, seguido de 0,25 mg.L⁻¹ do meio WPM e 0,025 mg.L⁻¹ do meio MS (Tabela 21). O cobre é um micronutriente essencial às plantas, encontra-se predominantemente no cloroplasto, sendo um cofator de várias enzimas, tais como superóxido dismutase (SOD), citocromo oxidase, amino

oxidase, lacases, plastocianinas e polifenol oxidase, também atuando, em nível molecular, na sinalização da transcrição, na fosforilação oxidativa e na mobilização de ferro (MARSCHNER, 1986; MENGEL; KIRKBY, 1987; FERREIRA; CRUZ, 1991; SANTOS, 1996).

Tabela 181 - Média dos acúmulos de cobre por explante de *E. globulus* em relação ao meio de cultura e ao clone

Meios de cultura	Clone		
	1	24	33
MS	2,25 Cb	2,62 Cb	3,00 Ca
JADS	18,88 Ab	21,38 Ab	21,38 Aa
WPM	7,00 Bb	6,12 Bb	7,00 Ba

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

O acúmulo de ferro foi maior nas microcepas de *E. globulus* cultivadas no meio de cultura JADS, independentemente do clone, apesar de não diferir quanto ao meio WPM e MS para os clones 01 e 33, respectivamente. Resultado esperado, já que o JADS é o que possui maior quantidade de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $55,6 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto o WPM e o MS possuem $27,8 \text{ mg.L}^{-1}$. Já para o clone 33, não houve diferença entre os meios para o acúmulo deste nutriente (Tabela 22). Em plantas, o ferro está relacionado a diversas atividades metabólicas, participando da formação de algumas enzimas (catalase, peroxidase, citocromo oxidase e xantina oxidase), além de ser indispensável nos processos de respiração, fotossíntese, fixação de N_2 e transferência de elétrons através do ciclo entre o Fe^{2+} e Fe^{3+} (GUERINOT; YI, 1994; MARENCO; LOPES, 2009).

Tabela 192 - Média dos acúmulos de ferro por explante de *E. globulus* em relação ao meio de cultura e clone

Meios de cultura	Clone		
	1	24	33
MS	335,88 Bc	511,38 Bb	711,67 Aa
JADS	638,13 Ab	738,25 Aab	782,88 Aa
WPM	544,00 Aab	443,25 Bb	591,88 Ba

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

O manganês tem papel importante no metabolismo das plantas, atuando como ativador de enzimas, síntese de clorofila e fotossíntese (FAGERIA, 2001). A disponibilidade do manganês nos três meios de cultura é a mesma, tanto do elemento, em que os meios

disponibilizam 5,493 mg.L⁻¹, quanto da solução nutritiva, 16,9 mg.L⁻¹ de MnSO₄.H₂O, fato que explica não haver efeito significativo entre os meios de cultura. Por outro lado, os clones 01 e 24 acumularam maiores teores desse nutriente (Tabela 23).

Tabela 203 - Média dos acúmulos de manganês por explante de *E. globulus* em relação ao meio de cultura e ao clone

Meios de cultura	Clone		
	1	24	33
MS	183,50 Aa	190,38 Aa	134,83 Ab
JADS	163,88 Aa	178,25 Aa	140,50 Ab
WPM	180,12 Aa	167,88 Aa	142,75 Ab

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

O acúmulo de zinco em todos os clones foi maior no meio de cultura WPM, não havendo diferença entre os meios para o clone 01. Contudo, o clone 33 apresentou um comportamento diferenciado quanto aos meios de cultura, não havendo diferença no acúmulo deste nutriente (Tabela 24). As funções mais conhecidas do zinco nas plantas são: participação na síntese do AIA (ácido indolacético); importante para o RNA, pois inibe a RNase que hidrolisa o RNA; redução de nitrato a nitrito, oxidases e outras (MALAVOLTA et al., 1997).

Tabela 214 - Média dos acúmulos de zinco por explante de *E. globulus* em relação ao meio de cultura e clone

Meios de cultura	Clone		
	1	24	33
MS	124,63 Ab	121,00 Bb	161,00 Ba
JADS	77,50 Aab	63,38 Cb	84,13 Ca
WPM	139,00 Ab	160,88 Ab	223,38 Aa

Médias seguidas por mesma letra maiúscula nas colunas e nas linhas seguidas por mesma letra minúscula, não diferem significativamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

Como complementação às análises nutricionais, adicionalmente, quantificou-se o peso da matéria seca das microcepas. Pela análise de variância dos dados amostrados observou-se que houve efeito significativo da interação entre clones e meio de cultura em relação aos valores médios de peso de matéria seca de microcepas (Tabela 25).

Tabela 225 - Resumo da análise de variância na fase de multiplicação *in vitro* para os valores médios de peso de matéria seca de microcepas (MS) de três clones de *E. globulus* em três diferentes meios de cultura no decorrer de 10 subcultivos

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios
		MS
Clone (C)	2	0,0046379**
Meio de cultura (M)	2	0,0011501**
C x M	4	0,0019196**
Resíduo	33	0,0001893
Total	41	

* e ** valor significativo em nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F.

^{ns} = F não-significativo a 5% de probabilidade; G.L. = graus de liberdade; CV = 14,08 %.

Os resultados referentes ao peso de matéria seca (g) demonstraram que para o meio WPM os clones 01 e 33 foram superiores, por sua vez, as respostas dos clones para cada meio de cultura foram diferenciadas, revelando uma correlação entre peso de matéria seca e nutrição (Tabela 26).

Tabela 26 - Valores médios de peso de matéria seca na fase de multiplicação *in vitro* de microcepas de três clones de *E. globulus* cultivadas em três diferentes meios de cultura no decorrer de 10 subcultivos

Clones	Meios		
	JADS	MS	WPM
1	0,099 Aa	0,119 Aa	0,100 Ba
24	0,083 Ac	0,106 Ab	0,140 Aa
33	0,083 Aa	0,066 Ba	0,079 Ba

Letras maiúsculas iguais nas colunas (verticais) indicam médias iguais, pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas iguais nas linhas (horizontal) indicam médias iguais, pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro

Para os materiais genéticos testados, o meio de cultura MS demonstrou ser o meio de cultura, dentre os avaliados, o que apresentou menor formação e desenvolvimento de tufos (microcepas), apresentando brotações cloróticas e necrosadas. Entretanto, Borges et al. (2011a) obtiveram maiores taxas de multiplicação de clones híbridos de *E. globulus* com o meio MS, caracterizando, dessa forma, elevada variabilidade existentes entre os diferentes genótipos da espécie. Da mesma forma, o meio de cultura JADS apresentou resultados satisfatórios somente para o clone 24, com melhor taxa de multiplicação. Todavia, o meio JADS proporcionou maior manifestação de microrganismos endofíticos, provavelmente, por estar relacionado às diferentes relações nutricionais dos meios de cultura avaliados e por possuir alta concentração de vitaminas, a qual pode ter favorecido o crescimento exponencial de linhagens endofíticas.

