**Universidade de São Paulo**
**Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

# Propagação de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell

**Leandro Silva de Oliveira**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa: Recursos Florestais. Opção em: Silvicultura e Manejo Florestal

**Piracicaba**
**2014**

Leandro Silva de Oliveira
Engenheiro Florestal

# Propagação de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa: Recursos Florestais. Opção em: Silvicultura e Manejo Florestal

**Piracicaba**
**2014**

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

Oliveira, Leandro Silva de
Propagação de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell / Leandro Silva de Oliveira. - - Piracicaba, 2014.
144 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Brotações epicórmicas 2. Planta matriz 3. Condições ambientais 4. Regulador de crescimento 5. Meios de cultura 6. Enraizamento adventício 7. Regeneração in vitro 8. Explantes 9. Morfogênese vegetal I. Título

CDD 634.9734
O48p

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

*Dedico esse trabalho:*

*Aos meus pais, Geraldo e Carmelita*
*À minha irmã, Adriana*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, Pai, Filho e Espírito Santo pela presença constante em meu coração sempre a guiar-me pelas veredas da vida.

À minha família, por tudo que representam na minha vida e todo amor doado incondicionalmente na minha vida.

À Universidade de São Paulo, à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Florestais, pela oportunidade de realização do doutorado.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Marcílio de Almeida, pela orientação, ensinamentos e, sobretudo pela amizade construída no decorrer desses anos.

Ao Professor Antônio Natal Gonçalves, pelo apoio constante e pelas palavras de sabedoria.

À Cristina Vieira de Almeida pelo apoio constante, dedicação e abraço acolhedor.

Ao Grupo Morfogênese Vegetal: Érika, Gilvano, Katherine, Natália, Fabiane, Lívia, Francisco, Germana, Gabriela, Priscila, Eveline, Renato, Rafaela, Aline, Pedro, Renan e Leonardo pela ajuda sempre presente, conselhos e momentos descontraídos e felizes.

Ao José Roberto Romanini (Beto) pelo apoio e colaboração no laboratório e pela amizade.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ: José Leonardo de Moraes Gonçalves, Ciro Abbud Righi, Giovana, Javier, Alexandre, Ângela pela amizade e troca de experiências.

Ao Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) pelo apoio ao projeto principalmente dos funcionários Israel, Eveli e Edílson.

Aos amigos de república: Daniel, Fábio, Ranieri, Antônio e Matias pela convivência harmoniosa e companheirismo.

Aos amigos e irmãos da ESALQ: Leonardo, Antônio, Acácio, Mateus, Geraldo, Irineu, Thiago, Fredy, Andréa, Tatiane, Rafaela, Mariana, Dalila, Andréia, Joice, Marina, Carolina, Simone, Rafael, Ana Paula pela amizade e dedicação em todos os momentos.

Ao povo brasileiro, que com a força do seu trabalho constroem uma nação com oportunidades para a qualificação de todos seus cidadãos.

E a todos de que uma maneira ou outra contribuíram para a realização desse trabalho.

*A mais nobre força do ser humano é a razão.*
*A mais alta meta da razão é o conhecimento de Deus.*

*Santo Alberto Magno*

# SUMÁRIO

RESUMO ..... 13
ABSTRACT ..... 15
1 INTRODUÇÃO ..... 17
1.1 Revisão Bibliográfica ..... 18
1.1.1 *Eucalyptus cloeziana* ..... 18
1.1.2 Resgate de árvores adultas de *Eucalyptus* ..... 28
1.1.3 Micropropagação de *Eucalyptus* ..... 30
1.1.4 Rejuvenescimento *in vitro* ..... 36
1.1.5 Regeneração *in vitro* de *Eucalyptus* ..... 38
Referências ..... 40
2 ORGANOGÊNESE INDIRETA DE *E. cloeziana* ..... 57
Resumo ..... 57
Abstract ..... 57
2.1 Introdução ..... 58
2.2 Material e Métodos ..... 59
2.2.1 Desinfestação e germinação *in vitro* das sementes ..... 59
2.2.2 Desinfestação e germinação *in vitro* das sementes ..... 59
2.2.3 Indução das culturas organogênicas ..... 60
2.2.4 Desenvolvimento de gemas adventícias ..... 60
2.2.5 Multiplicação e Alongamento ..... 61
2.2.6 Enraizamento *ex vitro* ..... 61
2.2.6 Análises histológicas e histoquímicas ..... 62
2.2.7 Preparo do meio de cultura e condições experimentais ..... 63
2.3 Resultados ..... 63
2.3.1 Fase de indução ..... 63
2.3.2 Fase de diferenciação ..... 67
2.3.3 Multiplicação e alongamento das gemas adventícias ..... 69
2.3.4 Aclimatização e enraizamento*ex vitro* das brotações ..... 69
2.4 Discussão ..... 70
2.4.1 Efeito do tipo de explantes e dos reguladores de crescimento ..... 70
2.4.2 Multiplicação e alongamento das gemas adventícias ..... 73
2.4.3 Aclimatização e enraizamento *ex vitro* das brotações ..... 74
2.5 Conclusão ..... 75
Referências ..... 76

3 RESGATE DE MATRIZES ADULTAS DE *E. cloeziana* POR MEIO DE MEGAESTACAS ..... 81
Resumo ..... 81
Abstract ..... 81
3.1 Introdução ..... 81
3.2 Material e Métodos ..... 83
3.3 Resultados ..... 84
3.3.1 Resgate de matrizes adultas em diferentes épocas do ano ..... 84
3.3.2 Resgate de matrizes adultas através de megaestacas de diferentes diâmetros ..... 87
3.4 Discussão ..... 90
3.5 Conclusões ..... 92
Referências ..... 93
4 MICROPROPAGAÇÃO DE MATRIZES ADULTAS DE *Eucalyptus cloeziana* ..... 95
Resumo ..... 95
Abstract ..... 95
4.1 Introdução ..... 95
4.2 Material e Métodos ..... 97
4.2.1 Estabelecimento *in vitro* ..... 97
4.2.2 Multiplicação *in vitro* ..... 98
4.2.3 Alongamento *in vitro* ..... 99
4.2.4 Aclimatização e enraizamento*ex vitro* ..... 101
4.2.5 Preparo do meio de cultura e condições experimentais ..... 101
4.3 Resultados ..... 102
4.3.1 Estabelecimento *in vitro* ..... 102
4.3.2 Multiplicação *in vitro* ..... 103
4.3.3 Alongamento *in vitro* ..... 109
4.3.4 Aclimatização das brotações ..... 112
4.4 Discussão ..... 113
4.5 Conclusões ..... 118
Referências ..... 118
5 MICROPROPAGAÇÃO COMO TÉCNICA DE REJUVENESCIMENTO *IN VITRO* DE MATRIZES ADULTAS DE *Eucalyptus cloeziana* ..... 125
Resumo ..... 125
Abstract ..... 125
5.1 Introdução ..... 126
5.2 Material e Métodos ..... 127

5.2.1 Material experimental....127
5.2.2 Multiplicação *in vitro* de *E. cloeziana*....128
5.2.3 Miniestaquia e microestaquia de *E. cloeziana*....129
5.3 Resultados....131
5.3.1 Multiplicação *in vitro* de *E. cloeziana*....131
5.3.2 Miniestaquia e microestaquia de *E. cloeziana*....133
5.4 Discussão....135
5.5 Conclusão....139
Referências....139
6 CONCLUSÃO GERAL....143

# RESUMO


## Propagação de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell

O *Eucalyptus cloeziana* se destaca pelas propriedades tecnológicas da sua madeira, principalmente em razão da sua durabilidade, densidade e resistência. Entretanto, essa espécie apresenta limitações quanto ao enraizamento adventício de estacas, dificultando a obtenção de mudas clonais e o avanço nos programa de melhoramento da espécie. Nesta perspectiva, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a micropropagação de *E. cloeziana* a partir de materiais juvenis e adultos como uma técnica para a propagação da espécie. Para tanto, o trabalho foi dividido em quatro partes. No primeiro estudo, estabeleceu-se um protocolo de organogênese indireta de *E. cloeziana* a partir de hipocótilos e cotilédones. No segundo estudo avaliou-se o resgate de matrizes adultas de *E. cloeziana* através da indução de brotações epicórmicas em megaestacas. No terceiro estudo definiu-se um protocolo de micropropagação via proliferação de gemas axilares de matrizes adultas de *E. cloeziana*. Por último, no quarto estudo avaliou-se o rejuvenescimento *in vitro* de matrizes adultas de *E. cloeziana* por meio da micropropagação via proliferação de gemas axilares e a microestaquia, a partir das matrizes rejuvenescidas *in vitro*,para comprovar a viabilidade do cultivo *in vitro* como alternativa de propagação da espécie. A organogênese indireta de *E. cloeziana* mostrou-se possível e dependente do tipo de explante, dos reguladores de crescimento, suas concentrações e combinações utilizadas nas diferentes fases de morfogênese. As brotações adventícias foram micropropagadas e aclimatizadas com sucesso, obtendo-se mudas clonais de *E. cloeziana*. No resgate das matrizes adultas de *E. cloeziana* ocorreu maior indução de brotações epicórmicas para as megaestacas coletadas na época do ano com maior pluviosidade e temperatura. O diâmetro médio das megaestacas, compreendido entre 2,0 e 5,0 cm, correspondeu ao mais adequado para a obtenção de maior número de brotações epicórmicas no resgate das matrizes adultas de *E. cloeziana*. O protocolo de micropropagação das matrizes adultas de *E. cloeziana* foi estabelecido com sucesso, utilizando como explantes, brotações epicórmicas induzidas nas megaestacas. A multiplicação *in vitro* das microcepas foi realizada com êxito no meio de cultura WPM suplementado com BAP e ANA, cujas concentrações variaram entre os genótipos. Os tratamentos de "pulse" com $GA_3$ não foi adequado para promover o alongamento *in vitro* das brotações, o qual foi obtido coma redução da concentração do BAP (0,1 mg $L^{-1}$). A aclimatização e o enraizamento *ex vitro* das microestacas foi realizada com sucesso nos miniestufas, garantindo a obtenção de mudas clonais das matrizes adultas de *E. cloeziana* para a composição de um microjardim clonal. As microcepas das árvores matrizes de *E. cloeziana* apresentaram diferentes taxas de multiplicação *in vitro*, apresentando especificidades dos materiais genéticos à micropropagação. Os resultados da microestaquia das matrizes rejuvenescidas *in vitro* de *E. cloeziana* corroboraram as evidências de rejuvenescimento desses genótipos durante a micropropagação. Além disso, constatou-se que outros fatores, além da maturidade, podem estar atuando diretamente na recalcitrância do *E. cloeziana* ao enraizamento adventício. Dessa forma, comprovou-se a importância da micropropagação como uma ferramenta para a clonagem de *E. cloeziana*, abrindo perspectivas para investigações futuras para otimizar os métodos de propagação da espécie.


Palavras- chave: Brotações epicórmicas; Planta matriz; Condições ambientais; Regulador de crescimento; Meios de cultura; Enraizamento adventício; Regeneração *in vitro;* Explantes; Morfogênese vegetal

## ABSTRACT

### Propagation of *Eucalyptus cloeziana* F. Muell

*Eucalyptus cloeziana* has importance for its wood technologic characteristics, mainly the durability, density and resistance. Moreover, this species has limitations on adventitious rooting of cuttings, having difficulties to obtain clonal seedlings and to advance in the improvement programs. In this perspective, the present work aimed to evaluate the *E. cloeziana* micropropagation by juvenile and mature explants as a technique for propagation this specie. Therefore, the work was divided into four basic studies. The first study was the establishment of the protocol to indirect organogenesis to *E. cloeziana* hypocotyls and cotyledons. In the second study evaluated the rescue of *E. cloeziana* adult matrices for epicormic shoots induction in crow branches. In the third study was definite a micropropagation protocol by axillary branching of *E. cloeziana* adult matrices. Finally, in the fourth study was evaluated the *in vitro* rejuvenation of *E. cloeziana* adult matrices to micropropagation by axillary branching and the micro-cutting technique of *in vitro* rejuvenated matrices to prove the *in vitro* culture viability to the propagation of this specie. The indirect organogenesis *E. cloeziana* was dependent of explant type and growth regulator and its concentration used in the different morphogenesis phases. The adventitious shoots were multiplicities and acclimatized with success to obtain *E. cloeziana* clonal seedlings. The vegetative rescue results of *E. cloeziana* adult matrices showed a higher induction epicormic shoots from branches collected in warmer and rain season. The medium diameter between 2.0 and 5.0 cm was considered the better to obtain higher epicormic shoots number in vegetative rescue. The micropropagation protocol of *E. cloeziana* adult matrices was realized with success using epicormic shoots, induced in the branches, like explants. The shoots *in vitro* multiplication was realized on WPM medium culture, supplemented with BA and NAA. The better growth regulators concentrations were different for each genotype. Treatments pulse with $GA_3$ was not suitable to promote the elongation of shoots *in vitro*, which was obtained by the BA concentration reduction at 0.1 mg $L^{-1}$. The *in vitro* shoots acclimatization and *ex vitro* rooting was performed in mini-incubators with success and it permit to obtain clonal seedlings from *E. cloeziana* adult matrices to form a clonal micro-garden. The shoots of *E. cloeziana* adult matrices showed different *in vitro* multiplication rates with specific-genotype responses to micropropagation. The micro-cutting technique results of *E. cloeziana* adult matrices provide evidence that occurred *in vitro* rejuvenation of these genotypes, during the micropropagation. Therefore, the nursery results showed that other factors, not only maturation, can be involved in the adventitious recalcitrance of *E. cloeziana*. In conclusion, the importance micropropagation like a biotechnological tool to propagation of *E. cloeziana* was proved and opened important perspectives for future investigations to optimize the propagation methods for this specie.


Keywords: Epicormics shoots; Matrix plant; Enviromental conditions; Growth regulator; Culture medium; Adventitious rooting; *In vitro* regeneration; Explants; Plant morphogenesis

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* compreende a maioria das espécies florestais plantadas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo a árvore mais plantada no Brasil, cuja área corresponde a 20% dos plantios mundiais (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2010; GIT FORESTRY CONSULTING - GFC, 2013). O amplo desenvolvimento das técnicas de propagação clonal, principalmente a miniestaquia, contribuiu para o destaque da silvicultura brasileira no cenário mundial (SOUZA JÚNIOR; WENDLING, 2003). Os avanços tecnológicos nos processos de seleção de árvores, resgate de árvores superiores, avaliação de clones, produção de mudas e em práticas silviculturais adotadas na implantação e condução das florestas clonais garantem a elevada produtividadedos plantios de *Eucalyptus*.

Nos últimos anos, a expansão das áreas de plantios de *Eucalyptus* tem ocorrido, sobretudo, para regiões que apresentam condições climáticas adversas às espécies mais plantadas. Em razão disso, a seleção de novas espécies e aquelas comumente conhecidas como mais adaptadas às condições de estresse, como secas e geadas tem sido preconizadas como parte dos programas de melhoramento das empresas. Dentre as espécies, destacam-seo *E. benthamii*, *E. dunnii*, *E. nitens, E. camaldulensis* e o *E. cloeziana*. Além disso, a globalização acentuou a competitividade do setor florestal, impulsionando as empresas a desenvolverem uma silvicultura mais produtiva, porém, com vistas também à qualidade dos seus produtos, visando o ganho de maior espaço no mercado. Nesse contexto, o *E. cloeziana* tem destaque por ser uma espécie adaptada às regiões tropicais e subtropicais (TRUEMAN et al., 2013), destacando-se pela sua rusticidade e rápido crescimento, fatores importantes para reflorestamentos destinados à produção de madeira de qualidade. Portanto, o interesse econômico do *E. cloeziana* para o setor florestal deve-se, principalmente, às características tecnológicas da sua madeira, alta densidade, grande durabilidade e excelente qualidade para serrarias, produção de carvão e uso na construção civil (ALMEIDA et al., 2007).

Por sua vez, a expansão dos plantios comerciais de *E. cloeziana* tem sido limitada pelas dificuldades relacionadas a sua propagação quer seja via seminífera (ARAÚJO et al., 2004) ou clonal (MOURA et al., 2001; ALFENAS et al., 2011; TRUEMAN et al., 2013). Não obstante a espécie produzir grande quantidade de sementes a taxa de germinação é baixa e as plântulas são de difíceis tratos em viveiros (MOURA, 2003). Por outro lado, a espécie também tem sido considerada recalcitrante ao enraizamento adventício via estaquia, pois os índices de sucesso neste processo ainda são baixos, se comparados a outras espécies do gênero *Eucalyptus* (ALFENAS et al., 2009).

A clonagem de *Eucalyptus* por meio da miniestaquia corresponde ao principal método de produção de mudas para o estabelecimento de plantações clonais, garantindo uma alta produtividade e uniformidade dos plantios florestais. Todavia, para aqueles genótipos, como o *E. cloeziana* que apresentam restrições quanto à propagação pelos métodos convencionais, a micropropagação tem sido utilizada com fins de rejuvenescimento no intuito de incrementar os índices de enraizamento. Nesse contexto, a micropropagação é apontada como uma alternativa para o desenvolvimento de um sistema de propagação clonal para o *E. cloeziana*.