Diante disso, o meio de cultura WPM mostrou ser o mais adequado, em comparação aos meios MS e JADS, para a fase de multiplicação de gemas axilares em explantes de *E. globulus*. Esta resposta provavelmente deve-se ao fato do meio de cultura WPM ter sido desenvolvido especialmente para o cultivo de espécies florestais lenhosas. Assim, apesar das maiores concentrações de nutrientes nos meios de cultura MS e JADS, o balanço nutricional no meio de cultura WPM foi mais adequado para a multiplicação das microcepas de *E. globulus* nos clones avaliados. Resultados satisfatórios também foram encontrados para o cultivo *in vitro* de *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* (GLOCKE et al., 2006), *Eucalyptus globulus* (PINTO et al., 2008) e *Eucalyptus camaldulensis* (DIBAX et al., 2010), porém, ainda é pouco usado na micropropagação de *Eucalyptus*.

A multiplicação *in vitro* de gemas de *E. globulus* é um processo extremamente genótipo dependente. No presente trabalho, observou-se que o clone 33 foi superior aos demais quanto a multiplicação *in vitro* em relação às avaliações realizadas. Esse clone demonstrou ser mais exigente nutricionalmente, tendo maiores acúmulos de nitrogênio, fósforo, magnésio, cobre, ferro e zinco nas microcepas. Ao correlacionar o peso da matéria seca com o acúmulo de nutrientes, o clone 33 demonstrou ser mais exigente, uma vez que, apresentou menores valores médios de matéria seca para um alto acúmulo de nutrientes. Esse resultado demonstrou a eficiência deste clone, quanto a utilização destes nutrientes para a produção de um elevado número de brotações. Contudo, a resposta ao tipo e composição do meio de cultura varia não somente de acordo com a espécie, mas entre genótipos de uma mesma espécie e até entre explantes de um mesmo genótipo, que apresentam demandas específicas (SOUZA et al., 2006). Correia et al. (1995) verificaram a importância da especificidade do meio de cultura para cada material genético, quando se deseja a proliferação de gemas com uniformidade e vigor.

Contudo, clones são cópias genéticas nucleares, com possíveis variações epigenéticas, citoplasmáticas e fenotípicas (SMITH; MURPHY, 2004). As variações fenotípicas decorrentes da clonagem podem ser explicadas levando-se em conta os efeitos do ambiente, das linhagens maternas utilizadas como doadores de citoplasma (BRUGGERHOFF et al., 2002; TAMASSIA et al., 2004), e os mecanismos epigenéticos (JOHNSON, 2005). Desta forma, considerando os resultados obtidos neste trabalho, pode-se inferir que a nutrição mineral no cultivo *in vitro* remete a respostas diferenciadas dependendo do material genético utilizado. A variabilidade existente dentro de uma mesma espécie provavelmente se comprova pela significância de mecanismos epigenéticos que se destacam quando cultivados em meios

de cultura distintos na composição dos sais, alterando desta maneira a resposta dos clones ao desenvolvimento requerido (ALMEIDA, 2012).

5.1.3 Alongamento

Houve interação ($p < 0,05$) entre os fatores testados para as características do número médio de brotações (NB) e número médio de brotações alongadas por explante (NBA). Sendo assim, a análise de variância dos dados amostrados revelou efeito significativo da interação entre clones e tratamentos em relação ao número de brotações por explante. Por sua vez, para o número de brotações alongadas houve efeito significativo apenas para o fator tratamento (Tabela 27).

Tabela 27 - Resumo da análise de variância para as características do número médio de brotações (NB) e número médio de brotações alongadas (NBA) de três clones de *E. globulus*, em função das diferentes concentrações de BAP e ANA no alongamento *in vitro* após 42 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura WPM

Fonte de Variação	G.L.	Quadrados Médios	
		(NB) ¹	(NBA) ²
Clone (C)	2	9,557*	0,029 ^{ns}
Tratamento (T)	11	8,272*	0,871*
C x T	22	1,526*	0,073 ^{ns}
Resíduo	324	0,486	0,099
Total	359	-	-
Média	-	5,125	0,365
CV (%)	-	13,6	86,1

^{ns} e * não significativo e significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente;

¹ dados transformados por $\sqrt{x+0,1}$; ² dados transformados por $\ln(x+1)$.

GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental.

Com relação ao número de brotações de *E. globulus* cultivados *in vitro*, os resultados evidenciam a necessidade da elevação da concentração de BAP no meio de cultura para todos os clones, onde se observa que as melhores médias ocorreram nas maiores concentrações de BAP, evidenciando um maior vigor fisiológico dos explantes na presença do mesmo (Tabela 28).

Tabela 2823 - Valores médios do número de brotações de três clones de *E. globulus*, em função das diferentes concentrações combinadas de BAP e ANA no alongamento após 42 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura WPM

BAP (mg.L ⁻¹)	ANA (mg.L ⁻¹)	Clones		
		1	24	33
0,00	0,00	14,3 abC	14,8 aBC	10,2 bD
0,00	0,10	14,7 aBC	8,1 bC	10,8 abD
0,00	0,20	17,0 aBC	21,1 aAB	10,9 bD
0,00	0,30	15,2 bBC	22,8 aAB	13,4 bCD
0,05	0,00	21,0 abBC	28,1 aA	17,3 bABC
0,05	0,10	23,0 aABC	19,3 aAB	21,6 aAB
0,05	0,20	22,5 abABC	28,5 aA	15,2 bBCD
0,05	0,30	17,2 bBC	23,1 aAB	18,8 abABC
0,10	0,00	24,7 aAB	22,8 aAB	20,7 aAB
0,10	0,10	22,0 aABC	25,0 aAB	20,0 aABC
0,10	0,20	24,1 aABC	25,3 aA	21,2 aAB
0,10	0,30	32,9 aA	21,5 bAB	23,4 bA

* Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula, entre os tratamentos e um mesmo clone, e as seguidas de uma mesma letra minúscula dentro de cada tratamento não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De uma maneira geral, a adição de BAP ao meio de cultura foi benéfica para o alongamento, promovendo a sobrevivência dos explantes e um percentual razoável de alongamento de brotações (Fig. 11).

Figura 11 - Detalhe do alongamento das brotações de *E. globulus* aos 42 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura WPM na presença (A) e ausência (B) de BAP. Barra = 1 cm

O alongamento das brotações de *E. globulus* foi constatado apenas para os meios de cultura na presença de BAP, sendo que os melhores resultados para o número de brotações alongadas por explante acima de 1 cm, foram constatados na concentração de 0,1 mg L⁻¹ de BAP (Tabela 29).

Tabela 2924 - Valores médios dos três clones de *E. globulus* para o número de brotos alongados em função das diferentes concentrações combinadas de BAP e ANA no alongamento após 42 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura WPM

ANA (mg L ⁻¹)	BAP ----- (mg L ⁻¹) -----		
	0,00	0,05	0,10
0,00	0,00 c	0,00 c	0,46 ab
0,10	0,00 c	0,04 c	0,52 a
0,20	0,00 c	0,00 c	0,14 bc
0,30	0,00 c	0,02 c	0,45 ab

* Médias seguidas de uma mesma letra minúscula dentro de cada tratamento não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Conforme os resultados do pré-teste de alongamento descrito anteriormente, em sequência apresenta-se a análise de variância dos dados amostrados no segundo experimento de alongamento de *E. globulus*. Houve efeito significativo apenas para número de brotações e número de brotações alongadas por explante, para os fatores clone e tratamento (Tabela 30).

Tabela 250 - Resultados da análise de variância do número de brotações alongadas por explante (NBA), comprimento das brotações (CB), número de nós das brotações alongadas (NNBA) de *E. globulus*, em função dos tratamentos testados em 63 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura WPM

Fonte de variação	G.L.	Quadrados Médios		
		NBA ⁽¹⁾ (expl ⁻¹)	CB (cm)	NNBA ⁽¹⁾
Clone (C)	2	0,53*	0,03 ^{ns}	0,05 ^{ns}
Tratamentos (T)	2	0,64*	0,23 ^{ns}	0,39 ^{ns}
C x T	4	0,08 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,23 ^{ns}
Resíduo	351	0,15	0,15	0,23
Média	-	1,11	0,60	1,08
CV _{exp} (%)	-	34,89	65,00	44,41

* = F significativo a 5% de probabilidade e ^{ns} = F não-significativo a 5% de probabilidade;

⁽¹⁾ Dados transformados por log(x+2);

G.L. = graus de liberdade; CV_{exp}(%) = coeficiente de variação experimental; expl⁻¹ = explante.

No alongamento *in vitro* observou-se diferença entre os clones quanto ao número de brotações alongadas, sendo as melhores médias encontradas para os clones 01 e 24. De maneira geral, para esses clones obteve-se em torno de 1,2 brotações alongadas por explante (Fig. 12).

Figura 12 - Número médio de brotações alongadas por explante de três clones de *E. globulus* aos 63 dias de subcultivo em meio de cultura WPM. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro

Pode-se verificar certa recalcitrância do genótipo 33 quanto ao alongamento *in vitro*, diferentemente do observado da fase de multiplicação, este clone apresentou números reduzidos de brotações alongadas e, também, médias de comprimento inferiores aos demais genótipos (Fig. 13).

Figura 13 - Detalhe do alongamento das brotações de *E. globulus* aos 63 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura WPM. (A) clone 01; (B) clone 24; (C) clone 33. Barra = 0,5 cm

Em relação as concentrações combinadas de BAP e ANA, o melhor resultado obtido para o número médio de brotações alongadas para todos os clones foi de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, em que o número médio de brotações alongadas foi de 1,2 (Fig. 14).

Figura 14 - Número médio das brotações alongadas de três clones *E. globulus* aos 63 dias de subcultivo em meio de cultura WPM em três diferentes tratamentos (T1 = 0,1 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA; T2 = 0,1 mg L⁻¹ de BAP e 0,2 mg L⁻¹ de ANA; T3 = 0,1 mg L⁻¹ de BAP e 0,3 mg L⁻¹ de ANA). Médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro

Efeitos semelhantes foram constatados por Brondani et al. (2009), que obteve a melhor resposta quanto ao número de brotações alongadas de *E. benthamii* x *E. dunnii* em meio de cultura suplementado com concentrações entre 0,25 e 0,75 mg L⁻¹ de ANA e 0,05 mg L⁻¹ de BAP, sendo estimada a concentração de 0,49 mg L⁻¹ de ANA para obtenção do maior número de brotações alongadas com comprimento médio de 2,4 cm, aos 60 dias após a inoculação.

Comportamento parecido ao exposto foi encontrado por Carvalho (1988), trabalhando com *E. grandis* em meio de cultura sólido suplementado com 0,05 mg L⁻¹ de BAP e 0,01 mg L⁻¹ de ANA. A melhor resposta quanto a altura média das brotações foi de 10 mm aos 30 dias de alongamento *in vitro*.

Em estudos com *E. urophylla*, Santos et al. (2004) observaram que a combinação de 0,1 mg L⁻¹ de AIB e 0,1 mg L⁻¹ de BAP resultou nos melhores efeitos para o alongamento das brotações. De maneira semelhante, Oliveira (2011) obteve os melhores resultados para o alongamento *in vitro* de híbridos de *E. globulus* utilizando 0,25 a 1,00 mg L⁻¹ de AIB e 0,05 mg L⁻¹ BAP. Já, para Sotelo e Monza (2007), o *E. globulus* sub. *Maidenii*, em tratamento com 0,1 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de AIB foi o que melhor promoveu o alongamento das brotações.

Desta forma, considerando o número de brotações alongadas dos clones em meio de cultura WPM, os resultados demonstraram a viabilidade da utilização do ANA no alongamento *in vitro* destes clones de *E. globulus*. Novos estudos buscando definir melhores

ajustes para a micropropagação *E. globulus* são imprescindíveis para maximizar os resultados obtidos.

5.1.4 Enraizamento *in vitro*

O enraizamento *in vitro* dos clones 01, 24 e 33 não foi bem sucedido em nenhuma das concentrações de BAP e AIB avaliadas. Obteve-se somente uma raiz na concentração 0,5 mg L⁻¹ de AIB no clone 01. Em decorrência disso, não foram efetuadas análises estatísticas, sendo apenas descritos os resultados observados, acompanhados pela anatomia da raiz adventícia desenvolvida.

Entre os principais fatores relacionados ao enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*, encontram-se os níveis de auxina endógena, as condições inerentes à planta matriz como juvenilidade e genótipo, além do meio de cultura, a presença de reguladores de crescimento e carboidratos, a nutrição mineral, a presença de poliaminas e substâncias como carvão ativado e compostos fenólicos, as condições ambientais de crescimento das plântulas *in vitro*, dentre outros (SOUZA; PEREIRA, 2007).

Pela análise histológica da raiz emitida da brotação de *E. globulus* pode-se observar que a mesma teve origem calogênica, determinando organogênese indireta (Fig. 15).

Figura 15 - Secções transversais sucessivas da base caulinar de *E. globulus* evidenciando a rizogênese indireta aos 42 dias em meio de cultura WPM suplementado com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB. A. Presença de células calogênicas (CC) sem conexão vascular com a base caulinar. B. Detalhe das células calogênicas isodiamétricas. C. Diferenciação das células calogênicas em centros meristemáticos (CM). D. Detalhe dos centros meristemáticos (setas). E. Corte transversal de raiz adventícia provenientes da organogênese indireta, evidenciando medula (Me) e cilindro vascular (VC). F. Detalhe da raiz adventícia

De acordo com Xavier et al. (2009), resultados satisfatórios para o enraizamento via microestaquia de *Eucalyptus* tem sido obtidos após 10 e 12 subcultivos por meio da técnica de micropropagação para clones de *E. urophylla*, *E. grandis* e seus híbridos. No entanto, para os clones de *E. globulus* avaliados no presente estudo, cujos números de subcultivos *in vitro* variaram de 10 a 14, não se observou resultados suficientes para o enraizamento das microestacas.