A reversão à juvenilidade dos genótipos de *Eucalyptus* tem sido recomendada pela utilização das técnicas de cultura de tecidos que envolvam a neo-formação de estruturas vegetativas como embriões somáticos e gemas adventícias (MARTÍNEZ et al., 2012). A embriogênese somática é considerada, a princípio, como uma das ferramentas mais indicadas na obtenção de mudas clonais rejuvenescidas (BONGA et al., 2010). Entretanto, ainda são escassos os trabalhos reportando o rejuvenescimento de genótipos adultos por meio destas técnicas, devido às restrições encontradas no estabelecimento de protocolos de regeneração *in vitro*. Nesse sentido, a micropropagação por meio da proliferação de gemas axilares em sucessivos subcultivos *in vitro* tem sido empregada, com resultados positivos para o rejuvenescimento *in vitro* de genótipo adultos de *Eucalyptus* (BRONDANI et al., 2012).

Diante disso, considerando a importância e a aplicabilidade da micropropagação, propõem-se ações relacionadas com o avanço científico na propagação clonal de *E. cloeziana*, tendo em vista suas vantagens e sua recalcitrância ao enraizamento. Desta forma, há, portanto, a necessidade do desenvolvimento de pesquisas que objetivem alternativas para a superação desses entraves e que contribuam para a consolidaçãoda silvicultura clonalda espécie. Nesse sentido, os resultados obtidos apresentarão aplicação tecnológica no que tange ao seu emprego na conservação de germoplasma e no melhoramento genético da espécie.

## 1.1 Revisão Bibliográfica

### 1.1.1 *Eucalyptus cloeziana*

#### 1.1.1.1 Botânica

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, composta de mais de 800 espécies (OGUNWANDE et al., 2003), a qual está subdividida em oito subgêneros, sendo que o subgênero *Idiogenes* contém apenas a espécie*Eucalyptus cloeziana*. O nome cloeziana foi dadoem homenagem ao químico francês Francois Stanislas Cloez pelo seu trabalho com os

óleos das espécies de *Eucalyptus* (WOOD SOLUTIONS, 2013). Na Austrália, o nome comum do *E. cloeziana* é Gympie messmate.

De acordo com Clarke et al. (2009), *E. cloeziana* é uma árvore perene,de grande porte podendo atingir até 55 m de altura e 1,5 m de diâmetro, apresentando grandes ramos, sendo os de menores porte flexíveis. A espécie possui folhas simples com inserção foliar alternada, sem a presença de estípulas, tendo o pecíolo achatado, medindo de 1,0 - 1,5 cm de comprimento. Além disso, a lâmina foliar é lanceolada(8,0 - 13,0 cm × 1,0 – 3,0 cm), acuminadano ápice,discolor, com nervuras pinadas (Figura 1A).

A idade na qual as espécies de *Eucalyptus* atingem a maturidade varia entre as espécies. No caso específico do *E. cloeziana*, as árvores atingem a maturidade aos três anos (POTTS et al., 2001). De acordo com Clarke et al. (2009), a inflorescência é uma umbela axilar, com dicásio com 4 a 7 flores, frequentemente agrupadas em grande quantidade como em uma grande panícula, com pedúnculo arredondado ou angular com 5,0 – 10,0 mm de comprimento (Figura 1B). A floração ocorre de novembro a fevereiro na Austrália (CLARKE et al., 2009). As flores são brancas, monoclinas, regulares com pedicelo medindo de 1,0 – 4,0 mm e os botões florais tem a forma globular a ovóide, dividido em hipanto hemisférico (Figura 1C). A parte inferior da flor tem 2,0 – 4,0 mm x 3,0 – 4,0 mm e um opérculo hemisférico ou cônico (parte superior da flor) com 2,0 – 3,0 mm x 3,0 – 4,0 mm, sendo pendido na antese. Apresenta numerosos estames e ovário ínfero egamocarpelar com 3 - 4 lóculos.

O fruto é uma cápsula hemisférica a globular, incluído em um hipanto amadeirado (5,0 – 10,0 mm × 6,0 – 12,0 mm), que se abre em 3 - 4 válvulas exsertas, com muitas sementes (Figura 1C). As sementes apresentam formato cúbico ou alongado com coloração castanho-amarelada (CLARKE et al., 2009).

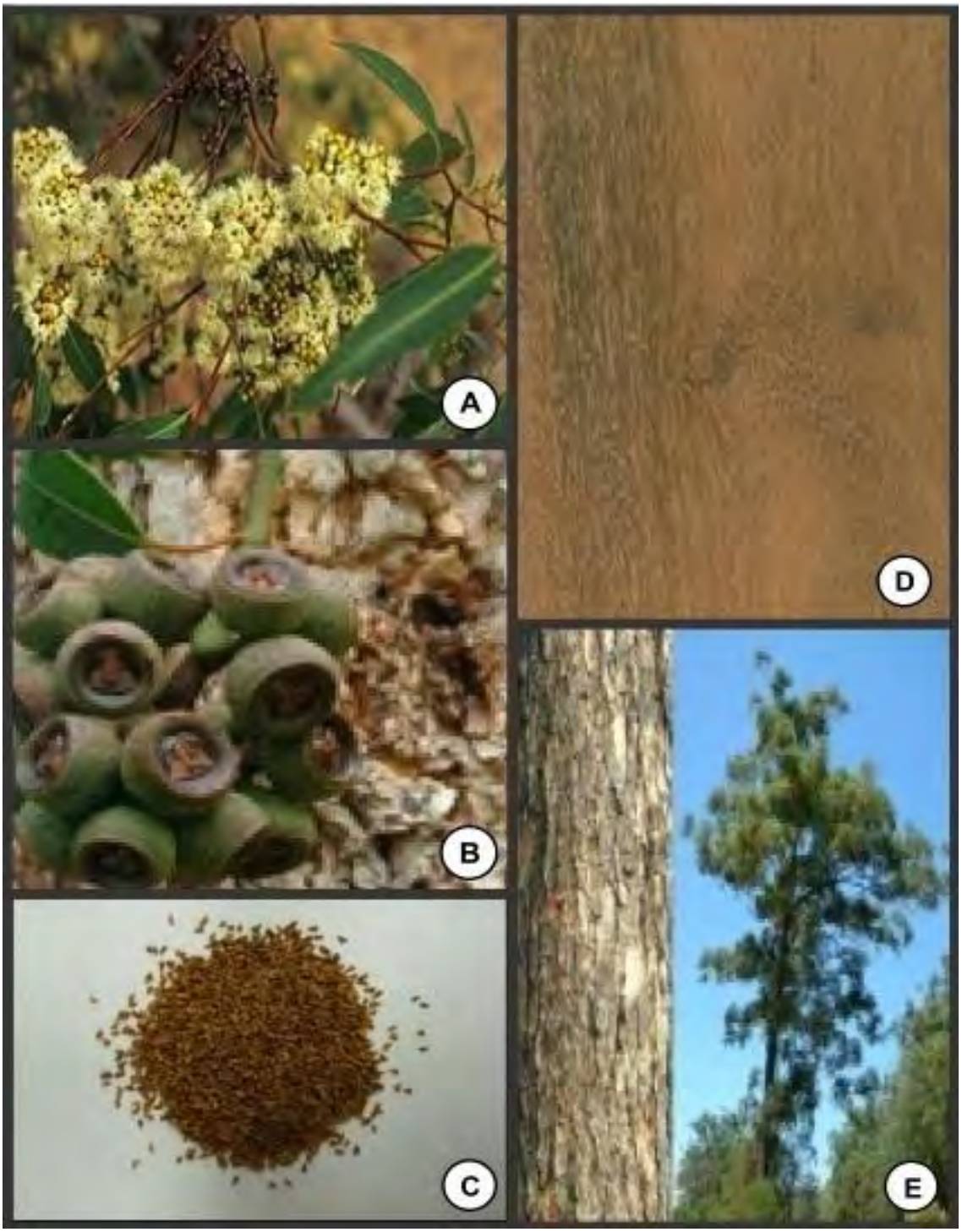


Figura 1 - A: Inflorescências de *E. cloeziana*, do tipo dicásio (fonte: http://www.ebay.com.au); B: Frutos de *E.cloeziana*(fonte: HAMAKUA, H. 2012)*;* C: Sementes de *E.cloeziana*; D: Detalhe da madeira de *E. cloeziana*(fonte: McLENON, C. 2012); E: Detalhe do tronco de *E.cloeziana* com a cascaáspera, fibrosa com fissuras longitudinais (fonte: http://www.noosanativeplants.com.au)

### 1.1.1.2 Ocorrência natural

*Eucalyptus cloeziana* F. Muell. é uma espécie endêmica, ocorrendo naturalmente em áreas disjuntas na parte leste do estado de Queensland (Qld), Austrália, próximo à costa, entre as latitudes 15 - 27º S (Figura 2).Sua ocorrência vai desde áreas esparsas entre o distrito de

Gympie na região subtropical (altitudes variando de 70 a 380 m) até o distrito de Far North Queensland ao norte de clima tropical (altitudes próximas a 900 m) (MOURA, 2003; CLARKE et al., 2009). No distrito de Gympie, em torno de 26º de latitude, a espécie apresenta seu melhor desenvolvimento atingindo 55 m de altura, com excelente forma do tronco. Nos demais locais de sua distribuição natural, as árvores de *E. cloeziana* são pequenas, tortuosas com as alturas variando de 10 a 35 m (HALL et al., 1975).

Na região de ocorrência natural do *E. cloeziana* o clima é quente e subúmido a úmido, com temperatura média do mês mais quente entre 29 e 34 ºC, e a média das mínimas do mês mais frio, entre 5 e 18 ºC, podendo ocorrer fracas geadas em até 5 dias por ano, isto nas baixas altitudes nas populações do norte (JONAVOVIC; BOOTH, 2002). A precipitação pluviométrica média anual varia de 550 a 2.300 mm, concentrando-se no verão.

Figura 2 – Distribuição natural de *E. cloeziana* na Austrália (fonte: JONAVOVIC; BOOTH, 2002)

O melhor desenvolvimento ocorre em solos argilosos e profundos de origem vulcânica, todavia ocorre também em solos de profundidade média e arenosos derivados de granito. Os solos são bem drenados e de baixa a média fertilidade (INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS – IPEF, 2012). Ocorre em Floresta Aberta Alta e Floresta Aberta, e geralmente é a espécie dominante. Ocorre associado com as espécies *E. citriodora, E. crebra, E. acmenoides, E. resinifera, E. intermedia, E. grandis, Syncarpia glomulifera, Tristania conferta, Angophora costata* e *Casuaria tortuosa*. (IPEF, 2012)

### 1.1.1.3 Propriedades tecnológicas da madeira

A madeira de *E.cloeziana* tem o cerne comtonsmarrom-amarelado (Figura 1D), apresentando-se forte, dura (densidade = 0,820 g/cm$^3$) eextremamente durável, enquanto o seu alburno é visivelmentemais pálidona cor, variando do branco ao cinza-branco. A grã da madeiraé reversa, geralmenteuniforme,coma textura de fina amédia. A Figura tangencial da madeira é em linhas vasculares, com pouco destaque, o brilho é ausente e com odor imperceptível (LABORATÓRIO DE PRODUTOS FLORESTAIS/ INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - LPF/IBAMA, 1998).

A casca éáspera, fibrosa, macia de coloração marrom amarelada, escamosa, formando pequenos mosaicos ou com grandes fissuras longitudinais (BROOKER; KLEINIG, 1994) (Figura 1E). Esta caractéristica da casca faz com que o *E.cloeziana* seja confundido coma espécie*Corymbia eximea*,embora não haja nenhumarelação entreestas duas espécie (WOOD SOLUTIONS, 2013). Ademais, apresenta um aumento linear no teor de casaca no sentido base-topo da árvore (OLIVEIRA et al., 1999).

Dentre os principais usos da madeira de *E. cloeziana,* destacam-se aqueles para asconstruções pesadas, como cais, pontes, escoras de mineração, dormentes, postes, postesestruturais, telhados, pórticos,decks (paisagismo), muros de arrimo, paredes, revestimentos externos,cercas, pisos epainéis (WOOD SOLUTIONS, 2013). Isso se deve ao fato de tratar de uma madeira altamenteresistente à deterioraçãoemcontato com o soloouemcondiçõesúmidas, malventiladas.Estas propriedades fazemcom que a madeira de *E. cloeziana* seja extremamente desejável também para a criação demobiliário de exteriores, bem como útil para uso como componentesde veículos, como carrocerias (WOOD SOLUTIONS, 2013).

O *E. cloeziana* é notado por sua excelente forma do tronco e durabilidade, apresentando uma fácil trabalhabilidade, aceitando prontamente pintura, desenhos e polimento. A madeira de desbates não comerciais de *E. cloeziana*, tratada termicamente, permitiu a construção de estruturas arqueadas, representando uma espécie potencial para a confecção de produtos inovadores (THIRION, 2007). Além disso, não há problemas com o encaixe de acessórios e fixação, porém, por se tratar de uma espécie de alta densidade, faz-se necessária a usinagem e preparação da superfície da madeira para receber a colagem. Gonçalez et al. (2006) avaliando as propriedades tecnológicas da madeira de *E. cloeziana*para a sua utilização na indústria moveleira, comprovaram a potencialidade do uso da espécie neste

setor. Interamnense (1998) também comprovou o grande potencial de utilização da madeira de *E. cloeziana* na indústria madeireira e laminadora.

Chen et al. (2010) ao avaliar oito diferentes espécies quanto à produtividade, forma do tronco e propriedades tecnológicas da madeira indicou o *E. cloeziana* como uma das melhores espécies com potencial para plantios para fins de produção de madeira sólida na China. A potencialidade da comercialização da madeira de desbaste de plantações de *E. cloeziana* com oito anos de idade também foi comprovada após extensos testes de propriedades mecânicas da madeirae de estudos de mercado (HOPEWELL et al., 2008).

A madeira de *E. cloeziana* não apresenta restrição a tratamentos térmicos com ar aquecido em estufas (CADEMARTORI et al., 2013). Os materiais preservantes de madeira impregnam rapidamente no alburno. Vivian (2006) relatou a maior resistência à deterioração de mourões de *E. cloeziana* tratados com arseniato de cobre cromatado (CCA) em autoclave, quando expostos a condições adversas ou em contato com o solo, em comparação com o *E. grandis*.

Adicionalmente, a madeira de *E. cloeziana* é de fácil secagem, sendo o processo de secagem da sua madeira mais rápido comparado ao de outras espécies de *Eucalyptus* (REDMAN; MCGAVIN, 2010). Na Argentina, um experimento com quatro espécies madeireiras com árvores de 13 a 14 anos, revelou que o *E. cloeziana* proporcionou a obtençãoda madeira recém serrada, sem empenamentos e rachaduras devido à forma retilínea do seu tronco (HOPEWELL, 2002).

A densidade da madeira de *E. cloeziana* é superior a de outras espécies plantadas, tais como *E. urophylla* e *E. grandis* e algumas procedências de *E. camaldulensis* (ALBINO; TOMAZELLO FILHO, 1985; MOURA et al., 1993; CHEN et al., 2010). Essa superioridade em densidade em relação a outras espécies de *Eucalyptus* é refletida na produção de carvão mais denso (MOURA, 1986), apresentando maior teor de carbono fixo no carvão e baixos teores de cinzas no processo de carbonização (GONÇALVES et al., 2010). No Brasil, o *E. cloeziana* corresponde a uma das principais espécies utilizadas para fins energéticos (COUTO et al., 2011).

A madeira de *E. cloeziana*não se mostrou adequada para a produção de celulose, necessitando de maiores cargas de reagentes para a pré-hidrólise e cozimento kraft, inviabilizando assim o seu uso (MEZZOMO, 1996).

### 1.1.1.4 Plantações de *E. cloeziana*

Em razão de combinar excelentes características tecnológicas da madeira e boas taxas de crescimento, o *E. cloeziana* é considerado uma das espécies candidatas para o estabelecimento de plantios comerciais, com objetivo de produção de madeireira (HOPEWELL et al., 2008; CHEN et al., 2010). A espécie apresenta potencial para ser utilizada não apenas em monocultivos, mas também em plantios mistos conforme concluíram Manson et al (2013), encontrando taxas de crescimento para o *E. cloeziana* similares aos de plantios comerciais. Outro aspecto que favorece o consórcio no plantio de *E. cloeziana*corresponde ao fato da espécie ser tolerante ao sombreamento (MARIANO, 2005). Além disso, o *E. cloeziana*apresenta estrutura de copa e forma do fuste favoráveis para utilização em sistemas silvipastoris (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS, 2011).

*E. cloeziana*é uma espécie susceptível à fortes geadas (CLARKE et al., 2009) e não se adapta bem em regiões com deficiência hídrica severa (NGUGI et al., 2004a). Portanto, recomendam-se evitar plantios em locais com incidências de geadas, altitudes superiores a 1.600 m e onde as deficiências hídricas sejam severas (IPEF, 2012).No entanto, procedências de regiões secas indicaram alta tolerância a altas temperaturas (NGUGI et al., 2003), podendo os plantios adultos tolerarem de 4 a 5 meses de seca (CLARKE et al., 2009).

Além disso, o *E. cloeziana* aparentemente é susceptível a fogo rasteiro e apresenta baixa capacidade de brotação de cepas (IPEF, 2012). A espécie também exige solos de média à boa fertilidade, no entanto, o seu plantio é recomendado também em solos de baixa fertilidade (DICKINSON; SUN, 1995).

Na Austrália, plantios de *E. cloeziana* tem sido estabelecidos para a produção de madeira para serraria nacostanorte dos estados deNew South Wales eQueensland (ALCORN et al., 2007; ALCORN et al., 2008; ALCORN et al., 2013), muitas vezes juntos comoutras espécies, como *E. pilularis, E. saligna, E. grandis,* espécies do gênero *Corymbia* e *E. dunnii* (POTTS et al., 2001; NOLAN et al.; 2005).