Segundo Mankessi et al. (2009) flutuações na capacidade rizogênica é possível ocorrer mesmo entre genótipos estreitamente aparentados, de acordo com um determinismo endógeno. A variabilidade na rizogênese entre os genótipos são intrinsecamente relacionados a ritmos endógenos da planta e não por meio de um controle genético (McCOWN, 2000). Portanto, a interação e relação entre citocinina e auxina na etapa de multiplicação *in vitro* e suas respectivas concentrações atuam em diferentes níveis endógenos afetando diversas rotas metabólicas, explicando assim as diferenças encontradas para os materiais genéticos estudados quanto ao rejuvenescimento promovido pela micropropagação. Outro fator que pode ter causado o baixo enraizamento é o pequeno comprimento das brotações, em que estas poderão apresentar reduzido percentual de enraizamento se forem diretamente cultivadas em meios de enraizamento, ou dar origem a mudas de baixa qualidade para a fase de aclimatização (SILVA, 2004).

Além disso, as análises histológicas evidenciaram o desenvolvimento indireto da raiz adventícia formada, ou seja, a partir de células do calo desenvolvido na base da microestaca, o que pode representar um sério problema na fase de amadurecimento da planta formada, repercutindo em tombamento por não formar um sistema radicular devidamente aderido à parte aérea da mesma.

Contudo, a fase de enraizamento é uma das mais importantes em espécies florestais, especialmente em espécies como *E. globulus*, que apresentam grande recalcitrância ao enraizamento, evidenciando que ajustes se fazem necessários a esta fase, para que se desenvolva um protocolo eficiente ao enraizamento.

6 CONCLUSÃO

Para o controle da contaminação fúngica e bacteriana em segmentos caulinares de *E. globulus* recomenda-se a imersão em hipoclorito de sódio a 1,0% durante 5 minutos.

A multiplicação *in vitro* de gemas de *E. globulus* é um processo extremamente regulado pela composição do meio e concentração de regulador de crescimento, em que as melhores respostas foram obtidas em meio de cultura WPM suplementado com 0,7 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA. Além disso, houve variações entre genótipos, sendo o clone 33 superior aos demais quanto ao número de brotações.

O alongamento de brotações depende do material genético e regulador de crescimento. Os melhores resultados foram obtidos em meio de cultura WPM suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de BAP e 0,3 mg L⁻¹ de ANA.

No meio nutritivo WPM, a adição de AIB não teve efeito no enraizamento *in vitro* de microestacas de *E. globulus*, dessa maneira, o número de subcultivos na micropropagação não foi suficiente para promover o rejuvenescimento de forma significativa dos clones de *E. globulus*, e apesar de mostrar-se viável, não foi observado enraizamento expressivo das microestacas para as características avaliadas.

O presente trabalho forneceu fundamentação científica para a propagação *in vitro*, e auxiliará o desenvolvimento de protocolos de micropropagação para *Eucalyptus globulus*.

REFERÊNCIAS

- ABREU-TARAZI, M.F.; NAVARRETE, A.A.; ANDREOTE, F.D.; ALMEIDA, C.V.; TSAI, S.M.; ALMEIDA, M. Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 26, p. 555-560, 2010.
- ALABADÍ, D.; BLÁZQUEZ, M.A. Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 409-417, 2009.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442 p.
- ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.D.; YARA, R.; TANAKA, F.A.O.; AZEVEDO, J.L.; ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, p. 1757-1764, 2009.
- ALMEIDA, L.V. **Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K.D.Hill & L.A.S.Johnson**. 2012. 107 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- ALMEIDA NETO, D., TAVARES, S. Translocação de hormônios vegetais. In: CAMARGO E CASTRO, P.R.; ALVES DE SENA, J.O.; KLUGE, R.A. **Introdução a fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. p. 123-137.
- AMARAL, A.F.C. **Comportamento *in vitro* de explantes de matrizes de cenoura (*Daucus carota* L.) tratadas com variáveis níveis de potássio**. 2003. 103 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- AMARAL, V.F.M. **Multiplicação *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell**. 2006. 60 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- ANDRADE, A.M.; GOMES, S.S. Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 181-189, 2000.
- ANDRADE, E.N. **O eucalipto**. 2. ed. São Paulo: Companhia Paulista de Estradas de Ferro, 1961. 667 p.
- ANDRADE, G.C.; SILVA, H.D.; BELLOTE, A.F.J.; FERREIRA, C.A. Efeitos da adubação fosfatada e da aplicação de resíduo de celulose no crescimento de *Eucalyptus dunnii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 47, p. 43-54, 2003.
- ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemão). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, jan./mar. 2000.

ANDRADE, W.F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A.N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.

ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; AZEVEDO, J.L. Diversidade molecular de microorganismos endofíticos. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SILVA SANTOS, C.E.R. **Microorganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. p. 233-258.

ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI, W. JR.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, p. 169-173, 2004.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1985. 355 p.

ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.JR.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4906-4914, 2002.

ARDANOV, P.; OVCHARENKO, L.; ZAETS, I.; KOZYROVSKA, N.; PIRTILÄ, A.M. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Biological Control**, Amsterdam, v. 56, p. 43-49, 2011.

ASSIS, T.F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, 1997. v. 1, p. 300-304.

ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CNPH, 1998. p. 261-296.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF: ano base 2011**. Brasília, 2012. 120 p.

BANDEL, G. **Desenvolvimento e diferenciação em plantas**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Genética, 1979. 159 p. (Publicação Didática).

BATAGIN-PIOTTO, K.D. **Avaliação da atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage**. 2013. 157 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

BARRELA, R.J.M.B.M. **Identificação e sequenciação de genes da via da lenhificação em bibliotecas BAC de *Eucalyptus globulus***. 2011. 85 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

BARRETO, L.P.; BEZERRA NETO, E. **O potássio no metabolismo vegetal**. Recife: UFRPE, 2000. 58 p.

BARRUETO CID, L.P. Citocininas. In: _____. (Org.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 55-81.

BENNETT, I.J.; McCOMB, J.A.; TONKIN, C.M.; McDAVID, D.A.J. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. **Annals of Botany**, London, v. 74, n. 1, p. 53-58, 1994.

BENSON, E.E. Special symposium: *in vitro* plant recalcitrant. Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? **In Vitro Cell Development Biology Plant**, Dundee, v. 36, p. 163-170, 2000.

BISHT, P.; SHARMA, V.K.; JOSHI, I.; KAPOOR, M.L. Micropropagation of newly produced F1 hybrid of *Eucalyptus* (*E. tereticornis* Sm. x *E. camaldulensis* Dehn. Southern Form). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 48, n. 2, p. 104-108, 1999.

BOLAND, D.J.; CHIPPENDALE, G.M.; BROOKER, M.I.H.; HYLAND, B.P.M.; HALL, N. **Forest trees of Australia**. Melbourne: Nelson/CSIRO, 1984. 687 p.

BONGA, J.M.; VON ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Amsterdam: Kluwer Academic, 1992. 236 p.

BORGES, A.L.; SILVA, J.T.A. da; OLIVEIRA, S.L. de. Adubação nitrogenada e potássica para a cv. “Prata Anã”: produção e qualidade dos frutos no primeiro ciclo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 19, n. 2, p. 179-184, 1997.

BORGES, S.R. **Micropropagação e enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus***. 2009. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.; LOPES, A.P.; OTONI, W.C. Multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n.2, p. 173-182, 2011a.

BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.; MELO, L.A.; ROSADO, A.M. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 3, p. 425-434, 2011b.

BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.; LOPES, A.P.; OTONI, W.C.; TAKAHASHI, E.K.; MELO, L.A. Estabelecimento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 605-616, 2012.