Plantações de *E. cloeziana* também foram estabelecidas em outras regiões do mundo. No sul da África o *E. cloeziana* é considerado uma das mais importantes espécies para reflorestamento, sendo plantado com sucesso no Congo, Quênia, Malawi, Nigéria, Moçambique, África do Sul, Zimbábue e Uganda, Zâmbia (MOURA, 2003). Os plantios são realizados, principalmente nas regiões de chuvas de verão com precipitação anual de 1000 a 1500 mm e uma estação seca de 4 a 5 meses (HOPEWELL et al., 2008). A madeira é destinada principalmente para a fabricação de postes telefônicos e de transmissão de energia, devido principalmente à retidão de seu fuste (BLEAKLEY; CANT, 1985). Além destas

aplicações, a madeira de *E. cloeziana* se destina a outros fins, tais como escoramento de mina, energia, serraria (DLAMINI, 1985; MUZOKE, 1985).

As taxas de crescimento da espécie são boas, produzindo mais de 30 $m^3$/ha.ano no Zimbábue (BLEAKLEY; CANT, 1985). Segundo esses autores na Nigéria, o crescimento médio anual das árvores ficou em torno de 1,8 m em um plantio de 5 anos na região de savanas, com as árvores mais altas atingindo 12,2 - 15,2 m de altura. Por outro lado, na região sul das savanas nigerianas, o crescimento médio anual foi de 2,1-2,4 m aos dois anos de idade, enquanto ao norte destas savanas as maiores árvores atingiram 14,6 m de altura aos 4,5 anos de idade. No Congo, plantios de 5,5 anos de idade de diferentes procedências de *E. cloeziana* atingiram 11,1 - 20,7 m de altura. (BLEAKLEY; CANT, 1985)

*E. cloeziana* é uma espécie considerada de introdução recente no Brasil, iniciando-se há mais de 30 anos (GOLFARI et al., 1978) e as introduções foram feitas por órgãos públicos, universidades e companhias privada (MOURA, 2003). As características tecnológicas da madeira de *E. cloeziana*, tais como a sua durabilidade atraiu o interesse para sua utilização em programas de florestamentos e reflorestamento no país (MOURA, 2003). Segundo o mesmo autor, o *E. cloeziana* demonstrou bom desempenho, tanto em regiões de mata como de cerrado. Ferreira e Silva (2004) recomendaram o plantio de *E. cloeziana* na região amazônica. Contudo, a espécie demonstrou variações genéticas sensíveis em relação aos parâmetros altura e diâmetro, variando de acordo com as características físicas de solo e do déficit hídrico dos locais de teste (SOUZA et al, 1992).

Os plantios de diferentes procedências de *E. cloeziana* também tem demonstrado variações quanto ao desempenho silvicultural da espécie. Além do bom crescimento de algumas procedências, estas também apresentam fuste reto, livre de galhos e madeira de coloração castanho-amarelada, forte, dura e extremamente durável, apta para serraria, postes, dormentes e carvão (MOURA, 2003).

De acordo com Moura (2003) nos chapadões do alto Vale do Jequitinhonha (MG), o *E. cloeziana* supera todas as demais espécies de *Eucalyptus* testadas. Nesta e em outras áreas, a espécie tem demonstrado variações genéticas sensíveis em relação aos parâmetros altura e diâmetro, destacando-se as procedências de Duaringa, Kennedy e de Atherton (MOURA et al., 1980; GOLFARI, 1982; TIMONI et al., 1983). Já no noroeste do estado de Minas Gerais, as famílias da procedência de Ravenshoe se destacaram pelo crescimento em diâmetro e tolerância à seca (JUNIOR et al., 1996). Por sua vez, Moura e Guimarães (1988) observaram que a procedência de Kennedy, foi a mais produtiva, com incremento em volume de 35 $m^3$/ha ano em condições de cerrado. Na região Nordeste, esta espécie também se mostrou com

potencial para a região subúmida úmida costeira, onde as procedências de Paluma e de Gympie apresentaram bom desenvolvimento (PIRES, 1983; FONSECA et al., 1986; GOLFARI; FERREIRA, 1986).

Entretanto, experimentos onde um maior número de procedências foi testado, são poucos relatados na literatura, destacando-se os realizados em Planaltina (DF), e na região de Ribeirão Preto, (SP). Em Planaltina, DF, as procedências que se destacaram como as mais produtivas foram as de Coominglah, Kennedy/Cardwell e Gympie (MOURA et al., 1993). Na região de Ribeirão Preto, as procedências também apresentaram bastante variação nos aspectos de crescimento sendo que as procedências de Cardwell, Monto e Ravenshoe foram as que apresentaram o melhor crescimento em altura (AGUIAR et al., 1988).

Ngugi et al. (2004b) relatam que o *E. cloeziana*apresenta uma alta variabilidade genética em razão da sua distribuição natural, com procedências de áreas com grandes diferenças de pluviosidade, temperatura e solos. Esses autores constataram maior tolerância à seca das procedências de *E. cloeziana* de áreas continentais em comparação àquelas costeiras. Berti (2011) também encontrou altos coeficientes de variação genética e herdabilidade para diâmetro a altura do peito (DAP), altura total, volume e forma, demonstrando um forte controle genético na herança destes caracteres em *E. cloeziana*, havendo a possibilidade de se obter altos ganhos com a seleção massal e individual entre e dentro de progênies.

Atualmente, no Brasil as plantações de *E. cloeziana* são de origem seminal e estão voltadas para a produção de madeira para a fabricação de carvão vegetal. O *E. cloeziana* corresponde a uma das principais espécies do gênero utilizadas para fins energéticos (COUTO et al., 2011). A produtividade dos plantios situa-se entre 26 a 37 m³/ha ano (Rogério Ramires, informação pessoal). Portanto, as áreas mais extensas de plantios estão nas regiões onde há empresas que produzem carvão para atender o setor siderúrgico, como nos estados de Minas Gerais e Mato Grosso.

O fornecimento de madeira e produção de carvão de reflorestamentos, a partir de plantios de *E. cloeziana*, reflete diretamente na redução da exploração madeireira das florestas nativas. Além disso, tendo em vista o uso múltiplo da sua madeira, o *E. cloeziana* pode ser cultivadopor pequenos, médios e grandes produtores com diversos fins. Entretanto, apesar das excelentes características tecnológicas da sua madeira e da crescente demanda de mercado por este produto, o plantio em larga escala do *E. cloeziana* ainda é restrito no país. Tal restrição está diretamente ligada às encontradas na propagação da espécie. Desse modo, pesquisas que tornem a propagação clonal do *E. cloeziana* mais efetiva tendem a aumentar o potencial de crescimento de todos os setores que a utiliza, como fonte de matéria-prima.

### 1.1.1.5 Propagação de *E. cloeziana*

No Brasil, as pesquisas com *E. cloeziana* tem sido concentradas nas empresas do setor de energia e de madeira serrada, em razão das potencialidades da madeira para esse fim. Embora a demanda comercial por madeira de qualidade incentive o aumento dos plantios de *E. cloeziana*, a espécie encontra-se em estágio inicial de domesticação, sendo os plantios realizados a partir de mudas seminais (CHEN et al., 2010, REDMAN; MCGAVIN, 2010).

Os programas de melhoramento existentes com *E. cloeziana* ainda são incipientes (FILHO; SANTOS, 2011) e, se limitam a estudos com procedências, com a seleção de árvores matrizes para a produção de sementes melhoradas, em diferentes empresas. Ainda é grande acarência de maiores estudos que visem, por exemplo, a hibridação do *E. cloeziana* com outras espécies de interesse comercial. Neste sentido, Stokoe et al. (2001) relatam a ocorrência rara de um híbrido natural entre *E. cloeziana,* subgênero *Idiogenes* e a espécie *E. acmenoides* do subgênero *Monocalyptus*.

Na produção de mudas a partir de sementes, o *E. cloeziana* apresenta restrições, ainda na fase de viveiro, tendo grande sensibilidade à repicagem (MOURA; GUIMARÃES, 2003). Além disso, as associações mutualísticas parecem ser necessárias para o crescimento das mudas. O fornecimento contínuo de nutrientes no viveiro tem efeito de curto prazo, com o aparecimento de sintomas de deficiência nutricional, que se extinguem com a adição de solo dos plantios maduros de *E. cloeziana* ao substrato (ARAÚJO et al., 2004).

A estaquia é o método de propagação clonal mais utilizado para o *Eucalyptus*, consistindo em uma estratégia de clonagem de sucesso para diversas espécies (ALMEIDA et al., 2007; XAVIER; SILVA, 2010). A adoção desta técnica depende do resgate de árvores selecionadas na idade adulta. No caso específico do *E. cloeziana,* Almeida et al. (2007) constataram que o resgate de árvores selecionadas por brotações de cepas é uma técnica com potencial para a clonagem dessa espécie. Esses mesmos autores avaliando o resgate por anelamento de caule e por indução de brotações epicórmicas, em galhos podados, constataram a viabilidade dessas duas técnicas também para a indução de brotações para *E. cloeziana*. Porém, ainda se faz necessário maiores estudos a respeito do enraizamento adventício das estacas extraídas de brotações epicórmicas.

As dificuldades encontradas no processo de mudas clonais de certos clones e algumas espécies conduziram ao aperfeiçoamento da técnica de estaquia, com o desenvolvimento de uma nova metodologia denominada de miniestaquia (XAVIER et al., 2010). Atualmente, a miniestaquia constitui-se no método mais adotado pelas grandes empresas florestais brasileiras para a clonagem de *Eucalyptus* (ALMEIDA et al., 2007). A

propagação de *Eucalyptus* via miniestaquia  sido alvo de numerosos estudos (BRONDANI et al., 2010). Dentre esses trabalhos, destaca-se o trabalho de miniestaquia de Almeida et al. (2007) com sete clones de *E. cloeziana,* que obtiveram altos índices de enraizamento de miniestacas, apesar destes apresentaram variação quanto ao potencial de enraizamento. Trueman et al. (2013) avaliando o efeito da temperatura sobre a produção das minicepas de *E. cloeziana* observaram que temperaturas em torno de 33 °C foram mais efetivas para promover o acréscimo na produção de miniestacas pelas minicepas e elevar os percentuais de enraizamento das mesmas.

As informações sobre a propagação de *E. cloeziana* por meio das outras técnicas de clonagem, são escassas, havendo apenas o relato do trabalho de Howard e Eldridge (2005), no qual realizou-se a enxertia seriada de brotações, entretanto, não obtendo-se resultados satisfatórios.

De forma geral, apesar dos avanços na silvicultura clonal, a propagação de *E. cloeziana* pelo enraizamento adventício de estacas, constitui um fator limitante para a produção de mudas clonais em escala comercial, sendo a espécie considerada, por muitos autores, como de difícil enraizamento em comparação às demais espécies do gênero (ALFENAS et al., 2009). Portanto, as restrições encontradas na propagação do *E. cloeziana* correspondem ao principal entrave encontrado para a expansão dos plantios. Dessa forma, a espécie carece de maiores estudos quanto à sua propagação clonal, na expectativa de fornecer suporte aos programas de melhoramento que visem à seleção de clones, e consequentemente o estabelecimento de plantios comerciais.

### 1.1.2 Resgate de árvores adultas de *Eucalyptus*

Na micropropagação, a utilização de explantes com características juvenis tem relevante importância para o seu sucesso, em razão do menor grau de diferenciação dos tecidos vegetais e, portanto, mais responsivos às técnicas decultivo *in vitro* (XAVIER et al., 2009). Desse modo, para a escolha da fonte de explantes, um dos principais pré-requisitos considerados encontra-se na coleta de propágulos de partes da planta com características juvenis. As brotações constituem oprincipal tipo de explante utilizado para a propagação *in vitro* de árvores adultas de *Eucalyptus*.

Entretanto, os genótipos de *Eucalyptus* de interesse para o setor florestal são selecionados na idade adulta, onde ocorre um decréscimo natural da capacidade de propagação desses materiais genéticos (ALMEIDA et al., 2007). Dessa forma, para obter sucesso na micropropagação desses materiais genéticos é necessário explorar a maior

capacidade de propagação de material juvenil, selecionando explantes para a introdução *in vitro* com características juvenis. Neste contexto, o resgate de propágulos de árvores selecionadas de *Eucalyptus*, com características juvenis pode ser realizado pela decepa da árvore para a emissão de brotações basais (XAVIER et al., 2009). Porém, há outras formas não destrutivas de resgate que podem ser utilizadas, principalmente na impossibilidade de realizar a decepa da árvore, como, por exemplo, anelamento ou mesmo semi-anelamento de caule, indução de brotações epicórmicas em megaestacas (galhos podados da base da copa), aplicação do fogo na base da árvore, resgate por enxertia (ALFENAS et al., 2009).

A indução de brotações epicórmicas em megaestacas corresponde à técnica de mais simples aplicação e menor custo de realização. O uso dessa técnica de resgate vegetativo para a micropropagação de materiais adultos foi realizada com sucesso de *Ocotea odorífera* (JANKOWSKI; GRAÇA, 1993), *Ilex paraguariensis* (WENDLING; SOUZA JUNIOR et al., 2003), *E. cloeziana* (ALMEIDA et al., 2007), *Arbutus undedo* (GOMES; CANHOTO, 2009), *Cupressus lusitanica* (KRATZ et al., 2010), *E. benthamii* (BACCARIN, 2012).

As espécies apresentam amplas diferenças anatômicas e morfológicas do meristema e tecidos relacionados do qual se desenvolverãoas brotações epicórmicas (BURROWS et al., 2008). Meier et al. (2012) descreveram que a presença de grupos de células meristemáticas na casca das árvores são responsáveis pela produção contínua, porém, efêmera de brotações epicórmicas nas espécies da família Myrtaceae, correspondendo ao evento de formação de brotações epicórmicas em megaestacas de *Eucalyptus.* De acordo com Florence (2004) estas células correspondem a um feixe celular com características meristemáticas derivadas da axila das folhas, que não é ocluído pelo crescimento em diâmetro dos galhos. O autor relata ainda, que um feixe celular com características meristemáticas cresce radialmente para fora da região da gema axilar em uma taxa de crescimento similar ao crescimento em diâmetro do galho. As células meristemáticas conferem às árvores a capacidade de produzir gemas continuadamente, por um longo período de tempo (CREMER, 1972; BURROWS, 2002), podendo persistir por toda a vida das mesmas (MEIER et al., 2012).

Os centros meristemáticos a partir dos quais originam as brotações epicórmicas de *Eucalyptus* estão próximos ao câmbio vascular que podem estar presentes desde a superfície do fuste da árvore até áreas mais profundas, próximas ao xilema secundário (BURROWS, 2002; BURROWS et al., 2008; BURROWS et al., 2010; WATERS et al., 2010). A estrutura dos centros meristemáticos é amplamente conservada nas espécies de *Eucalyptus* e outros gêneros correlacionados (BURROWS, 2002; BURROWS, 2008; BURROWS et al., 2010; CRISP et al., 2011). Os centros meristemáticos compõem-se deuma matriz principalmente de

célulasparenquimáticas, muitos delas com compostos fenólicos, nas quais foram inseridas radialmente células consideradas meristemáticas, por serem pequenas, isodiamétricas, organizadas, de paredes finas, comnúcleos grandesecitoplasma denso (WATERS et al., 2010). Todavia, os estudos a respeito das brotações epicórmicas ainda são escassos, quando comparados àqueles para brotações apicais ou axilares.

A idade ontogênica do propágulo possivelmente é o fator determinante para o sucesso do resgate por meio de megaestacas. Ressalta-se que as brotações epicórmicas são definidas por alguns autores como ontogeneticamente juvenis (DEL TREDICI, 2001), porém, não sendo totalmente exata essa pressuposição (CAMERON; SANI, 1994), por causa da posição onde as megaestacas se encontram na copa da árvore, uma vez que consiste de tecidos fisiologicamente maduros (ALFENAS et al., 2009). E, ainda não há estudos que expliquem se a longevidade das brotações é limitada por efeitos fisiológicos ou agentes físicos de maneira a entender se as brotações possuem algum nível de maturação (MEIER et al., 2012).

De maneira geral, novos estudos são necessários para a compreensão do desenvolvimento das brotações epicórmicas em espécies de *Eucalyptus*. Há carência de estudos fisiológicos detalhados e da influência dos fatores abióticos sobre o potencial das megaestacas de *Eucalyptus* em produzir brotações epicórmicas. A elucidação de questões sobre a formação das brotações epicórmicas contribuirão para a maior aplicação prática dessa técnica de resgate.

### 1.1.3 Micropropagação de *Eucalyptus*

A micropropagação na área florestal apresenta grande potencial de utilização na silvicultura clonal e na indústria de base florestal (PENCHEL et al., 2007; XAVIER et al., 2009; XAVIER, OTONI, 2009). Dentre as suas principais aplicações está à necessidade de clonar espécies ou híbridos que tenham altas taxas de crescimento, tolerância a baixas temperaturas e salinidade, resistência a pragas e doenças (DUTRA et al., 2009).

Neste contexto, a micropropagação representa uma alternativa para a multiplicação dos genótipos de interesse comercial, contornando as dificuldades encontradas por meiodo uso das técnicas de propagação, comumente aplicadas no setor florestal (OLIVEIRA et al., 2012). A dificuldade de enraizamento de estacas de alguns materiais genéticos de *Eucalyptus* é atribuída à maturação do material vegetal (ALMEIDA et al., 2007). Assim, justifica-se a adoção da micropropagação para a reversão ao estado juvenil (ANDREU; MARÍN, 2005).

Dessa forma, a micropropagação possibilita a ampliação do número dos materiais genéticos utilizados pelo programa de melhoramento florestal. Os materiais genéticos que

seriam anteriormente rejeitados pelos métodos tradicionais de propagação podem ser utilizados, possibilitando o aumento nos ganhos, devido a maior variabilidade genética explorada, pelo uso de maior número de genótipos superiores para várias características de interesse (ASSIS; MAFIA, 2007). Além disso, a micropropagação constitui a base para o emprego de outros processosbiotecnológicos, como a transformação genética (XAVIER et al., 2009).

A micropropagação via proliferação de gemas axilares corresponde ao principal método de cultivo*in vitro* de *Eucalyptus*, com diversos trabalhos relatando o uso dessa metodologia para a clonagem de espécies deste gênero (XAVIER et al., 2010). No entanto, há carência de trabalhos de micropropagação de *E. cloeziana* para fins de rejuvenescimento de materiais adultos.

A propagação *in vitro* é constituída de fases que incluem desde a seleção dos explantes para a introdução *in vitro* até a aclimatização *ex vitro* das mudas. Todavia, diversos fatores influenciam as diferentes etapas da micropropagação e os materiais genéticos apresentam especificidades quanto ao cultivo *in vitro* (BORGES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011), exigindo a adequação de metodologias para os materiais genéticos estudados, de forma a realizar com sucesso o cultivo *in vitro*.

O estabelecimento *in vitro* consiste na primeira etapa da micropropagação, sendo considerada uma das fases mais críticas, principalmente quando se trata de material adulto de espécies lenhosas, em razão das dificuldades de respostas dos propágulos e da descontaminação dos explantes (XAVIER et al., 2009). O estabelecimento *in vitro* inicia-se com o manejo das plantas matrizes e a seleção dos explantes mais adequados para a micropropagação e finaliza-se com a obtenção de uma cultura adaptada às condições *in vitro* (BORGES et al., 2011).

Diversos fatores, como o estado fisiológico da planta matriz, tipo de explante, tamanho do explante, estação do ano, reguladores de crescimento, meios de cultura, fonte carboidratos, pH, agentes gelificante, sucessivos subcultivos tem influência direta na micropropagação de *Eucalyptus* (CRESSWELL; NITSCH, 1974; BORGES et al., 2012). O vigor fisiológico do genótipo corresponde a uma das principais variantes que determinam o sucesso da resposta *in vitro* do explante. Este vigor altera-se ao longo das estações do ano, e também com a idade da planta matriz. O efeito das estações do ano no estabelecimento *in vitro* foi reportado para *E. tereticornis* (SHARMA; RAMAMURTHY, 2000), *Tectona grandis* (TIWARI et al., 2002), *E. globulus spp. maidenii* (SOTELO; MONZA, 2007).

Na micropropagação a seleção dos explantes para iniciar o cultivo *in vitro* deve-se considerar aspectos como o nível de diferenciação do tecido utilizado e o objetivo (BASSAN et al., 2006). Os segmentos nodais correspondem a um dos principais explantes utilizados na micropropagação de genótipos adultos de *Eucalyptus* (BENNETT et al., 1994; BISHT et al., 1999; JOSHI et al., 2003; ALMEIDA et al., 2008; BRONDANI et al., 2009). Todavia, outros explantes provenientes de árvores adultas podem ser utilizados no estabelecimento *in vitro* de *Eucalyptus,* tais como ápices caulinares (GOMES; CANHOTO, 2003) e brotações epicórmicas (CORREIA et al., 1995; TRINDADE; PAIS, 1997; GOODGER et al., 2008). O uso de explantes apicais é recomendado quando a contaminação endógena dos tecidos é muito alta, pois esses explantes apresentam menores taxas de contaminação (BORGES et al., 2012). Por sua vez, brotações epicórmicas são utilizadas como explantes para o regate de genótipos adultos no campo.

A oxidação fenólica, a contaminação por fungos e bactérias e a recalcitrância de alguns materiais genéticos têm sido os principais problemas encontrados no estabelecimento *in vitro* (GEORGE, 2008). Os tratamentos aplicados à planta matriz, doadora dos explantes relacionados às melhorias nas suas condições fisiológicas e fitossanitárias, bem como na otimização no uso das substâncias desinfestantes e nas condições ambientais de cultivo *in vitro* são determinantes para reduzir perdas no estabelecimento *in vitro* de *Eucalyptus* e obter sucesso nas demais fases da micropropagação (XAVIER et al., 2009).

Os explantes uma vez estabelecidos *in vitro* e emitindo novas brotações são induzidos a multiplicarem em sucessivos subcultivos. O principal objetivo da etapa de multiplicação *in vitro* corresponde à produção de um grande número de brotações, através da quebra da dominância apical e promoção da multiplicação das brotações axilares (WATT, 2013). A multiplicação *in vitro* das brotações é dirigida por um adequado balanço hormonal entre auxinas e citocininas (DUTRA et al., 2009). As citocininas são utilizadas extensivamente na micropropagação para a produção e manutenção das brotações nas culturas *in vitro*. O regulador de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) corresponde à citocinina mais utilizada na micropropagação de *Eucalyptus spp*. (ALVES et al., 2004a; BUNN, 2005). Contudo, outros reguladores de crescimento com atividades de citocininas, como a cinetina (CIN), o thidiazuron (TDZ), *2*-isopentenyladenina (2ip) também tem sido utilizados (DUTRA et al., 2009).

As auxinas são quase que invariavelmente requeridas no cultivo *in vitro* para promover o crescimento inicial dos meristemas e ápices caulinares (GEORGE et al., 2008). As auxinas são utilizadas conjuntamente com as citocininas no meio de cultura, desde que

tenham um efeito sinérgico no crescimento e desenvolvimento *in vitro*, sendo muitas vezes impossível determinar se um efeito particularmente deve-se à auxina, à citocinina ou a combinação de ambos os reguladores de crescimento (ASCOUGH; FENNELL, 2004). As principais auxinas utilizadas na micropropagação de *Eucalyptus* correspondem ao ácido indol acético (AIA), o ácido α-naftaleno acético (ANA), o ácido 3-indol butírico (AIB) (NAKHOODA et al., 2012).

Os protocolos de micropropagação de *Eucalyptus* são baseados em manipulações empíricas dos reguladores de crescimento, principalmente as auxinas e citocininas para direcionar a morfogênese *in vitro* (NAKHOODA et al., 2011). Em geral, altas concentrações de citocininas e baixas concentrações de auxinas são utilizadas para promover a multiplicação *in vitro*. A associação do BAP com ANA proporcionou bons resultados para a multiplicação de brotações de *E. globulus* (CALDERÓN-BALTIERRA, 1994; SOTELO; MONZA, 2007, CORDEIRO, 2013), *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii* (BRONDANI et al., 2009), *E. nitens* (GOMES; CANHOTO, 2003), híbridos de *E. globulus* (BORGES et al., 2011), *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (OLIVEIRA et al., 2011), *E. benthamii* (BRONDANI et al., 2012), *E. citriodora* (ALMEIDA, 2012). No caso de *Eucalyptus camaldulensis* x *E. tereticornis* a associação de BAP e AIB proporcionou melhor resultado quanto à multiplicação *in vitro* das brotações (ARYA et al., 2009). Em alguns casos o uso apenas da citocinina é suficiente (GEORGE et al., 2008). A adição exclusivamente de BAP ao meio de cultura foi eficiente para promover a propagação de *Eucalyptus tereticornis* x *E. grandis* (JOSHI et al., 2003), ou ainda associado com CIN na multiplicação de *E. impensa* (BUNN, 2005).

Ressalta-se que modificações não apenas quanto às concentrações dos reguladores de crescimento pode favorecer multiplicação *in vitro.* Por exemplo, a alternância do uso de BAP e cinetina na multiplicação *in vitro*produziu maior número de brotações de material adulto de *Eucalyptus globulus* (BENNETT et al., 1994).

Na fase de multiplicação, eventualmente pode também haver o desenvolvimento de colônias bacterianas na interface explante e meio de cultura, denominando este evento como manifestação de microrganismos latentes endofíticos (THOMAS et al., 2007; MARINO et al., 2009). A relação planta/microrganismos endofíticos é complexa e estes últimos podem favorecer o desenvolvimento dos propágulos (ESPOSITO-POLESI, 2011; LEONE, 2013). Essa associação foi benéfica na micropropagação de três clones de *E. benthamii*, evidenciada pelos incrementos de massa seca das brotações e na promoção do alongamento das mesmas, favorecendo a posterior aclimatização destes materiais genéticos (PIOTTO, 2013).

O sucesso da micropropagação é influenciado por diversos fatores, dentre os quais o meio de cultura. As exigências nutricionais consideradas ideais variam amplamente entre os genótipos e os sistemas de cultivos (RAMAGE; WILLIANS, 2002). No entanto, os meios de cultura utilizados na micropropagação são baseados em formulações empíricas (KANASHIRO et al., 2007). Especificamente para *Eucalyptus,* o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é o mais amplamente utilizado nos trabalhos de micropropagação (BRONDANI et al., 2011). Os meios de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) e JADS (CORREIA et al., 1995) também tem sido utilizados no cultivo *in vitro* de *Eucalyptus* (OLIVEIRA et al., 2011).

Na micropropagação de *Eucalyptus* é desejável que a multiplicação e o alongamento das brotações ocorram simultaneamente. Contudo, devido à recalcitrância de determinados genótipos ao cultivo *in vitro* é necessária uma fase de alongamento *in vitro* (DUTRA et al., 2009). De forma geral, o alongamento *in vitro* é estimulado por alterações no balanço hormonal e redução das concentrações dos sais dos meios de cultura (ARYA et al., 2009, BRONDANI et al., 2009). A redução das concentrações de citocinina utilizada na fase de multiplicação, também é suficiente para induzir o alongamento das brotações, conforme observado para *Eucalyptus urophylla* (SANTOS et al., 2004), *E. globulus spp. maidenii* (SOTELO; MONZA, 2007). Além disso, a adição de ácido giberélico (GA) ao meio de cultura também tem sido relatado como favorável para promover o alongamento de brotações de *E. impensa* (BUNN, 2005), *E. tereticornis* x *E. grandis* (JOSHI et al., 2003).

A etapa seguinte à multiplicação e o alongamento *in vitro* corresponde ao enraizamento das brotações, o qual pode ser realizado em condições *in vitro* ou *ex vitro*. O enraizamento *in vitro* de brotações alongadas de *Eucalyptus* tem sido obtido com adição de auxinas ao meio de cultura, geralmente o AIB (DUTRA et al., 2009). A redução da concentração dos sais minerais também provou ser importantes para induzir a rizogênese *in vitro* de brotações de *Eucalyptus torelliana* x *E. citriodora* (KAPOOR; CHAUHAN, 1990), *E. tereticornis* (SHARMA; RAMAMURTHY, 2000). Entretanto, o enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus* pode ser dispensado, sendo este realizado em condições *ex vitro* simultaneamente à aclimatização (BRONDANI et al., 2012).

O enraizamento *ex vitro* proporciona vantagens em relação à redução dos custos do processo de micropropagação, reduz tempo de formação da muda e induz a formação de mudas clonais com sistema radicular nas microestacas de melhor qualidade, mais completo e funcional, com maior número de raízes secundárias, formação da raiz sem a passagem intermediária de calo (XAVIER; OTONI, 2009; FERMINO JÚNIOR et al., 2011). Todavia, o

enraizamento de *Eucalyptus* mesmo sendo realizado em condições *ex vitro* é influenciado pelo cultivo *in vitro* uma vez que o tipo de auxina e sua estabilidade relativa e concentração utilizada na micropropagação influencia diversos aspectos da rizogênese, incluindo na fase de aclimatização, como por exemplo, a arquitetura do sistema radicular (NAKHOODA et al., 2012).

A última fase da micropropagação corresponde à aclimatização a qual é crítica em razão do estresse causado pela diferença existente entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro* (DUTRA et al., 2009), correspondendo ao principal fator limitante para a aplicação prática desta técnica (CHANDRA et al., 2010; AGGARWAL et al., 2010). As plantas cultivadas *in vitro*, dadas às condições de umidade e luminosidade a que são submetidas, sofrem alterações fisiológicas e morfológicas durante seu desenvolvimento (BANDEIRA et al., 2007). Entre essas alterações, destaca-se a perda da camada de cera epicuticular, que minimiza a taxa de transpiração (MATHUR et al., 2008). Os estômatos não são funcionais, com formato e estrutura anormais e suas células guardas possuem paredes celulares finas (CHANDRA et al., 2010). Em decorrência disso, para muitas espécies as folhas formadas *in vitro* são incapazes de desenvolver nas condições *ex vitro* sendo, portanto, substituídas por novas folhas (DIETTRICH et al., 1992). Na aclimatização a espessura das folhas aumenta, o mesófilo foliar se diferencia em parênquima paliçádico e esponjoso, a densidade estomática reduz e os estômatos mudam do formato circular para elíptico, ocorrendo aindao desenvolvimento da cutícula e formação de cera epicuticular e uma efetiva regulação estomática da transpiração (POSPÍSILOVÁ et al., 1999).

Dentre as estratégias adaptativas, as plantas na aclimatização devem desenvolver mecanismos de controle da transpiração e condutância estomática, ativar os mecanismos de controle de perda de água pelas células e aumentar a taxa fotossintética em condições de atmosfera mais rica em $CO_2$ (FERMINO JÚNIOR et al., 2011). Nesse sentido, para aumentar o sucesso na aclimatização das plantas micropropagadas as pesquisas tem sido focadas no controle das condições ambientais (DEB; IMCHEN, 2010).

De maneira geral, as microestacas de *Eucalyptus* obtidas a partir das brotações alongadas *in vitro* são aclimatizadas em casa de vegetação, conforme relatado para *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* (BANDEIRA et al., 2007), *E. tereticornis* (AGGARWAL et al., 2012). No entanto, alternativas tem sido propostas, como por exemplo, a aclimatização de microestacas de *E. saligna* utilizando um sistema hidropônico (SILVA et al., 2011) e de *E. benthamii* em miniestufas (BRONDANI et al., 2012).

Neste contexto, ainda há a necessidade de continuidade dos estudos de micropropagação de *Eucalyptus*, no sentido de maximizar as etapas que compõem o processo e estabelecimento de protocolos aplicáveis para diversas espécies do gênero, principalmente para genótipos adultos.

### 1.1.4 Rejuvenescimento *in vitro*

Na área florestal, a seleção dos genótipos superiores para a clonagem dentro dos programas de melhoramento é realizada na idade adulta. Porém para espécies lenhosas como *Eucalyptus*, durante a transição da fase juvenil para a fase adulta ocorrem mudanças consideráveis nas plantas, dentre as quais alterações na capacidade de enraizamento adventício de propágulos (WENDLING; XAVIER, 2001; MANKESSI et al., 2010). A transição juvenil-adulta que ocorre nas árvores é caracterizada por ser altamente determinada, com a retenção dos meristemas de uma "memória" da sua posição na árvore (topófise) ou gradiente de maturação da planta matriz (ciclófise), portanto, sendo um evento virtualmente irreversível (ADERKAS; BONGA, 2000).

Em razão disso, a estaquia de muitas espécies do gênero *Eucalyptus* é limitada pela variabilidade no enraizamento entre os materiais genéticos e pelo decréscimo no potencial rizogênico dos materiais genéticos com o aumento da idade das plantas matrizes (PINTO et al., 2002). Portanto, há necessidade de utilizar propágulos provenientes de partes juvenis da planta ou adotar práticas de rejuvenescimento de materiais genéticos adultos (TITON et al., 2002). Diferentes metodologias são descritas para o rejuvenescimento (reversão da maturidade) de materiais adultos de espécies perenes, entre as quais estão a enxertia seriada, podas drásticas, estaquia seriada e a micropropagação (XAVIERet al., 2009).

A micropropagação tem sido considerada a técnica mais eficiente para rejuvenescer genótipos adultos de *Eucalyptus* (WENDLING; XAVIER, 2001; DUTRA et al., 2009). A reversão à juvenilidade de árvores adultas tem sido obtida com a aplicação exógena de giberelinas e citocininas, subcultivos sucessivos, especialmente em meio suplementado com citocininas e pela realização de microenxertia *in vitro* (CHANG et al., 2010). Atualmente, para *Eucalyptus* a principal aplicação da micropropagação tem sido o rejuvenescimento de materiais genéticos selecionados, objetivando a produção de mudas comerciais ou matrizes doadoras de estacas e miniestacas (DEL PONTE, 2001; GOMES; CANHOTO, 2003; DUTRA et al., 2009; XAVIER et al., 2009). Resultados positivos utilizando esta metodologia foram reportados para *E. grandis* (TITON et al., 2002), *E. benthamii*, *E. dunnii* e seus híbridos (BRONDANI et al., 2011, 2012), *Vaccinium cylindraceum* (PEREIRA, 2009).

O rejuvenescimento *in vitro* ocorre devido o processo de maturação ser um evento reversível e ser desencadeado, principalmente por estímulos externos que afetam o meristema apical (DAY et al., 2002). Assim, a reversão à juvenilidade não é um evento simplesmente genético, sendo um processo epigenético que dirige a diferenciação celular (BRAUTIGAM et al., 2013). Dessa forma, a expressão do genoma dependente das condições físicas e químicas em que o material é submetido enquanto é cultivado *in vitro* (PAN; STADEN, 1998). O cultivo *in vitro* cria condições favoráveis para a exclusão de fatores estressantes que poderiam desencadear ou manter o processo de maturação, mas, sobretudo mantém os explantes em um processo de crescimento que favorece a multiplicação de células jovens (RIBEIRO, 1993).