BRAGA, N.C. **Os óleos essenciais no Brasil**: estudo econômico. Rio de Janeiro: Instituto de Óleos, 1971. 158 p.

BRITO, G.J.M.; CASTRO, P.R.C. Biossíntese de citocininas, ácido abscísico e etileno. In: CAMARGO E CASTRO, P.R.; ALVES DE SENA, J.O.; KLUGE, R.A. **Introdução a fisiologia do desenvolvimento vegetal**, Maringá: Eduem, 2002. p. 63-78.

BRITO, J.P.; OLIVEIRA, J.E.M.; BORTOLI, S.A. Toxicidade de oleos essenciais de *Eucalyptus* spp. Sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 6, n. 1, p. 96-103, 2006.

BRONDANI, G.E. **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2008. 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BRONDANI, G.E.; HANSEL F.A.; DUTRA, L.F.; WENDLING, I. Desinfestação e meio de cultura para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Liquidambar styraciflua*. **Floresta**, Curitiba, v. 40, n. 3, p. 541-554, 2010.

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.

BRONDANI, G.E.; GROSSI, F.; DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; HANSEL, F.A. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 4, p. 655-663, 2011.

BRUGGERHOFF, K.; ZAKHARTCHENKO, V.; WENIGERKIND, H.; REICHENBACH, H.D.; PRELLE, K.; SCHERNTHANER, W.; ALBERIO R.; KUCHENHOFF, H.; STOJKOVIC, M.; BREM, G.; HIENDLEDER, S.; WOLF, E. Bovine somatic cell nuclear transfer using recipient oocytes recovered by ovum pickup: effect of maternal lineage of oocyte donors. **Biology of Reproduction**, New York, v. 66, p. 367-373, 2002.

BUNN, E.; SENARATNA, T.; SIVASITHAMPARAM, K.; DIXON, K.W. *In vitro* propagation of *Eucalyptus phylacis* L. Johnson and K. Hill., a critically endangered relict from Western Australia. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 41, n. 6, p. 812-815, 2005.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, SPI; Embrapa, CNPH, 1998. v. 1, p. 87-132.

CALDERÓN-BALTIERRA, X.V. Influencia del calcio y ácido giberélico en el alargamiento de brotes adventício *in vitro* de *Eucalyptus globulus*. **Bosque**, Valdivia, v. 15, n. 1, p. 33-38, 1994.

CAPALDI, F.R. **Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio em explantes de *Criptomeria japonica* D. Don. “Elegans” cultivados in vitro: análises bioquímicas e relações entre reguladores vegetais**. 2002. 65 p. Dissertação (Mestrado em Silvicultura e Manejo Florestal) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

CARDOSO, G.V. **Otimização do cozimento Kraft para produção de celulose a partir de madeiras de *Eucalyptus globulus* com diferentes teores de lignina**. 2002. 147 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.

CARVALHO, D. de. **Micropropagação de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden através da cultura “*in vitro*” de segmentos nodais**. 1988. 75 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1988.

CASTRO, A.C.R. **Deficiência de macronutrientes em Helicônia ‘Golden Torch’**. 2007. 102 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

CASTRO, P.R.C.; VIEIRA, E.L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. 132 p.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2005. 650 p.

CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, W.M.; PRATES, H.T.; LEITE, R.C.; FURLONG, J.; FORTES, I.C.P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp. em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.

CHAPERON, H. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: SIMPÓSIO SOBRE SILVICULTURA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO DE ESPÉCIES FORESTALES, 1987, Buenos Aires. **Annales...** Buenos Aires: AFOCEL, 1987. v. 1, p. 215-232.

COMÉRIO, J.; XAVIER, A.; IANELLI, C. Microestaquia: um novo sistema de produção de mudas de *Eucalyptus* na Champion. In: ENCONTRO TÉCNICO FLORESTAL, 7., 1996, Belo Horizonte. **Anais...** Piracicaba: ABRACAVE, 1996.

COOKE, T.J.; POLI, D.B.; SZTEIN, A.E.; COHEN, J.D. Evolutionary patterns in auxin action. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 49, n. 3/4, p. 319-338, 2002.

CORREIA, D. **Macronutrientes, aspectos nutricionais e bioquímicos no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* *in vitro***. 2006. 175 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.Y.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 48/49, p. 107-116, 1995.

DAVEY, M.R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture: essential methods**. Singapore: Markono Print Media Pte., 2010. 341 p.

DAVIES, P.J. **Plant hormones, physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. 833 p.

DEL PONTE, E.M.; MATTEI, V.L.; PETERS, J.A.; ASSIS, T.F. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2001.

DIBAX, R.; QUISEN, R.C.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and histological study of organogenesis in vitro. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 311-318, 2010.

DING, Y.; LUO, W.; XU, G. Characterization of magnesium nutrition and interaction of magnesium and potassium in rice. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 149, p. 111-123, 2006.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 49-59, 2009.

DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do porta-enxerto de videira '420-A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 759-764, 2002.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; WYK, G. V. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon, 1994. p. 228-246.

EPSTEIN, E. **Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas**. São Paulo: EDUSP, 1975. 344p.

EVANS, J. **Plantation forestry in the tropics**. Oxford: Clarendon Press, 1993. 403 p.

FAGERIA, V.D. Nutrient interactions in crop plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, p. 1269-1290, 2001.

FANTINI JUNIOR, M.; GRAÇA, M.E.C. Propagação *in vitro* de *Eucalyptus saligna*. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. **Anais...** São Paulo: Soc. Brasileira de Silvicultura, 1990. p. 373-378.

FERNANDEZ-GARCIA, N.; GARMA, J.G.; OLMOS, E. ROS as biomarkers of hiperhydricit. In: GUPTA, D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. London: Sciences Publishers, 2011. chap. 12, p. 249-272.

FERREIRA, A.; QUECINE, A.C.; LACAVA, P.T.; ODA, S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans* W.L 15. **Microbiology Letters**, Oxford, v. 287, n. 1, p. 8-14, 2008.

FERREIRA, G.W.; GONZAGA, J.V.; FOELKEL, C.E.B.; ASSIS, T.F.; RATNIEKS, E.; SILVA, M.C.M. Qualidade da celulose kraft-antraquinona de *Eucalyptus dunnii* plantado em cinco espaçamentos em relação ao *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 7, n. 1, p. 41-63, 1997.

FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P. **Micronutrientes na agricultura**. Piracicaba: Potafos; CNPq, 1991. 734 p.

FICK, T.A. **Estabelecimento *in vitro* e propagação de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (louro-pardo)**. 2007. 61 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

FOELKEL, C. As plantações de florestas no Brasil. In: BORÉM, A. (Ed.) **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 13-24.

FOELKEL, C.E.B.; BARRICHELO, L.E.G.; MILANEZ, A.F. Estudo comparativo das madeiras de *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus paniculata*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus maculata*, *Eucalyptus tereticornis* para a produção de celulose sulfato. **IPEF**, Piracicaba, v. 10, n. 1, p. 17-37, 1975.

GABRIEL, M.V. **Otimização da multiplicação de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. in vitro**. 2009. 101 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GAMBORG, L.; SHYLUCK, J.P. Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures In: THORPE, T.O. **Plant tissue culture methods and applications in agriculture**. New York: Academic Press, 1981. p. 21-44.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. 2nd ed. Edington: Exegetics, 1993. v. 1, 574 p.

GEORGE, E.F.; DEBERGH, P.C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E.F.; HALL, A.M.; DE KLERK, G.J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 29-64.

GIT FORESTRY CONSULTING. **Global *Eucalyptus* map**: version 1.0.1. Disponível em: <<http://gitforestry.com/download_git_eucalyptus_map_PT.htm>. Acesso em: 18 ago. 2012.

GLOCKE, P.; DELAPORTE, K.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* cv. ‘urrae gem’. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 42, n. 2, p. 139-143, 2006.

GODOY, T.G. **Características de crescimento e eficiência de utilização de fósforo em plantas jovens de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake**. 2007. 44 p. Dissertação (Mestrado em Floresta de Produção) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

GOMES, F.; CANHOTO, J.M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining Gum). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 39, n. 3, p. 316-321, 2003.

GONÇALVES, A.N. **Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake in vitro**. 1982. 97 p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1982.

GRAÇA, M.E.C.; KALIL FILHO, A. N.; MEDEIROS, A. C. de S.; TAVARES, F. R. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron na multiplicação “in vitro” de brotações de *Eucalyptus dunni* Maiden. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 43, p. 107-112, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABC; EMBRAPA, CNPH, 1990. p. 99-169.

_____. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI; EMBRAPA, CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.

GUERINOT, M.A.; YI, Y. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, p. 815-820, 1994.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. **Apostila de biotecnologia – LFDGV/CCA/UFSC**. Florianópolis: Edição da Steinmacher, 2006. 41 p.

GUPTA, S.; RASHOTTE, A. Down-stream components of cytokinin signaling and the role of cytokinin throughout the plant. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 31, n. 5, p. 801-812, 2012.

HAAG, H.P. **Nutrição mineral de forrageiras no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1984. 152 p.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCT; EMBRAPA, CNPH, 1990. p. 203-212.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, JUNIOR. F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 7th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.

_____. **Plant propagation: principles and practices**. 8th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2011. 915 p.

HERMANS, C.; VERBRUGGEN, N. Physiological characterization of Mg deficiency in *Arabidopsis thaliana*. **Photosynthetica**, Prague, v.42, n.2, p.251-255, 2004.

HERTWIG, K.V. **Manual de herbicidas desfolhantes, dessecantes e fitorreguladores**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1977. 480 p.

HIGASHI, E.N. **Diagnose da eficiência de nutrientes minerais em três híbridos de *Eucalyptus* spp. cultivados *in vitro***. 1996. 90 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil**. Piracicaba: IPEF, 2000. 11 p. (Circular Técnica, 192).

HINOJOSA, G.F. Auxinas. In: CID, L.P.B. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: EMBRAPA, 2000. p. 15-54.

HU, C.Y., WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A., SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, J. **Handbook of plant cell cultures**. New York: Macmillan, 1983. v. 1, p. 177-227.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; van MONTAGU, M.; KELLEMBERGER, E. Root colonizing and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in glasses. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 176, p. 913-1923, 1994.

JAEGGER, P.; ZIGER, M. Avaliação das propriedades mecânicas de painéis compensados de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus dunnii*/*Pinus taeda*. **Cerne**, Lavras, v. 13, n. 3, p. 329-338, 2007.

JOHNSON, M.H. The problematic *in vitro* embryo in the age of epigenetics. **Reproductive Biomedicine**, Cambridge, v. 10, p. 88-96, 2005.

JOSHI, I.; BISHT, P.; SHARMA, V.K.; UNİYAL, D.P. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 52, n. 3/4, p. 110-113, 2003.

KANASHIRO, S. **Nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio e o crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. SMITH *in vitro***. 2005. 187 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R.C.S.; GONÇALVES, A.N.; DIAS, C.T.S.; JOCYS, T. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 59- 66, 2007.

KARNOVSKY, M.J.A. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, n. 2, p. 137-138, 1965.

KELLY, S. *Eucalyptus*. Singapore: Thomas Nelson, 1982. v. 2, 76 p.

KLERK, G.J. Rooting of microcuttings: theory and practice. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 38, n. 5, p. 415-422, 2002.

LACAVA, P.T.; ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AZEVEDO, J.L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, p. 55-59, 2004.

LANE, W.D. Regeneration of pear plants from shoot meristem-tips. **Plant Science Letters**, Limerick, v. 16, p. 337-342, 1979.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation: a novel of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 60, p. 197-214, 1981.

- LAVRES JUNIOR, J. **Combinações de doses de nitrogênio e potássio para capim-mombaça**. 2001. 103 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 604-607, dez. 2002.
- LEIFERT, C.; PRYCE, S.; LUMSDEN, P.J.; MURPHY, K.P. Effects of mineral nutrition on growth of tissue cultured plants. In: GOULDING, K.H. (Ed.). **Horticultural exploitation of recent biological development**. Preston: Lancashire, 1991. p. 43-57.
- LESHEN, B.; WERKER, E.; SHALEV, D.P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, London, v. 62, p. 271-276, 1988.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society**, Carlisle, v. 30, p. 421-427, 1980.
- LI, S.W.; XUE, L.; XU, S.; FENG, H.; AN, L. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **The Botanical Review**, New York, v. 75, n. 2, p. 230-247, 2009.
- LIMA, C.K.P.; MORI, F.A.; MENDES, L.M.; CARNEIRO, A.C.O. Características anatômicas e química da madeira de clones de *Eucalyptus* e sua influência na clonagem. **Cerne**, Lavras, v. 13, n. 2, p. 123-129, 2007.
- LIMA, M.M.; GONÇALVES, A.N. Efeito do thiadiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 53, p. 49-56, 1998.
- LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 32, n. 2/3, p. 219-230, 2000.
- MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, E.M.; ZARPELON, T.G.; SIQUEIRA, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 843-851, 2005.
- MAGNANI, G.S.; DIDONET, C. M.; CRUZ, L. M.; PICHTH, C.F.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetic and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1980. 251 p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319 p.
- MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas**. Santa Maria: UFSM, CEPEF, FATEC, 1998. 123 p.

MANKESSI, F.; SAYA, A.; BAPTISTE, C.; NOURISSIER, S.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of genetically related *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* clones in relation to the time spent in culture. **Trees – Structure and Function**, Berlin, v. 23, n. 5, p. 931-940, 2009.

MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. **Fisiologia vegetal**: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. Viçosa: UFV, 2009. 451 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1986. 671 p.

_____. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego: Academic Press, 1995. 889 p.

MARTIN, S.M., ROSE, D. Growth of plant cell (Ipomea) suspension cultures at controlled pH levels. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 57, p. 126-1270, 1976.

MCCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v. 2, p. 289-302.

_____. Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance: recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: dealing with genetic predeterminism. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Washington, v. 36, p. 149-154, 2000.

MENGEL, K.; KIRBY, A. **Principles of plant nutrition**. Bern: International Potash Institute, 1987. 687 p.

MERKLE, S.A.; NAIRN, C.J. Hardwood tree biotechnology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Washington, v. 41, n. 5, p. 602-619, 2005.