Na micropropagação, o subcultivo sucessivo dos explantes adultos promove o seu rejuvenescimento *in vitro*, restaurando consequentemente a sua capacidade rizogênica e promovendo a homogeneização fisiológica dos tecidos, seja em potencial de enraizamento ou qualidade do sistema radicular (ASSIS; MAFIA, 2007). A rápida multiplicação de células jovens promovida pelo cultivo *in vitro*, provavelmente está ligada ao rejuvenescimento de materiais genéticos obtido na micropropagação (ADERKAS; BONGA, 2000), uma vez que a mudança de fase juvenil-adulta é determinada pela taxa de células juvenis e adultas no meristema apical (GREENWOOD, 1995). Essa evidência foi detectada no rejuvenescimento de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* no qual a presença de células indiferenciadas no meristema apical de brotações cultivadas *in vitro* foram relacionadas à reversão à juvenilidade destes genótipos (MANKESSI et al., 2011).

Desde a década de 80 diversos trabalhos têm sido realizados estudando a transição da fase juvenil para a adulta nas espécies arbóreas, para a definição de marcadores que possibilitem a demarcação de quando ocorre essa mudança e como estes marcadores podem ser utilizados na prática para quantificar o rejuvenescimento dos genótipos empregando as diferentes técnicas citadas (ADERKAS; BONGA, 2000). Proteínas (BON, 1988; BERTHON et al., 1987; BON; MONTEUUIS, 1991; KUO et al., 1995; HUANG et al., 1995, 2003b, 2003a; GARCIA et al., 2000; CHANG et al., 2010), e antocianinas (MURRAY et al., 1994) foram definidas como marcadores de rejuvenescimento em espécies arbóreas. Estes marcadores bioquímicos ocorrem como parte do metabolismo primário e secundário das plantas (nutrição mineral, hormônios vegetais, poliaminas, compostos fenólicos e atividade de peroxidases) (CHANG et al., 2010).

A transição para a fase adulta nas espécies arbóreas também provoca alterações morfológicas, como a redução da capacidade de enraizamento adventício, modificação da morfologia foliar, mudança na arquitetura da copa, diminuição da taxa de crescimento e

variação nos níveis dos hormônios vegetais (GUPTA et al., 1991; DAY et al., 2002; MONTEUUIS et al., 2008; NYITRAI et al., 2009). Recentemente, mudanças histológicas no meristema apical provaram serem determinantes para detectar a reversão à juvenilidade *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* (MANKESSI et al., 2011).

Avaliações a nível molecular também tem sido alvo de estudos para a compreensão da mudança da transição juvenil-adulta nas plantas e consequentemente compreensão do processo de rejuvenescimento *in vitro*. A alteração da expressão gênica tem sido considerada o principal fator envolvido na transição juvenil-adulta nas árvores, estando provavelmente correlacionada a um mecanismo epigenético (RIBEIRO, 1993). Diante disso, associaram-se aumentos nas taxas de metilação do DNA com a maturação dos tecidos (BONGA, 1982; FRAGA et al., 2002). Entretanto, maiores níveis de metilação do DNA foram encontrados em explantes juvenis comparados a adultos de *Accacia mangium* (BAURENS et al., 2004), *Castanea sativa* (HASBÚN et al., 2005) *Sequoiadendron giganteum* (MONTEUUIS et al., 2008). Portanto, não há ligação direta entre alteração no nível de metilação do DNA e a maturidade das espécies arbóreas, evidenciando que isto não explica a variação no comportamento celular e que há outros níveis de regulação e controle (RIBEIRO et al., 1993).

De maneira geral, o processo de rejuvenescimento *in vitro* ainda não está completamente elucidado, devido às limitações referentes à compreensão da transição juvenil-adulta que ocorre nas espécies arbóreas. Os recentes avanços na biologia molecular poderão contribuir para esclarecer as questões pertinentes à reversão à juvenilidade e assim, contribuir para a ampla utilização da micropropagação para rejuvenescer genótipos de interesses.

### 1.1.5 Regeneração *in vitro* de *Eucalyptus*

A propagação clonal *in vitro* de *Eucalyptus* não se restringe apenas à micropropagação via proliferação de gemas axilares, mas também é realizada por meio das técnicas de embriogênese somática e organogênese (XAVIER et al., 2009). Geralmente, as taxas de multiplicação de culturas embriogênicas ou organogênicas excedem àquelas resultantes da micropropagação por meioda proliferação de gemas axilares (TITON et al., 2002).

A embriogênese somática é uma ferramenta com grande potencial para propagação clonal em larga escala de espécies florestais, tendo dentre as aplicações práticas, o melhoramento da produção (através de seleção de células, transformação genética, hibridação somática e produção de plantas poliplóides), preservação de germoplasma, eliminação de vírus e inoculação de micorrizas *in vitro* (MERKLE; NAIRN, 2005; POUPIN; ARCE-

JOHNSON, 2005). As plantas, obtidas a partir dos embriões somáticos, podem ser multiplicadas em larga escala pela técnica de microestaquia. Entretanto, dificuldades ainda residem na embriogênese somática o que tem limitado o estabelecimento de protocolos para todas as espécies de *Eucalyptus.* Nesse sentido, a organogênese apresenta-se como uma alternativa promissora para a propagação das espécies de *Eucalyptus*. Na área florestal a organogênese tem sido aplicada na conservação de germoplasma *in vitro*, na regeneração de diversas espécies, bem como na obtenção de plantas transgênicas (DUTRA et al., 2009).

A regeneração *in vitro* de *Eucalyptus* através da organogênese tem sido relatada para algumas espécies tais como *E. tereticornis* (SUBBAIAH; MINOCHA, 1990; AGGARWAL et al., 2010; PRAKASH; GURUMURTHI 2005), *E. grandis* (WARRAG et al., 1991), *E. grandis* x *E. urophylla* (BARRUETO CID et al., 1999; TOURNIER et al., 2003, HAJARI et al., 2006), *E. nitens* (BANDYOPADHYAY et al., 1999), *E. globulus* (TRINDADE; PAIS, 2003; NUGENT et al., 2001), *E. camaldulensis* (MURALIDHARAN; MASCARENHAS, 1987; AREZKI et al., 2001; DIBAX et al., 2005; GIRIJASHANKAR, 2012), *E. erythronema*, *E. stricklandii*e seus híbridos interespecíficos (GLOCKE et al., 2006), *E. gunnii* (HERVÉ et al., 2001).

Os eventos organogênicos ocorrem mediante a desdiferenciação e rediferenciação celular, dependendo da retomada da atividade meristemática em células maduras diferenciadas ou em um tecido calogênico desorganizado (ALVES et al., 2004a). O processo de organogênese *in vitro* é complexo, com atuação de múltiplos fatores externos e internos envolvendo interação entre fonte de explante, meio de cultura e fatores ambientais (OLIVEIRA et al., 2013). O processo de organogênese depende, também, da ação de reguladores de crescimento, em particular auxinas e citocininas, e da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo (ALVES et al., 2004a, 2004b).

Na maioria dos trabalhos realizados visando à propagação *in vitro* de *Eucalyptus* via organogênese, utilizaram-se materiais juvenis como fonte de explantes, tais como hipocótilos, cotilédones, caule e folhas de material jovem provenientes de sementes e embriões zigóticos (GLOCKE et al., 2006; HAJARI et al., 2006). Entretanto, o uso de material adulto, bem como a possibilidade e otimização de protocolos eficientes de micropropagação de clones superiores poderia constituir-se em alternativa no processo de multiplicação vegetativa, além de atender a programas de transformação genética. Os únicos trabalhos de organogênesereportados com explantes obtidos a partir de genótipos adultos foram para *E. grandis* (LAINÉ; DAVID, 1994) e *E. camaldulensis* (MULLINS et al., 1997).

Contudo, métodos eficientes para regeneração de clones selecionados utilizando como explantes folhas e segmentos caulinares de material rejuvenescido, poderiam constituir-se em alternativa de clonagem, além de atender a programas de transformação genética. Diante da escassez de informações referentes à regeneração*in vitro* em tecidos adultos de *Eucalyptus*, faz-se necessária a adequação de protocolos utilizando explantes coletados de clones selecionados. A utilização de material rejuvenescido *in vitro* possibilitaria melhor "performance" da capacidade organogênica dos explantes (MARTÍNEZ et al., 2012).

**Referências**

AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Shoot organogenesis from elite plants of *Eucalyptus tereticornis*.**Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, n. 1, p. 45–52, 2010.

AGUIAR, I.B. de; CORRADINI, L.; VALERI, S.V.; RUBINO, M. Comportamento de procedências de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. na região de Ribeirão Preto (SP) até a idade de cinco anos e oito meses. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 12, n. 1, p. 12-24, 1988.

AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; SHARMA, J.; REDDY, M.S. Factors affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm. ***In Vitro*** **Cellular Development Biology – Plant**, Columbia, v. 48, n. 5, p. 521–529, 2012.

ADERKAS, P.; BONGA, J. M.Influencing micropropagation andsomatic embryogenesis in mature trees by manipulation phasechange, stress and culture environment. **Tree Physiology**, Oxford, v. 20, n. 14, p. 921–928, 2000.

ALBINO, J.C.;TOMAZELLO FILHO, M. **Variação da densidade básica da madeira e produtividade de *Eucalyptus spp***. Brasília: EMBRAPA, CPAC, 1985.43p.

ALCORN, P.J.; BAUHUS, J.; SMITH, R.G.B.; THOMAS, D.; JAMES, R.; NICOTRA, A. Growth response following green crown pruning in plantation-grown *Eucalyptus pilularis* and *Eucalyptus cloeziana*. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 38, n. 4, p. 770-781, 2008.

ALCORN, P.J.; FORRESTER, D.I.; THOMAS, D.S.; JAMES, R.; SMITH, R.G.B.; NICOTRA, A.B.; BAUHUS, J. Changes in whole-tree use following live-crown pruning in young plantation–grown *Eucalyptus pilularis* and *Eucalyptus cloeziana*. **Forests**, Basel, v. 4, n. 1, p. 106-121, 2013.

ALCORN, P.J.; PYTTEL, P.; BAUHUS, J.; SMITH, R.G.B.; THOMAS, D.; JAMES, R.; NICOTRA, A. Effects of initial planting density on branch development in 4-year-old plantation grown *Eucalyptus pilularis* and *Eucalyptus cloeziana* trees. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 252, n. 1, p. 41-51, 2007.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. de. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 500p.

ALFENAS, R.R.; COUTINHO, M.M.; FREITAS, C.S.; FREITAS, R.G.; ALFENAS, A.C. Developing clones of *Eucalyptus cloeziana* resistant to rust (*Puccinia psidii*). In: International WORKSHOP ON GENETICS OF HOST-PARASITE INTERACTIONS IN FORESTRY, 4., 2011, Eugene.**Proceedings…** Eugene: USDA, 2011. p. 276.

ALMEIDA, F.D.; XAVIER, A.; DIAS, J.M. Propagação vegetativa de árvores selecionadas de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell por estaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 445-453, 2007.

ALMEIDA, F.D.; XAVIER, A.; DIAS, J.M.M.; PAIVA, H.N.; Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 455-463, 2007.

ALMEIDA, J.R.; MARTINS, C.R.; DUTRA, L.F. Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* visando estabelecimento *in vitro*. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 15, n. 1, p. 54-60, 2008.

ALMEIDA, L.V. **Técnicas para a otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K. D. Hill & L. A. Johnson**. 2012. 107 p. (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

ANDREU, P.; MARÍN, J.A.*In vitro* culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock 'Adesoto 101' (*P. insititia* L.) as effected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition.**Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, n. 2, p. 258-267, 2005.

ARAÚJO, C.V.M.; ALVES, L.J.; SANTOS, O.M.; ALVES, J.M. Micorriza arbuscular em plantações de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell no litoral norte da Bahia, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 18, n. 3, p. 513-520, 2004.

AREZKI, O.; BOXUS, P.; KEVERS, C.; GASPAR, T. Hormonal control of proliferation in meristematic agglomerates of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. ***In Vitro* Cellular and Developmental Biology--Plant**, Columbia, v. 36, n. 5, p. 398-401, 2001.

ARYA, I.D.; SHARMA, S.; CHAUHAN, S.; ARYA, S. Micropropagation of superior *Eucalyptus* hybrids FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn x *E. tereticornis* Sm) and FRI-14 (*Eucalyptus torelliana* F.V. Muell x *E. citriodora* Hook): a commercial multiplication and field evaluation. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 21, p. 5718-5726, 2009.

ASCOUGH, G.D.; FENNELL, C.W.The regulation of plant growth and development in liquid culture.**South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 70, n. 2, p. 181-190, 2004.

ASSIS, T.F.; MAFIA, R.G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.).**Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 93-121.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2012. Brasília, 2013. 140 p. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF11/ABRAF11-BR.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2013.

ALVES, E.C.S.C.; XAVIER, A.; OTONI, W. Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptusgrandis* W. Hill ex Maiden x *E. urophylla* S. T. Blake.**Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 5, p. 643-653, 2004a.

_____. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,Brasília, v. 39, n. 5, p. 421-430,2004b.

BACCARIN, F.J.B. **Métodos para resgate, conservação e multiplicação em larga escala de matrizes de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage**. 2012. 78 p. (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BANDEIRA, F.S.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; LANI, E.R.G. Aclimatização ex vitro de plantes propagadas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 5, p. 773–781, 2007.

BANDYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSSEN, G.; HAMILL, J. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species – *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Plant Science**, New York, v.140, n. 2, p. 189-198, 1999.

BARRUETO CID, L.P.; MACHADO, A.C.M.; CARVALHEIRA, S.R.C.; BRASILEIRO, A.C.M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 56, n. 1, p. 17–23, 1999.

BASSAN, J.S.; REINIGER, L.R.S.; ROCHA, B.H.G.; SEVERO, C.R.P.; FLÔRES, A.V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BAURENS, F.C.; NICOLLEAU, J.; LEGAVRE, T.; VERDEIL, J.L.; MONTEUUIS, O. Genomic DNA methylation of juvenile and mature *Acacia mangium* micropropagated *in vitro* with reference to leaf morphology as a phase change marker. **Tree Physiology**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 401–407, 2004.

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.

BERTHON, J.Y.; BOYER,N.; GASPAR,T.Sequential rooting media and rooting capacity of *Sequoiadendron giganteum in vitro*.Peroxidase activity as marker.**Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 6, n. 5, p. 341–344, 1987.

BERTI, C.L.F.; FREITAS, M.L.M.; ZANATTO, A.C.S.; MORAIS, E.; MORAES, M.L.T.; SEBBENN, A.M. Variação genética, herdabilidades e ganhos na seleção para caracteres de crescimento e forma, em teste de progênies de polinização aberta de *Eucalyptus cloeziana*. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 13-26, 2011.

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). **SilvaeGenetica**, Frankfurt, v. 48, n. 2, p. 104-108, 1999.

BLEAKLEY, S; CANT, R.T. Australian species in Zimbabwe: existing role and potential. In: WORKSHOP ON SEED HANDLING AND EUCALYPT TAXONOMY, 1984, Harare. **Proceedings...** Harare: [s.n.], 1985. p. 246-252.

BON, M.C. J16: an apex protein associated with juvenility of *Sequoiadendron giganteum*. **Tree Physiology,** Oxford, v. 4, n. 4, p. 381–387, 1988.

BON, M.C.; MONTEUUIS, O. Rejuvenation of a 100-year-old *Sequoiadendron giganteum* through *in vitro* meristem culture. II. Biochemical arguments. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 81, n. 1, p. 116–128, 1991.

BONGA, J.M. Vegetative propagation in relation to juvenility maturity and rejuvenation.In. BONGA, J.M.; DURZAN, D.J.(Ed.).**Tissue culture in forestry**.Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1982.p. 387–412.

BONGA, J.M.; KLIMASZEWSKA, K.K.; VON ADERKAS, P. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers.**Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 100, p. 241–254, 2010.

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, 2011.

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.

BRAUTIGAM, K.; VINING, K.J.; LAFON-PLACETTE, C.; FOSSDAL, C.G.; MIROUZE, M.; MARCOS, J.G.; FLUCH, S.; FRAGA, M.F.; GUEVARA, M.A.; ABARCA, D.; JOHNSEN, Y.; MAURY, S.; STRAUSS, S.H.; CAMPBELL, M.M.; ROHDE, A.; DIAZ-SALA, C.; CERVERA, M.T. Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. **Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 3, n. 2, p. 399–415, 2013.

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.; ONDAS, H.W.W.; BACCARIN, F.J.B.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. ***In Vitro* Cellular Development and Biology-Plant**, Columbia, v. 48, n. 5, p. 478-487, 2012.

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

BROOKER, M.I.H.; KLEINIG, D.A **Field guide to eucalypts**.Sydney:Inkata Press, 1994. v. 3, 383 p.

BUNN, E. Development of *in vitro* methods for *ex situ* conservation of *Eucalyptus impensa*, an endangered mallee from southwest Western Australia.**Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 83, n. 1, p. 97–102, 2005.

BURROWS, G.E. Epicormic strand structure in Angophora, *Eucalyptus* and *Lophostemon* (Myrtaceae) - implications for fire resistance and recovery.**New Phytologist**, Londres, v. 153, n. 1, p. 111-131, 2002.

_____. Syncarpia and Tristaniopsis (Myrtaceae) possess specialized fire-resistant epicormic structures. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 56, n. 3, p. 254-264, 2008.

BURROWS, G.E.; HORNBY, S.K.; WATERS, D.A.; BELLAIRS, S.M.; PRIOR, L.D.; BOWMAN, D. Leaf axil anatomy and bud reserves in 21 Myrtaceae species from northern Australia. **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 169, n. 9; p. 1174-1186, 2008.

_____. A wide diversity of epicormic structures is present in Myrtaceae species in the northern Australian savanna biome-implications for adaptation to fire. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 58, n. 6, p. 493-507, 2010.

CADEMARTORI, P.H.G.; SANTOS, P.S.B.; SERRANO, L.; LABIDI, J.; GATTO, D.A. Effect of thermal treatment on physicochemical properties of Gympie messmate wood. **Industrial Crops and Products**, Amsterdan, v. 45, p.360-366, 2013.

CALDERON-BALTIERRA, X.V. Influencia del cálcio y ácido giberélico em el alargamiento de brotes adventícios *in vitro* de *Eucalyptus glubulus*. **Bosque**, Valdívia, v. 15, n. 1, p. 33-38, 1994.

CAMERON, A.D.; SANI, H. Growth and branching habit of rooted cuttings collected from epicormic shoots of *Betula pendula* Roth. **Tree Physiology**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 427-436. 1994.

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, Londres, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, 2010.

CHANG, I.; CHEN, P.; SHEN, C.; HSIEH, T.; HSU, Y.; HUANG, B.; KUO, C.; CHEN, Y.; CHU, H.; YEH, K.; HUANG, L. Proteomic profiling of proteins associated with the rejuvenation of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. **Proteome Science**, Londres, n. 8, p. 64, 2010.

CHEN, S.X.; WU, Z.H.; LI, Z.H.; XIE, Y.J.; LI, T.H.; ZHOU, Q.Y.; ARNOLD, R. Selection of species for solid wood production in southern China. **Journal of Tropical Forest Science**, Kepong, v. 22, n. 3, p. 308-316, 2010.

CLARK, N.B.; HICKS, C.C. **The kraft pulping and papermaking properties of 5-year-old plantation-grown *Eucalyptus cloeziana*, *E. pellita* and *E. urophylla* from northern Queensland**. Melbourne: CSIRO, 1996. 25 p.

CLARKE, B.; MCLEOD, I.; VERCOE, T. **Trees for farm forestry:** 22 promising species.Canberra:Rural Industries Research and Development Corporation, 2009. 239 p.

CORDEIRO, G.M. **Otimização da propagação clonal de *Eucalyptus globulus* Labill**. 2013. 102 p. (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.T.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, Piracicaba, n. 48, p. 106-117, 1995.

COUTO, L.; NICHOLAS, I.; WRIGHT, L. Short rotation eucalypt plantations for energy in Brazil.**IEA Bioenergy**, Washington, v. 43, n. 1, p.17, 2011.

CREMER, K.W. Morphology and development of primary and accessory buds of *Eucalyptus regnans*.**Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 20, n. 2; p. 175–195, 1972.

CRESSWELL, R.; NITSCH, C. Organ culture of *Eucalyptus grandis* L. **Planta**, Berlin, v. 125, n. 1, p. 87-90, 1974.

CRISP, M.D.; BURROWS, G.E.; COOK, L.G.; THORNHILL, T.H.; BOWMAN, D.M.J.S. Flammable biomes dominated by eucalypts originated at the Cretaceous-Palaeogene boundary. **Nature Communication**, London, v. 2, n. 193**,** 2011. Disponível em: http://www.nature.com/ncomms/journal/v2/n2/full/ncomms1191.html. Acesso em: 09 outubro 2012.

DAY, M.E.; GREENWOOD, M.S.; DIAZ-SALA, C. Age- and size-related trends in woody plant shoot development: regulatory pathways and evidence for genetic control. **Tree Physiology**, Oxford, v. 22, n. 8, p. 507-513, 2002.

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

DEB, C.R.; IMCHEN, T. An efficient *in vitro* hardening of tissue culture raised plants. **Biotechnology**, Islamabad, v. 9, n. 1, p. 79–83, 2010.

DEL TREDICI, P. Sprouting in temperate trees: a morphological and ecological review. **TheBotanical Review**, New York, v. 67, n. 2, p. 121–140, 2001.

DIBAX, R.;DEL EISFELD, C.; CUQUEL, F.; KOEHLER, H.; QUOIRIN, M. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis*.**Scientia Agricola**, Piracicaba,v. 62, n. 4, p. 406-412, 2005.

DICKINSON, G.; SUN, D. **Species and provenance evaluation of *Eucalyptus cloeziana*, *E. pellita* and *E. urophylla* at age 4 years, in far north Queensland**.Brisbane:Queensland Department of Primary Industry--Forestry.1995. 45 p.

DIETTRICH, B.; MERTINAT, H.; LUCKNER, M. Reduction of water loss during *ex vitro* acclimatization of micropropagated *Digitalis lanata* clone plants. **Biochemistry Physiology Pflanz**, Jena, v. 188, n. 1, p. 23–31, 1992.

DLAMINI, G.M. Australian tree species in Swaziland plantations. In: WORKSHOP ON SEED HANDLING AND EUCALYPT TAXONOMY, 1984, Harare. **Proceedings...**Harare: [s.n.], 1985. p. 218-220.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 58, n. 1, p. 49-59, 2009.

ESPOSITO-POLESI, N.P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 533-541, 2011.

FERMINO JÚNIOR, P.C.P.; RAPOSO, A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização de plantas micropropagadas de *Tectona grandis*. **Floresta**, Curitiba, v. 41, n. 1, p. 79-86, 2011.

FERREIRA, C.A.; SILVA, H.D. ***Eucalyptus* para a região amazônica, estados de Rondônia e Acre**. Colombo: Embrapa Florestas-CNPF. 2004. 4p.(EMBRAPA. Comunicado Técnico, 116).

FONSECA, A.G.; SILVA, I.B.; GALVÃO, M.A.S.; MOURA, E.R. Teste de espécies e procedências de eucalipto em Nísia Floresta, Estado do Rio Grande do Norte. **Silvicultura**, São Paulo, v. 11, n. 41, p. 114, 1986.

FLORENCE, R.G.**Ecology and silviculture of eucalypt forests.** Melbourne: CSIRO,2004. 413 p.

FRAGA, M.F.; RODRÍGUEZ, R.; CAÑAL, M.J. Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*.**Tree Physiology**, Oxford, v. 22, n. 11, p. 813-816, 2002.

GARCIA, J.L.; AVIDAN, N.; TRONCOSO, A.; SARMIENTO, R.; LAVEE, S. Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. **Scientia Horticulturae**, Amsterdan, v. 85, n. 4, p. 271-284, 2000.

GEORGE, E.F.; DEBERGH, P.C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E.F.; HALL, A.M.; DE KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, 501 p.

GIT FORESTRY CONSULTING. **Global *Eucalyptus* map**.Version 1.0.1. Disponível em: <http://git-forestry.com/download_git_eucalyptus_map_PT.htm>. Acessado em: 31 out. 2013.

GIRIJASHANKAR, V. *In vitro*regeneration of *Eucalyptus camaldulensis*. **Physiology and Molecular Biology Plants**, New Delhi, v. 18, n. 1, p. 79–87, 2012.

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

GOLFARI, L. **Estadoatual dos plantios e resultados das introduções de espécies e origem de eucaliptos no estado de Minas Gerais**. Viçosa: Editora UFV, 1982. 20p.

GOLFARI, L.; CASER, R.L.; MOURA, V.P.G. **Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil (2º aprox.).** Belo Horizonte: Centro de Pesquisa Florestal da Região do Cerrado, 1978. 66 p. (PRODEPEF. Série Técnica, 11).

GOLFARI, L.; MAGALHÃES, J.G.R.; CASER, R.L. **Avaliação da situação atual dos experimentos e plantios de *Eucalyptus* e *Pinus* na região centro-leste do Brasil**. Brasília IBDF, 1986. 47p.

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

_____. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo*) from adult plants. ***In Vitro* Cellular Development and Biology**, Columbia, v. 45, n. 1, p. 72-82, 2009.

GONÇALEZ, J.C.; BREDA, L.C.S.; BARROS, J.F.M.; MACEDO, D.G.; JANIN, G.; COSTA, A.F.; VALE, A.T. Características tecnológicas das madeiras de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden e *Eucalyptus cloeziana* F. Muell visando ao seu aproveitamento na indústria moveleira. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 3, p. 329-341, 2006.

GONÇALVES, F.G.; SILVA, A.G.; FERRARO, A.C.; COSTA, N.N.M.; SOUZA, R.A.B.; TOSATO, A.F. Captação de líquido pirolenhoso da carbonização da madeira de *Eucalyptus cloeziana* em forno rabo quente. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. Recife, v. 5, n. 2, p. 232-237, 2010.

GOODGER, J.Q.D.; HESKES, A.M.; KING, D.J.; GLEADOW, R.M.; WOODROW, I.E. Micropropagation of *Eucalyptus polybractea* selected for key essential oil traits. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 35, n. 3, p. 247-251, 2008.

GREENWOOD, M.S. Juvenility and maturation in conifers: current concepts. **Tree Physiology**, Oxford, v. 15, n. 7, p. 433-438, 1995.

GUPTA, P.K.; TIMMIS, R.; MASCARENHAS, A.F. Field performance of micropropagated forestry species.***In Vitro* Cellular Development and Biology**, Columbia, v. 27, n. 4, p. 159-164, 1991.

HAJARI, E.; WATT, M.P.; MYCOCK, D.J.; MCALISTER, B. Plant regeneration from induced callus of improved *Eucalyptus* clones. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 72, n. 2, p. 195-201, 2006.

HALL, M; JOHNSTON, R.D.; CHIPPENDALE, G.M. **Forest trees of Australia**. Canberra: Forestry and Timber Bureau, 1975. 334p.

HAMAKUA, H. **Frutos de *E. cloeziana***(fotografia)**.** 2013. Disponível em: <https://www. ctahr.hawaii.edu/forestry/trees/Dalbergia_Eucalyptus.html>. Acesso em: 12 nov. 2013.

HASBÚN, R.; VALLEDOR, L.; BERDASCO, M.; SANTAMARIA, E.; CAÑAL, M.J.; RODRIGUEZ, R.; RIOS, D.; SÁNCHEZ, M. *In vitro* proliferation and genome DNA methylation in adult chestnuts.**Acta Horticulture**, Wageningen, n. 693, p. 333-340, 2005.

HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J.; BOUDET, A.M.; TEULIÈRES, C. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, Oxford, v. 161, n. 4, p. 645-653, 2001.

HOPEWELL, G.P. **Sawn recovery and utilization potential of fast grown Argentinean eucalypts:**Denis M Cullity Research Fellowship report. Disponível em: <http://www.fwpa.com.au>. Acesso em: 02 dez. 2012.

HOPEWELL, G. P.; ATYEO, W.J.; MCGAVIN, R.L. **Evaluation of wood characteristics of tropical post-mid rotation plantation *Eucalyptus cloeziana* and *E. pellita.***Victoria: Forest and Wood Products Australia, 2008.pt. d: Veneer and plywood potential, 47p.

HOWARD, A.; ELDRIDGE, R. **Research and development annual report 2004/05**.Sidney: New South Wales Department of Primary Industries, 2005. 80p.

HUANG, L.C.; LIN,L.Y.; CHEN, C.M.; CHEN, L.J.; HUANG, B.L.; MURASHIGE,T. Phase reversal in *Sequoia sempervirens* in relation to mtDNA. **Physiologia Plantarum**, Praha, v. 94, n. 3, p. 379-383, 1995.

HUANG, L.C.; WENG, J.H.; WANG, C.H.; KUO, C.I.; SHIEH, Y J. Photosynthetic potentials of *in vitro*-growth juvenile, adult, and rejuvenated *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. shoots. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 44, n. 1, p. 31–35, 2003a.

HUANG, L.C.; PU, S.; MURASHIGE, T.; FU, S.F.; KUO, T.T.; HUANG, D.D.; HUANG, H.J. Phase and age-related differences in protein tyrosine phosphorylation in *Sequoia sempervirens*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 47, n. 4, p. 601-603, 2003b.

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS. **Identificação de espécies florestais, *Eucalyptus cloeziana* F. Muell**. Disponível em: <http://www.ipef.br/identificacao/cief/especies/cloeziana>. Acesso em: 05 dezembro de 2012.

**Inflorescências de *E. cloeziana***(fotografia)**.** 2013. Disponível em: <https://www. ebay.com.au>. Acesso em: 12 nov. 2013.

INTERAMNENSE, M.T. **Utilização das madeiras de *Eucalyptus cloeziana* (F. Muell), *Eucalyptus maculata* (Hook) e *Eucalyptus punctata* DC *var. punctata* para produção de**

**painéis compensados**. 1998. 81 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

JANKOWSKI, A.; GRAÇA, M.E.C. Obtenção de brotações epicórmicas de canela sassafrás (*Ocotea odorífera* (Vellozo)) para cultivo *in vitro*. In: CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO, 1., CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7., 1993, Curitiba. **Anais...**Curitiba:SBS/SBEF, 1993. p.764.

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

JOVANOVIC, T.; BOOTH.T.H. **Improved species climatic profiles**. Canberra: Rural Industries Research and Development Corporation, 2002. 239p.

JUNIOR, O.G.M.; ANDRADE, H.B.; RAMALHO, M.A.P. Avaliações de procedências de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. e estimação de parâmetros genéticos e fenotípicos na região noroeste do estado de Minas Gerais. **Cerne**, Lavras, v.2, n.1, p. 11-19, 1996.

KAAPOR, M.L.; CHAUHAN, J.M.S. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*E. torelliana* F. V. Muell. x *E. citriodora* Hook). **Silvae Genetica**, Berlin, v. 41, n. 6, p. 305–307, 1990.

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

KRATZ, D.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F. Propagação assexuada de *Cupressus lusitanica*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 30, n. 62, p. 161-164, 2010.

KUO, J.L.; HUANG, H.J.; CHENG, C.M.; CHEN, L.J.; HUANG, B.L.; HUANG, L.C.; KUO, T.T. Rejuvenation *in vitro*: modulation of protein phosphorylation in *Sequoia sempervirens*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 146, n. 3, p. 333-336, 1995

LAINE, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*.**Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 13, n. 8, p. 473–476, 1994.

LEONE, G.F. **Estabelecimento de um protocolo para controlar a manifestação de bactérias endofíticas no processo de multiplicação *in vitro* de eucalipto**. 2013. 101 p. (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Ashville, v.30, n. 1, p.421-427, 1980.

LABORATÓRIO DE PRODUTOS FLORESTAIS/INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS RENOVÁVEIS. **Descrição anatômica de lenho de seis espécies de eucalipto:** relatório. Brasília, 1998. 13p.

MANKESSI, F.; SAYA, A.; MONTES, F.; LARTAUD, M.; VERDEIL, J.; MONTEUUIS, O. Histocytological characteristics of *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* shoot apical meristems of different physiological ages. **Trees**, Berlin, v. 25, n. 3, p. 415–424, 2011.

MANKESSI, F.; SAYA, A.R..; BOUDON, F.; GUÉDON, Y.; MONTES, F.; LARTAUD, M.; VERDEIL, J.; MONTEUUIS, O. Phase change-related variations of dome shape in *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* shoot apical meristems. **Trees**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 743–752, 2010.

MANSON, D.G.; SCHMIDT, S.; BRISTOW, M.; ERSKINE, P.D.; VANCLAY, J.K. Species-site matching in mixed species plantations of native trees in tropical Australia. **Agroforestry System,** Nairobi, v.87, n. 1, p.233-250, 2013.

MARIANO, M.B. **Estabelecimento de uma área de produção de sementes de *E. cloeziana*F. Muell na plantação de Inhamacari, província de Manica**. 2005. 45 p.Monografia de conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Florestal) –Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.

MARINO, G.; GAGGIA, F.; SAIANO, F.; BIAVATI, B.; MARANGONI, B. Elimination of *in vitro* bacterial contaminants in shoot cultures of 'MRS 2/5' plum hybrid by the use of *Melia azedarach* extracts. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 123, n. 2, p. 195-205, 2009.

MARTÍNEZ, T.; VIDAL, N.; BALLISTER, A.; VIETIZ, A.M. Improved organogenesis capacity of shoots cultures from matures pedunculate oak trees through somatic embryogenesis as rejuvenation technique. **Trees**, Berlin, v. 26, n. 2, p. 321-330, 2012.

MATHUR, A.; MATHUR, A.K.; VERMA, P.; YADAV, S.; GUPTA, M.L.; DAROKAR, M.P. Biological hardening and genetic fidelity testing of micro-cloned progeny of *Chlorophytum borivilianum*. **African Journal Biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 8, p. 1046–1053, 2008.

McLENDON, C. **Madeira de *E. cloeziana***(fotografia)**.** 2013. Disponível em: <https://www. rarewoodsandveneers.com/pages/specimens/rarewoods/rarewood27.htm >. Acesso em: 12 nov. 2013.

MEIER, A.R.; SAUNDERS, M.R.; MICHLER, C.H. Epicormic buds in trees: a review of bud establishment, development and dormancy release. **Tree Physiology**, Oxford, v.32, n.5, p.565-84, 2012.

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

MEZZOMO, L.X. P**otencialidade de *eucalyptus cloeziana* F. Muell, *E. citriodora,* Hook, *E. urophylla* St. Blake e *E. urophylla* x *E. grandis*, cultivados na Bahia, na produção de celulose solúvel.**1996. 79 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1996.