MONTEIRO, A.C.B.A.; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). **In vitro Cellular e Developmental Biology-Plant**, Washington, v. 36, n. 6, p. 527-531, 2000.

MORA, A.L.; GARCIA, C.H. **Eucalypt cultivation in Brazil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000. 112 p.

MÜLLER, A.; WEILER, E.W. IAA-synthase, an enzyme complex from *Arabidopsis thaliana* catalyzing the formation of indole-3-acetic acid from (S)-tryptophan. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 381, n. 8, p. 679-686, 2000.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, Bethesda, v. 25, p. 135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MYERSCOUGH, P.J. Ecology of Myrtaceae with special reference to the Sydney region. **Cunninghamia**, Sydney, v. 5, n. 4, p. 787-807, 1998.

NAVROSKI, M.C. **Multiplicação *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden.** 2011. 103 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Santa Maria, 2011.

NEHRA, N.S.; BECWAR, M.R.; ROTTMANN, W.H.; PEARSON, L.; CHOWDHURY, K.; CHANG, S.; WILDE, H.D.; KODRZYCKI, R.J.; ZHANG, C.; GAUSE, K.C.; PARKS, D.W.; HINCHEE, M.A. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 41, n. 6, p. 701-717, 2005.

NEUMANN, K.H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant cell and tissue culture: a tool in biotechnology.** Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. 333 p.

NIEDZ, R.P.; BAUSHER, M.G. ontrol of in vitro contamination of explants from greenhouse – and field-grown trees. **In Vitro Cellular and Development Biology – Plant**, Heidelberg, v. 38, n. 5, p. 468-471, 2002.

NOURISSIER, S.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of two *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* mature clones. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 44, n. 4, p. 263-272, 2008.

OLIVEIRA, L.S. **Micropropagação, microestaquia e miniestaquia de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*.** 2011. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

OLIVEIRA, M.L.; XAVIER, A.; FILHO, R.M.P.; OTONI, W.C.; TEIXEIRA, J.B. Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Revista Árvore**, Viçosa, v.35, n.6, p.1207-1217, 2011.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P.E.T.; FERREIRA, C.A. **Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná.** Colombo: EMBRAPA Florestas, 2006. 45 p. (Documentos, 129).

PEDROSA, A.L.; IWAKIRI, S.; MATOS, J.L.M. de. Produção de vigas estruturais em perfil “T” com painéis de madeira reconstituída de *Pinus taeda* L. e *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Floresta**, Curitiba, v. 35, n. 3, p. 443-449, 2005.

PEÑA, J.P.; PÉREZ, L. Análisis comparativo de las propiedades microscópicas y macroscópicas de la madera de *E. nitiens* y *E. globulus*. In: SILVOTECNA, 12., 1999, Concepción. **Anais...** Concepción: CORMA, 1999. p. 25.

PENCHEL, R.M.; NEVES, D.C.; CAMPINHOS, C.N.; EVANGELISTA, A.L. DESCHAMPS, C. Otimização de parâmetros fisiológicos da propagação vegetativa por estaquia de matrizes elite de eucaliptos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 5., 1995, Lavras. **Anais...** Lavras: SBFV, 1995. p. 83.

PEREIRA, J.C.D.; STURION, J.A.; HIGA, A.R.; HIGA, R.C.V.; SHIMIZU, J.Y.

Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil.

Colombo: EMBRAPA Florestas, 2000. 113 p. (Documentos, 38).

PICOLI, E.A.T.; OTONI, W.C.; FIGUEIRA, M.L.; CAROLINO, S.M.B., ALMEIDA, R.S.;

SILVA, E.A.M., CARVALHO, C.R.; FONTES, E.P.B. Hyperhydricity *in vitro* eggplant

regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). **Plant Science**, Limerick, v. 160, p. 857-868, 2001.

PINTO, G.; SILVA, S.; PARK, Y.S; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C. Factors

influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium

and anti-browning agents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, n. 1, p. 79-88, 2008.

POLLMANN, S.; DÜCHTING, P.; WEILER, E.W. Tryptophan-dependent indole-3-acetic

acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. **Phytochemistry**, New

York, v.70, n.4, p.523-531, 2009. DOI 10.1016/j.phytochem.2009.01.021

PONTE, E.M. **Micropropagação de *Eucalyptus globulus* ssp. *Globulus* Labill.** 1999. 46 p.

Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.

POTTS, B.M.; VAILLANCOURT, R.E.; JORDAN, G.J.; DUTKOWSKI, G.W.; COSTA E

SILVA, J.; MCKINNON, G.E.; STEANE, D.A.; VOLKER, P.W.; LOPEZ, G.A.;

APIOLAZA, L.; LI, J.; MARQUES, C.; BORRALHO, N.M.G., 2004. Exploration of the

Eucalyptus globulus gene pool. In: INTERNATIONAL IUFRO CONFERENCE, 2004,

Aveiro. ***Eucalyptus in a changing world...*** Aveiro: IUFRO, 2004. p. 46–61.

PROCÓPIO, R.E.L.; ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI Jr, W.; AZEVEDO, J.L.

Characterization of endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetics**

and Molecular Research, Ribeirão Preto, v. 8, n. 4, p. 1408-1422, 2009.

PRYOR, L.D. **Biology of eucalyptus**. London: Camelot Press; Edward Arnold, 1976. 82 p.

(The Institute of Biology's, Studies in Biology, 61).

RAGHOTHAMA, K.; KARTHIKEYAN, A. Phosphate acquisition. **Plant Ecophysiology**,

Oxford, v. 4, p. 37-49, 2005.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro**

Cellular and Development Biology, Oxon, v. 38, p. 115-124, 2002.

ROCHA, M.P. da; TOMASELLI, I. Efeito do modelo de desdobro na qualidade da madeira

serrada de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus dunnii*. **Cerne**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 70-83, 2002.

ROCHA, M.P. da; TRUGILHO, P.F. Qualidade de Madeira serrada de *Eucalyptus dunnii* em

função do método de desdobro e condição de umidade. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 4, p. 314-321, 2006.

ROSA, C.A.B. **Influência do teor de lignina da madeira de *Eucalyptus globulus* na**

produção e na qualidade de celulose Kraft. 2003. 140 p. Dissertação (Mestrado em

Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

ROSADO, A.M. **Produção de óleo essencial de *Eucalyptus* sp.** Viçosa: UFV, DEF, 1996. 31 p. (Monografia).

RUBIO, V.; BUSTOS, R.; IRIGOYEN, M.L.; CARDONA-LÓPEZ, X.; ROJAS-TRIANA, M.; PAZ-ARES, J. Plant hormones and nutrient signaling. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 361-373, 2009.

SALISBURY, F.B., ROSS, C.W. **Fisiologia vegetal**. México: Iberoamérica, 1994. 759 p.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling. **Nature**, London, v. 459, p. 1071-1078, 2009.

SANTOS, A.F. do; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil**: identificação e controle. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2001. 20 p. (Circular Técnica, 45).