MONTEUUIS, O.; DOULBEAU, S.; VERDEIL, J. DNA methylation in different origin clonal offspring from a mature *Sequoiadendron giganteum* genotype. **Trees**, Berlin, v. 22, n. 6, p. 779–784, 2008.

MOURA, V.P.G. **Provenance variation of*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. in Brazil**. 1986. 304 p. (PhD in Philosophy)-Oxford University, Oxford, 1986.

_____. **O germoplasma de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell no Brasil.** Brasília:Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; CNPF, 2003. 9p.(EMBRAPA. Comunicado Técnico 102).

MOURA, V.P.G.; GUIMARÃES, D.P. Uma análise da atividade florestal nos Cerrados. In:SIMPÓSIO SOBRE CERRADO, 6., 1988, Brasília.**Anais...** Planaltina: EMBRAPA,CPAC, 1988. p. 853-870.

_____. **Produção de mudas de *Eucalyptus* para o estabelecimento de plantios florestais.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; CNPF. 2003. 9 p. (EMBRAPA. Comunicado Técnico 85).

MOURA, V.P.G.; MELO, J.T.; SILVA, M.A. Comportamento de procedências de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell aos nove e meio anos de idade, em Planaltina, DF, área de cerrado. **IPEF**, Piracicaba, n. 46, p. 52-62, 1993.

MOURA, V.P.G.; BOLOGNANI, H.; PIRES, I.E.; GOMES, F.S.; VIEIRA, I.G.; OLIVEIRA, V.; PALUDZYSZYN FILHO, E.P. Energia. In: WORKSHOP SOBRE MELHORAMENTO DE ESPÉCIES FLORESTAIS E PALMÁCEAS NO BRASIL, 2001, Curitiba. **Anais...** Colombo: Embrapa Florestas-CNPF, 2001. P. 227-230.

MOURA, V.P.G.; CASER, R.L.; ALBINO, J.C.; GUIMARÃES, D.P.; MELO, J.T.; OMASTRI, S.A. **Avaliação de espécies e procedências de *Eucalyptus* em Minas Gerais e Espírito Santo:**resultados parciais. Planaltina: EMBRAPA, CPAC, 1980. 104p. (Boletim de Pesquisa, 1.).

MULLINS, K.V.; LLEWELLYN, D.J.; HARTNEY, V.J.; STRAUSS, S.; DENNIS, E.S. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 16, n. 11, p. 787–791. 1997.

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

MURRAY, J.R.; SMITH, A.G.; HACKETT, W.P. Differential dihydroflavonol reductase transcription and anthocyanin pigmentation in the juvenile and mature phases of ivy (*Hedera helix* L.).**Planta**, Berlin, v. 194, n. 1, p. 102–109, 1994.

MUZOKE, R. Australian species in Uganda. In: WORKSHOP ON SEED HANDLING AND EUCALYPT TAXONOMY, 1984, Harare. **Proceedings...** Harare: ZWPubl., 1985. p. 228-230.

NAKHOODA, M.; WATT, M.P.; MYCOCK, D. Auxin stability and accumulation during *in vitro* shoot morphogenesis influences subsequent root induction and development in *Eucalyptus grandis*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.65, n. 2, p.263–271, 2011.

_____. The properties and interaction of auxins and cytokinins influence rooting of shoot cultures of *Eucalyptus*.**African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, n. 100, p. 16568-16578, 2012.

NGUGI, M.R.; DOLEY, D.; HUNT, M.A.; RYAN, P.; DART, P. Physiological responses to water stress in *Eucalyptus cloeziana* and *E, argophloia* seedlings. **Trees**, Berlin, v. 18, n. 4, p.381-389, 2004a.

NGUGI, M.R.; HUNT, M.A.; DOLEY, D.; RYAN, P.; DART, P.J. Photosynthetic light and temperature responses of *Eucalyptus cloeziana* and *Eucalyptus argophloia*. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.51, n. 5, p.573-583, 2003.

_____. Selection of species and provenances for low-rainfall areas: physiological responses of *Eucalyptus cloeziana* and *Eucalyptus argophloia* to seasonal conditions in subtropical Queensland. **Forest Ecology and Management**, Amsterdan, v.193, n. 1, p.141-156, 2004b.

NOLAN, G.; GREAVES, B.; WASHUSEN, R.; PARSONS, M.; JENNINGS, S. **Eucalypt plantations for solid wood products in Australia:**a review.Victoria: Forest and Wood Products Research and Development Research Corporation, 2005. 138p.

NUGENT, G.; CHANDLER, S.F.; WHITEMAN, P.; STEVENSON, T.W. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus*Labill. ***In Vitro*** **Cellular Development and Biology-Plant**, Columbia, v. 37, n. 3, p. 388–391, 2001.

NYITRAI, P.; KOVACS, E.; KIRALY, I.; OVARI, M.; KERESZTES, A: On the mechanism of rejuvenation of ageing detached bean leaves by low-concentration stressors. **Plant Biology**, Stuttgart,v. 11, n. 2, p. 236-242, 2009.

OGUNWANDE, I.A.; OLAWORE, NO.; ADELEKE, K.A.; EKUNDAYO, O.; KOENIG, W.A. Chemical composition of the leaf volatile oil of *Psidium guajava* L. growing in Nigeria. **Flavor and Fragrance Journal**, Chichester, v. 18, n. 2, p. 136-138. 2003.

OLIVEIRA, J.T.S.; HELLMEISTER, J.C.; SIMÕES, J.W.; TOMAZELLO FILHO, M. Caracterização da madeira de sete espécies de eucaliptos para a construção civil: 1- avaliações dendrométricas das árvores. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.56, p.113-124, 1999.

OLIVEIRA, L.S.; DIAS, P.C.; BRONDANI, G.E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

OLIVEIRA, L.S.; XAVIER,A.; DIAS,P.C.; CORREIA, A.C.G.; BORGES, S.R.; TAKAHASHI, E.K.; PAIVA, H.N. Enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*.**Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 40, n. 96, p. 507-516, 2012.

OLIVEIRA, M.L.; XAVIER, A.; PENCHEL, R.M.; SANTOS, A.F. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestales**, Piracicaba, v. 39, n. 91, p. 309-315, 2011.

PALUDZYSZYN FILHO, E.P.; SANTOS, P.E.T. **Programa de melhoramento genético de eucalipto da Embrapa Florestas:** resultados e perspectivas.Colombo: Embrapa Florestas. 2011. 67p.(EMBRAPA.Documentos 214).

PAN, M.J.; STADEN, N. The use of charcoal in *in vitro* culture - a review. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.26, n.3, p. 155-163, 1998.

PENCHEL, R.M.; OTONI, W.C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica in vitro. In: BORÉM, A. (Ed.).**Biotecnologia florestal.**Viçosa:Suprema Gráfica, 2007. p.75-92.

PEREIRA, M.J. Reversion to juvenility: the use of epicormics in the micropropagation of mature wild shrubs of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericacaeae). **Arquipélago**: **Life and Marine Sciences**, Ponta Delgada, v. 26, p. 63-68, 2009.

PINTO, G. SANTOS, C.; NEVES, L.; ARAÚJO, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptusglobulus* Labill.**Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 22, n. 3, p. 208–213, 2002.

PIOTTO, K.D.B. **Atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage**. 2013. 168 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

PIRES, I.E.Teste de procedência de *Eucalyptus camaldulensis*Dehnh. na região do Nordeste semi-árido brasileiro. **Silvicultura**, São Paulo, v. 8, n. 31, p. 493-496, 1983.

POSPÍSILOVÁ, J.; TICHA, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 42, n.4, p. 481–497, 1999.

POTTS, B.M.; BARBOUR, R.C.; HINGSTON, A.B. **Genetic pollution from farm forestry: using eucalypt species and hybrids**. Barton:Rural Industries Research and Development Corporation, 2001. 119p.

POUPIN, M.; ARCE-JOHNSON, P. Transgenic trees for a new era. ***In vitro* Cell Development Biology Plant**, New York, v.41, n. 2, p.91-101, 2005.

PRAKASH, M.G.; GURUMURTHI, K. Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 100, n. 1, p. 13–20, 2010;

RAMAGE, C.M.; WILLIANS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis.***In vitro* Cellular and Development Biology**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 115-124, 2002.

REDMAN, A.L.; MCGAVIN, R.L. Accelerated drying of plantation grown of *Eucalyptus cloeziana* and *Eucalyptus pellita* sawn timber.**Forest Products Journal**, Peachtree Corners, v. 60, n. 4, p. 339-345, 2010.

RIBEIRO, M.M.C.A. **Maturação e propagação vegetativa em espécies florestais**. Castelo Branco: Editora Instituto Politécnico Castelo Branco, 1993. 55p.

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

SHARMA, S.K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees.**Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 19, n. 5, p. 511–518, 2000.

SILVA, A.L.L.; OLIVEIRA, Y.; COSTA, J.L.; SCHEIDT, G.N.; CARVALHO, D.C.; SANTOS, J.D.; GUERRA, E.P. Pré-aclimatização e aclimatização em cultivo hidropônico de plantas micropropagadas de *Eucalyptus saligna*Sm. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 179-184, 2011.

SOTELO, M. MONZA, J. Micropropagation of *Eucalyptus maidenii* elite trees.**Agrociência**, Montevideo, v. 11, n. 1, p. 81-89, 2007.

SOUZA, S.M. de; RESENDE, M.D.V. de; SILVA, H.D. da; HIGA, A.R. Variabilidade genética e interação genótipo x ambiente envolvendo procedências de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell, em diferentes regiões do Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 16, n. 1, p. 1-17, 1992.

SOUZA JUNIOR, L.; WENDLING, I. Propagação de *Eucalyptus dunnii* via miniestaquia de material juvenil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v. 46, n. 1, p. 21-30, 2003.

STOKOE, R.L.; SHEPHERD, M.; LEE, D.J.; NIKLES, G. Natural inter-subgeneric hybridization between *Eucalyptus acmenoides* Schauer and *Eucalyptus cloeziana* F. Muell (Myrtaceae) in Southeast Queensland. **Annals of Botany**, London, v.88, n. 4, p.563-570, 2001.

SUBBAIAH, M.M.; MINOCHA, S.C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 9, n. 7, p. 370–373, 1990.

THIRION, M. **Steam bending for small, round hardwood plantation thinnings- arched structural members**. Brisbane:Department of Primary Industries and Fisheries, Queensland. 2007. 50p.

THOMAS, P.; KUMARI, S.; SWARNA, G.K.; PRAKASH, D.P.; DINESH, M.R. Ubiquitous presence of fastidious endophytic bacteria in field shoots and index-negative apparentlyclean shoot-tip cultures of papaya. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 26, n. 9, p.1491-1499, 2007.

TIMONI, J.L.; COELHO, L.C.C.; KAGEYAMA, P.Y.; SILVA. A.A. Teste de procedências de *Eucalyptus spp*. na região de Mogi Guaçú (SP). **Silvicultura**, São Paulo, v.8, n.31, p. 505-507, 1983.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Dinâmica do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*.**Revista Árvore**, Viçosa, v.26, n.6, p.665-673, 2002.

TIWARI, S.K.; TIWARI, K.P.; SIRIL, E.A. An improved micropropagation protocol for teak. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.71, n. 1, p.1-6, 2002.

TOURNIER, V.; GRAT, S.; MARQUE, C.; EL KAYAL, W.; PENCHEL, R.; ANDRADE, G.; BOUDET, A.M.; TEULIÈRES, C. An efficient procedure to stably introduce genes into a economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*). **Transgenic Research**, London, v.12, n.4, p.403-411, 2003.

TRINDADE, H.; PAIS, M.S.*In vitro* studies on *Eucalyptus globulus* rooting ability.***In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plan**t, Columbia, v. 33, n. 1, p. 1-5, 1997.

_____. Meristematic nodule culture A new pathway for *in vitro* propagation of *Eucalyptus globulus*. **Trees**, Berlin, v. 17, n. 4, p. 308-315, 2003.

_____. **Tronco de *E. cloeziana***(fotografia)**.** 2013. Disponível em: <https://www.noosanativeplants.com.au>. Acesso em: 12 nov. 2013.

TRUEMAN, S.J.; MCMAHON, T.V.; BRISTOW, M. Production of *Eucalyptus cloeziana* cuttings in response to stock plant temperature. **Journal of Tropical Forest Science**, Kepong, v.25, n.1, p. 60-69, 2013.

VIVIAN, M.A. **Resistência biológica da madeira tratada de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus cloeziana* em ensaios de laboratório e de campo**. 2011. 104 p.Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

WARRAG, E.; LESNEY, M.S.; ROCKWOOD, D.J. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.9, n. 10, p.586-589, 1991.

WATERS, D.A.; BURROWS, G.E.; HARPER, J.D.I. *Eucalyptus regnans (*Myrtaceae): a fire-sensitive eucalypt with a resprouter epicormic structure. **American Journal of Botany**, New York, v. 97, n. 4, p. 545-556, 2010.

WATT, M.P. Genotypic-unspecific protocols for the commercial micropropagation of *Eucalyptus grandis* × *E. nitens* and *E. grandis* × *E.urophylla*. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 38, n. 1, p. 125-133, 2013.

WENDLING, I.; SOUZA JÚNIOR, L. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) por miniestaquia de material juvenil. In: CONGRESSO SUL–AMERICANO DA ERVA-MATE. 3., 2003, Chapecó. **Anais...** Chapecó: EPAGRI, 2003. p. 60.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente,** Seropédica, v.8, n.1, p.187-194, 2001.

WOOD SOLUTIONS. Disponível em: <http://www.woodsolutions.com.au/Wood-Species/gympie-messmate>. Acesso em:12 ago. 2013.

XAVIER, A.; OTONI, W.C. Aplicações da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**, San Jose, v. 33, n. 2, p. 303-307, 2009.

XAVIER, A.; SILVA, R.L. Evolução da silvicultura clonal de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**, San Jose, v. 34, n. 1, p. 93-98, 2010.

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

## 2 ORGANOGÊNESE INDIRETA DE *E. cloeziana*


### Resumo

Este estudo descreve pela primeira vez, um protocolo de organogênese indireta de *E. cloeziana* a partir de calos induzidos em explantes juvenis. Na fase de indução, hipocótilos e folhas cotiledonares foram estabelecidas em meio de cultura MS, suplementado com 0,01; 0,25; 0,50 e 1,0 mg $L^{-1}$ de ANA ou de TDZ. Os calos obtidos foram cultivados em meio de cultura MS, acrescido de diferentes combinações de ANA e BAP na fase de diferenciação. Posteriormente, as gemas adventícias foram multiplicadas e alongadas *in vitro* em meio de cultura WPM suplementado com 0,2 mg $L^{-1}$ de BAP, 0,01 mg $L^{-1}$ de ANA. A indução de gemas adventícias ocorreu somente nos calos induzidos nos tratamentos com TDZ, demonstrando a eficiência desse regulador de crescimento para a regeneração de *E. cloeziana*. As folhas cotiledonares demonstraram maior potencial de regeneração *in vitro*. Na fase de diferenciação, o tratamento com 1,0 mg $L^{-1}$ de BAP proporcionou maiores percentuais de regeneração de gemas adventícias. As maiores taxas de multiplicação das microcepas foram obtidas para os tratamentos de indução com 0,10; 0,25 e 0,50 mg $L^{-1}$ de TDZ. As microestacas foram aclimatizadas e enraizadas *ex vitro* com sucesso em miniestufas.


Palavras-chave: *Eucalyptus*; Meio de cultura MS e WPM; Morfogênese; Regulador de crescimento; Explante


### Abstract

In this work, a protocol for indirect organogenesis was described for *E. cloeziana*. Effects of the growth regulators and juvenile explants types were evaluated for their influence on *E. cloeziana* indirect organogenesis. In the induction phase, hypocotyls and cotiledonary leaves were cultivated on MS medium culture supplemented with different growth regulator concentrations NAA or TDZ. In differentiation phase, the calli were cultivated on MS medium culture supplemented with different growth regulators combinations of NAA and BA. Subsequently, the adventitious buds were multiplied and elongated *in vitro* in WPM supplemented with 0.2 mg $L^{-1}$ BA and 0.01mg$L^{-1}$ NAA. The TDZ was more efficient in terms of regeneration, because only from to the callus from treatment with this growth regulator there was the induction of adventitious shoots.Thecotiledonary leavesshowed greater*in vitro* regeneration potential. The higher percentages of adventitious shoots were obtained with 1.0 mg $L^{-1}$ BA in the differentiation phase. The highest rates of multiplication of micro-stumps were obtained for induction treatments with 0.10, 0.25 and 0.50 mg $L^{-1}$ TDZ. The microcuttings were acclimatized and rooted *ex vitro* successfully on mini-incubators.


Keywords:*Eucalyptus*; MS and WPM media culture; Morphogenesis; Growth regulator; Explant

## 2.1 Introdução

A associação dos procedimentos biotecnológicos ao melhoramento florestal pode contribuir significativamente para o aumento nos ganhos de produtividade de espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus*, bem como na qualidade da madeira produzida para os diversos fins (ASSIS; MAFIA, 2007). No entanto, um programa que visa obter ganhos genéticos em *Eucalyptus*, demanda um significativo período de tempo devido as espécies apresentarem um ciclo vegetativo longo (BELTRAME et al., 2012), além da necessidade de testes clonais antes da recomendação de clones para plantios comerciais (GRATTAPAGLIA, 2007).