SANTOS, C.H.; DOMINGUES, M.C.S. Mecanismos de ação de auxinas. In: CAMARGO E CASTRO, P.R.; ALVES DE SENA, J.O.; KLUGE, R.A. **Introdução a fisiologia do desenvolvimento vegetal**, Maringá: Eduem, 2002. p. 35-47.

SANTOS, D.C. dos; WENDLING, I.; DUTRA, L.F.; FRACARO, L.C. **Alongamento *in vitro* de *Eucalyptus urophylla***. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2004. 4 p. (Comunicado Técnico, 120).

SANTOS, O.S. **Problemas com micronutrientes na agricultura**. Santa Maria: UFSM, 1996. 153 p.

SANTOS-SEREJO, J.A.; JUNGHANS, T.G.; SOARES, T.L.; SILVA, K.M. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUSA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**, Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 79-98.

SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1974. 56 p.

SASSE, J. Problems with propagation of *Eucalyptus globulus* by stem cuttings. In: IUFRO CONFERENCE FOR TEMPERATE HARDWOOD FORESTRY, 1995, Hobart. **Proceedings...** Hobart: IUFRO, 1995. p. 319-320.

SCARPINELLA, G.D. **Reflorestamento no Brasil e o Protocolo de Quioto**. 2002. 182 p. Dissertação (Mestrado em Energia) – Programa Interunidades de Pós Graduação em Energia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SCHUMACHER, M.V. **Ciclagem de nutrientes em diferentes povoamentos de *Eucalyptus saligna* (Smith), *Eucalyptus dunnii* (Maiden) e *Eucalyptus globulus* (Labillardière) no Rio Grande do Sul, Brasil**. 1995. 172 p. Thesis (PhG) – Universität für Badenkultur, Vienna, 1995. Alemão.

SHARMA, S.K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, p. 511–518, 2000.

SHIMIZU, J. Aptidão de espécies e procedências de *Eucalyptus* para reflorestamento no planalto do Rio Grande do Sul. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 12, p. 1-12, 1986.

SILVA, E.S.B. **Propagação *in vitro* de *Prunus* spp.** 2004. 115 p. Tese (Doutorado em Fruticultura de Clima Temperado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 11, p. 118-130, 1957.

SMITH, L.C.; MURPHY, B.D. Genetic and epigenetic aspects of cloning and potential effects on offspring of cloned mammals. **Cloning Stem Cells**, SaintHyacinthe, v. 6, n. 2, p. 126-132, 2004.

SOBROSA, R.C.; CORDER, M.P.M. Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas e raízes adventícias em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden *in vitro*. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 58-68, 2003.

SOTELO, M.; MONZA, J. Micropropagation of *Eucalyptus maidenii* elite trees. **Agrociencia**, Montevideo, v. 9, n. 6, p. 81-89, 2007.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117. 2007.

SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S.; SILVEIRA, D.G; SOUZA, F.V.D; FARIA, G.A; NETO, H.P.S; SANTOS SEREJO, J.S; SILVA, K.M; COSTA, M.A.P.C; SOARES, T.L; JUNGHANS, T.G.; ALMEIDA, W.B. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 38-52.

SPARTZ, A.K.; GRAY, W.M. Plant hormone receptors: new perceptions. **Genes & Development**, New York, v. 22, n. 16, p. 2139-2148, 2008.

SPURR, A.R. The effect of boron on cell walls structure in celery. **American Journal of Botany**, Davis, v. 44, p. 637 - 650, 1957.

STATSOFT, Inc. **STATISTICA (data analysis software system)**, version 8. 2009. (Software Estatístico).

STREET, H.E. Cell (suspension) cultures - techniques. In: STREET, H.E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. Berkeley; Los Angeles: University of California Press, 1977. p. 61-102.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Trad. de E.R. Santarém et al. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

TAMASSIA, M.; NUTTINCK, F.; MAY-PANLOUP, P.; REYNIER, P.; HEYMAN, Y.; CHARPIGNY, G.; STOJKOVIC, M.; HIENDLEDER, S.; RENARD, J.P.; Chastant-Maillard S. In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 71, p. 697-704, 2004.

THOMAS, P.; KUMARI, S. Inconspicuous endophytic bacteria mimicking latex exudates in shoot-tip cultures of papaya. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 124, p. 469-474, 2010.

THOMAS, P.; SOLY, T. Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. grand naine and the affinity of endophytes to the host. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 952-964, 2009.

THORPE, T.A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 37, n. 2, p. 169-180, 2007.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA CNPH, 1998. v. 1, p. 87-132.

TREVIZAM, R.; BRONDANI, G.E.; NERY, F.U.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M.; Caracterização morfológica de calos de *Eucalyptus urofilia* S.T. Blake sob concentrações de boro e cálcio. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 2, p. 215-222, 2011.

VIEIRA, E.L.; MONTEIRO, C.A. Hormônios vegetais. In: _____. **Introdução à fisiologia vegetal**. Maringá, Eduem, 2002. p. 79-104.

VILLA, F.; ARAÚJO, A.G.; PIO, L.A.S.; PASQUAL, M. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 582-589, 2005.

VITAL, B.R.; ANDRADE, A.M. de; VALENTE, O.F. Efeitos do tratamento da madeira com sais ignífugos, sobre a produção de carvão vegetal. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 16, n. 1, p. 97-103, 1992.

VITTI, A.M.S.; BRITO, J.O. **Óleo essencial de eucalipto**. Piracicaba: IPEF, 2003. 25 p. (Documentos Florestais, 17).

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.

XAVIER, A.; OTONI, W.C.; PENCHEL, R.M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.) **Biotechnology florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 55-74.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Ed. UFV, 2009. 272 p.

WATT, M.P.; BERJAK, P.; MAKHATHINI, A.; BLAKEWAY, F. *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 3, p. 233-240, 2003.

WHITE, P.R. Plant tissue cultures. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 11, p. 615-628, 1942.

WOODWARD, A.W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 5, p. 707-735, 2005.

ZOBEL, B.J.; TALBERT, J. **Applied forest tree improvement**. New York: John Wiley, 1984. 505 p.

APÊNDICE

Tabela 31 - Comparação entre os meios de cultura WPM, MS e JADS quanto à disponibilidade de nutrientes.

mg. L ⁻¹			
Nutrientes	WPM	MS	JADS
NH ₄	69,965	288,606	55,972
NO ₃	135,889	551,686	308,018
P	38,687	38,687	92,849
K	48,843	783,783	430,069
Ca	120,537	119,951	200,442
S	237,667	55,500	106,447
Mg	36,493	36,493	72,936
Fe	5,584	5,584	11,167
Cu	0,064	0,006	0,318
Mo	0,099	0,099	0,059
Mn	5,493	5,493	5,493
Co	0,000	0,006	589,300
Zn	1,955	1,955	0,982
Cl	46,296	212,196	0,074
B	1,084	1,084	0,542
I	0,000	0,635	0,000
Na	4,653	4,653	9,227
Vitaminas	WPM	MS	JADS
Tiamina-HCl	1,000	0,100	5,000
Piridoxina-HCl	1,000	0,500	0,500
Ácido Nicotínico	1,000	0,500	0,500
Glicina	1,000	2,000	0,000
Pantotenato Ca ²⁺	1,000	0,000	2,400
Biotina	0,010	0,000	0,000
Cisteína	0,000	0,000	5,000