A inserção de genes via transformação genética, representa um importante instrumento para introduzir novas características de interesse econômico em genótipos de *Eucalyptus*, em curto período de tempo (DIBAX et al., 2005). Os ganhos obtidos com a adoção da transformação genética não se restringem apenas à produtividade, mas também à qualidade da madeira, resistência a pragas e doenças (BANDYOPADHYAY et al., 1999; GRATTAPAGLIA, 2007). Dessa forma, o desenvolvimento de um protocolo de regeneração *in vitro* torna-se necessário para a obtenção de plantas transgênicas de *Eucalyptus*com os genes de interesse (SARTORETTO et al., 2008).

A organogênese e a embriogênese somática correspondem às rotas morfogênicas que podem ser induzidas para a clonagem de materiais genéticos de interesse (RIBAS et al., 2000). A organogênese tem sido descrita para diversas espécies de *Eucalyptus* (BARRUETO CID et al., 1999; DIBAX et al., 2005; NUGENT et al., 2001a; MULLINS et al., 1997; MURALIDHARAN; MASCARENHAS, 1987) bem como a embriogênese somática (NUGENT et al., 2001b; PINTO et al., 2008). No entanto, ainda não há estudos reportados de regeneração *in vitro* de *E. cloeziana*.

Diversos são os fatores envolvidos na regeneração *in vitro* de *Eucalyptus*,dentreos quais se destacam o tipo de explante, a proporção e a concentração dos reguladores de crescimento (HAJARI et al., 2006). Dentre estes fatores, o tipo de explante corresponde a um dos principais que determinam o sucesso da morfogênese vegetal (BANDYOPADHYAY et al., 1999; RANI et aI., 2003). Na regeneração *in vitro* de *Eucalyptus* são utilizados embriões zigóticos (PINTO et al., 2002) cotilédones (BANDYOPADHYAY et al., 1999), hipocótilos (SUBBAIAH; MINOCHA, 1990; AZMI et al., 1997; BANDYOPADHYAY et al., 1999), ápices (NICCOL et al., 1994; GLOCKE et al., 2006) segmentos nodais (GIRIJASHANKAR, 2012; BRONDANI et al., 2012b). A escolha do explante dependerá da viabilidade para a sua

utilização, mas, sobretudo pela sua capacidade de resposta morfogênica em relação aos estímulos induzidos no cultivo *in vitro*. Dessa forma, a opção por explantes que apresentem um menor grau de diferenciação reflete em uma maior probabilidade de sucesso quanto à regeneração de gemas adventícias nos explantes.

Os reguladores de crescimento acrescidos ao meio de cultura também influenciam os eventos morfogênicos, uma vez que o balanço hormonal estabelecido por estas substâncias repercute diretamente nos eventos de desdiferenciação das células dos explantes e rediferenciação das mesmas, com a indução e formação de gemas adventícias. As citocininas e auxinas são os principais reguladores de crescimento utilizados na desdiferenciação das células com a consequente rediferenciação destas para uma nova rota morfogênica, formando novas estruturas, principalmente brotações.

Neste contexto, no intuito de estabelecera micropropagação de *E. cloeziana*, foi realizado o cultivo*in vitro*, avaliando-se os efeitos de reguladores de crescimento na organogênese indireta de dois tipos de explantes juvenis de plântulas da espécie.

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1 Desinfestação e germinação *in vitro* das sementes

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia das Árvores e Viveiro Florestal, ambos pertencentesao Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP.A análise histológica dos tecidos vegetais foi realizada no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP.

O material experimental utilizado constituiu-se de sementes de *E. cloeziana* (procedência Anhembi – SP, cultivar LCFA026 - IPEF).

### 2.2.2 Desinfestação e germinação *in vitro* das sementes

As sementes foram embebidas em água destilada por 12 hs e posteriormente lavadas em água corrente por cinco minutos, sendo logo após desinfestadas adotando a seguinte sequência: 30 segundos em álcool 70% e em seguida em solução de hipoclorito de sódio 2,5% (v/v) mais uma gota de Tween-20 0,01% (v/v) durante 15 minutos. Depois da desinfestação as sementes foram lavadas seis vezes em água deionizada autoclavada.

A germinação das sementes foi realizada, sob condições assépticas, em frascos de vidro transparente (Ø = 5,0 cm e 8,0 cm de altura) contendo 30 mL de meio de cultura MS, com metade da concentração dos sais, suplementado com 15 g $L^{-1}$ de sacarose, 4,0 g $L^{-1}$ de ágar. Para esta etapa, foram preparados 30 frascos, contendo 25 sementes/frasco.

### 2.2.3 Indução das culturas organogênicas

Plântulas com 20 dias de idade, contados a partir da emergência da radícula (início da germinação), foram utilizadas como explantes. Segmentos de hipocótilo medindo 0,5 cm de comprimento e folhas cotiledonares totalmente expandidas foram excisados assepticamente e inoculados em frascos de vidro transparente (Ø = 5,0 cm e 8,0 cm de altura) contendo 30 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 0,1 g $L^{-1}$ de pantotenato de cálcio, 0,1 g $L^{-1}$ de biotina, 0,8 g $L^{-1}$ de polivinilpirrolidona (PVP), 30 g $L^{-1}$ de sacarose, 4,0 g $L^{-1}$ de ágar. As folhas cotiledonares foram inoculadas com a superfície abaxial em contato com o meio de cultura. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob escuro contínuo.

Diferentes concentrações dos reguladores de crescimento ácido α-naftaleno acético (ANA) e thidiazuron (TDZ) foram adicionadas separadamente ao meio básico de indução de gemas adventícias (Tabela 1).

Tabela 1- Descrição das concentrações dos reguladores de crescimento utilizadas visando à indução de embriogênese somática e organogênese

| Tratamentos | ANA (mg $L^{-1}$) | TDZ (mg $L^{-1}$) |
|---|---|---|
| 1 | 0,01 | - |
| 2 | 0,10 | - |
| 3 | 0,25 | - |
| 4 | 0,50 | - |
| 5 | 1,00 | - |
| 6 | - | 0,01 |
| 7 | - | 0,10 |
| 8 | - | 0,25 |
| 9 | - | 0,50 |
| 10 | - | 1,00 |

Após um período de 30 dias realizou-se a avaliação visual quanto à calogênese, oxidação e rizogênese dos explantes atribuindo-se uma escala de notas: 1 = baixa, 2 = média e 3 = alta intensidade. Os dados obtidos foram analisados por meio das médias e desvio padrão da média.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado no esquema fatorial 2x5x2 testando dois tipos de explantes (hipocótilo e folhas cotiledonares), cinco concentrações de reguladores de crescimento e dois tipos de reguladores de crescimento (ANA e TDZ), utilizando-se cinco repetições com dez explantes cada repetição.

### 2.2.4 Desenvolvimento de gemas adventícias

Os explantes, após a fase de indução, foram transferidos para meio de cultura MS com a mesma composição da fase anterior, suplementado com 2,0 mg $L^{-1}$ de carvão ativado e diferentes concentrações combinadas de ANA e 6-benzilaminopurina (BAP) (mg $L^{-1}$): T1: (0,50 BAP e 0,00 ANA); T2: (1,00 BAP e 0,00 ANA); T3: (0,50 BAP e 0,50 ANA); T4: (0,00 BAP e 0,50 ANA) e T5 (0,00 BAP e 1,00 ANA). Decorridos 30 dias, os explantes foram subcultivados e transferidos para mesmo meio de cultura com igual composição, somente para renovação dos nutrientes.

Ao final de 60 dias de cultivo *in vitro* foi avaliado o desenvolvimento de gemas adventícias por meio da frequência de regeneração das mesmas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado no esquema fatorial 2x3 testando dois tipos de explantes (hipocótilo e folha cotiledonar) e cinco tratamentos reguladores de crescimento, utilizando de quatro repetições com oito explantes cada repetição.

### 2.2.5 Multiplicação e Alongamento

As gemas adventícias formadas foram transferidas para frascos de vidro transparente (Ø = 5 cm e 8 cm de altura) contendo 40 mL do meio de multiplicação WPM (LOOYD; MCCOWN, 1980) suplementado com 0,2 mg $L^{-1}$ de BAP, 0,01 mg $L^{-1}$ de ANA, 30 g $L^{-1}$ de sacarose e 4,0 g $L^{-1}$ de ágar.

A cada período de 30 dias, procedeu-se o subcultivo das gemas adventícias para novo meio de cultura de igual composição, isolando microcepas (aglomerado de brotações) padronizadas com cinco brotações maiores que 5 mm e com bom vigor vegetativo.

A taxa de multiplicação de cada árvore matriz e do material de origem seminal foi determinada ao final de cada subcultivo (5subcultivos no total). Para tanto, determinou-se o número de microcepas produzidas por explante em cada subcultivo. A avaliação do material de origem seminal iniciou-se quando as brotações possuíam o tamanho de uma microcepa padrão. O cálculo da taxa de multiplicação foi realizado dividindo-se o número de microcepas, obtidas ao final de cada período de 30 dias, pelo número de microcepas produzidas ao final do primeiro subcultivo.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, utilizando cinco repetições compostas de quatro explantes (microcepas) por repetição.

### 2.2.6 Enraizamento *ex vitro*

O enraizamento *ex vitro* foi realizado com a transferência das brotações alongadas para uma bandeja de células (12 $cm^3$/célula), disposta em um recipiente retangular de plástico (47 x 17 x 3 cm) coberta com um saco plástico de polietileno, formando miniestufas. Nenhum

tratamento com regulador de crescimento foi utilizado para a indução do enraizamento adventício. Após 30 dias, as brotações que enraizaram (microestacas) foram transferidas para tubetes plásticos (55 $cm^3$). As bandejas e os tubetes foram mantidos nas miniestufas e irrigados diariamente manualmente, visando evitar o ressecamento do substrato e manter uma alta umidade do ar. Nesta etapa, as microestacas foram aclimatizadas em casa de sombra com sombrite 50% e a partir dessa etapa passaram a receber fertirrigação semanal. Decorridos 30 dias, as microestacas foram transferidas para área de pleno sol, onde foram irrigadas e adubadas diariamente até completarem o seu desenvolvimento. Mudas, com 15 cm de comprimento, completamente formadas foram obtidas aos 120 dias.

**2.2.6 Análises histológicas e histoquímicas**

Amostras teciduais de dois calos caracteristicamente organogênicos e formados a partir de segmentos de hipocótilos e cotilédones das plântulas germinadas *in vitro,* foram submetidas a testes histoquímicos específicos à detecção de polissacarídeos, amido, polifenóis, e proteínas durantes os eventos morfogênicos monitorados.

Para tanto, as amostras foram fixadas em solução Karnovsky (1965) e posteriormente desidratadas em série alcoólica-etílica em concentrações crescentes (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 80, 90 e 100% v/v). Em seguida, as amostras foram inclusas em resina de hidroxietil metacrilato (Historesin, Leica®, Heidelberg, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. Os blocos contendo as amostras teciduais dos calos foram seccionados longitudinalmente (gemas adventícias) a 0,5 μm de espessura, empregando navalhas de aço do tipo C acopladas a micrótomo rotativo manual.

As secções histológicas obtidas foram submetidas à dupla coloração com o reagente ácido periódico de Schiff e naphtol blue black (FISHER, 1968) e montadas em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan®). Para as reações positivas, os polissacarídeos presentes tanto em paredes celulares, como em citoplasma e nos amiloplastos foram corados em cor-de-rosa, enquanto os compostos fenólicos coraram em laranja para o reagente ácido periódico de Schiff, ao passo que e as proteínas foram coradas em azul para o naphtol blue black. As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2®) e em estereomicroscópio Micronal, sendo as imagens capturadas na mesma escala com câmera SAMSUNG® (SDC-313).

As análises anatômicas foram realizadas no laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP).

### 2.2.7 Preparo do meio de cultura e condições experimentais

Os meios de cultura foram preparados utilizando-se água deionizada, ajustando-se o pH para 5,8 ± 0,05 com NaOH (0,1 mol $L^{-1}$) ou HCl (0,1 mol $L^{-1}$), antes da autoclavagem e da adição do ágar. O meio de cultura foi autoclavado na temperatura de 121 ºC e pressão de aproximadamente 1 kgf $cm^{-2}$, durante 15 min.

Durante todo o cultivo *in vitro*, desde a germinação *in vitro* das sementes até o alongamento das brotações,os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2ºC, fotoperíodo de 12 hs de luz e irradiância de 80 µmol $m^{-2}s^{-1}$.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Fase de indução

Os resultados obtidos na fase de indução entre os dois tipos de explantes (hipocótilos e cotilédones) demonstraram diferenças no percentual de oxidação (Figuras 1 e 2). As respostas também variaram entre as diferentes concentrações dos reguladores de crescimento avaliadas.

Os explantes oriundos de folhas cotiledonares apresentaram maiores médias de oxidação quando comparadas aos hipocótilos, sendo essas médias consideradas altas, quando o meio de cultura foi suplementado com até 0,1 mg $L^{-1}$ de ANA. (Figura 1A). Nas concentrações acima de 0,25 mg $L^{-1}$ de ANA e para todas as concentrações de TDZ estudadas observou-se oxidação mediana dos explantes (Figuras 1A e 1B). Por outro lado, quando os hipocótilos foram cultivados no meio de indução, verificou-se aumento na oxidação dos explantes com o incremento das concentrações de ANA e TDZ (Figuras 2A e 2B).

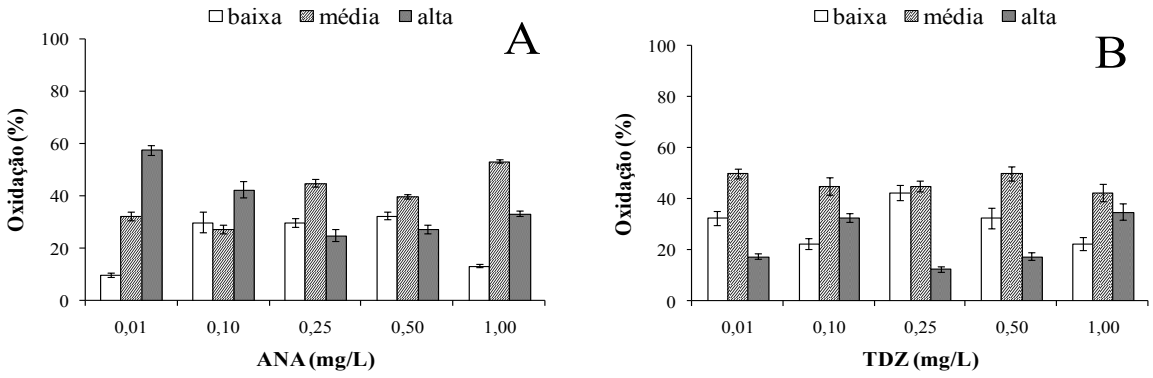


Figura 1 – Percentual de oxidação das folhas cotiledonares de *E. cloeziana* na fase de indução organogênica nas diferentes concentrações de ANA (A) e TDZ (B), aos 30 dias de cultivo *in vitro*

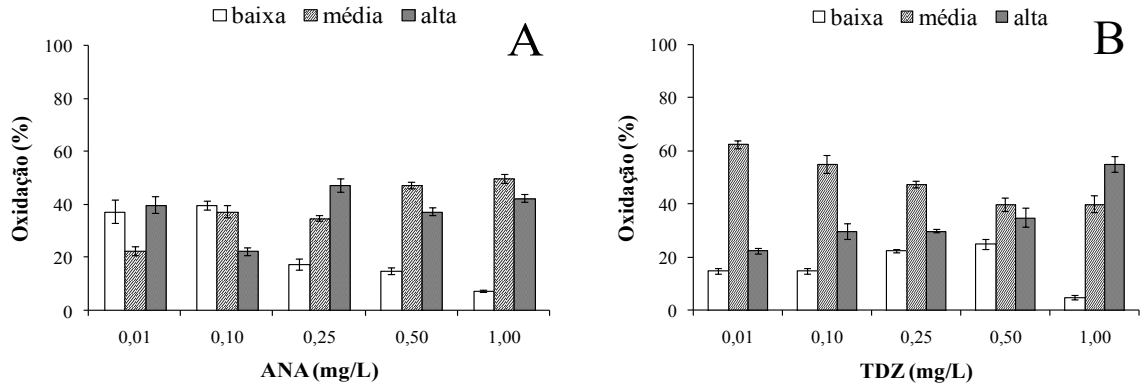


Figura 2 – Percentual de oxidação de hipocótilos de *E. cloeziana* na fase de indução organogênica nas diferentes concentrações de ANA (A) e TDZ (B), aos 30 dias de cultivo *in vitro*

Em relação ao percentual de indução de calos nos explantes oriundos de folhas cotiledonares observou-se que os tratamentos com TDZ apresentaram melhores resultados quando comparados aos obtidos com ANA. A calogênese das folhas cotiledonares foi baixa para concentrações de até 0,50 mg $L^{-1}$ de ANA (Figura 3A), enquanto os percentuais de calogênese nos tratamentos foram médios para a concentração de 0,01 mg $L^{-1}$ de TDZ e altos para as demais concentrações deste (Figura 3B).

A indução de calogênese nos hipocótilos nas diferentes concentrações de ANA foi baixa (Figura 4A). Os resultados foram semelhantes para os hipocótilos cultivados no meio de cultura de indução, suplementado com diferentes concentrações de TDZ. No entanto, observou-se um acréscimo, porém baixo, nos percentuais de calogênese com o aumento das concentrações deste regulador de crescimento (Figura 4B).

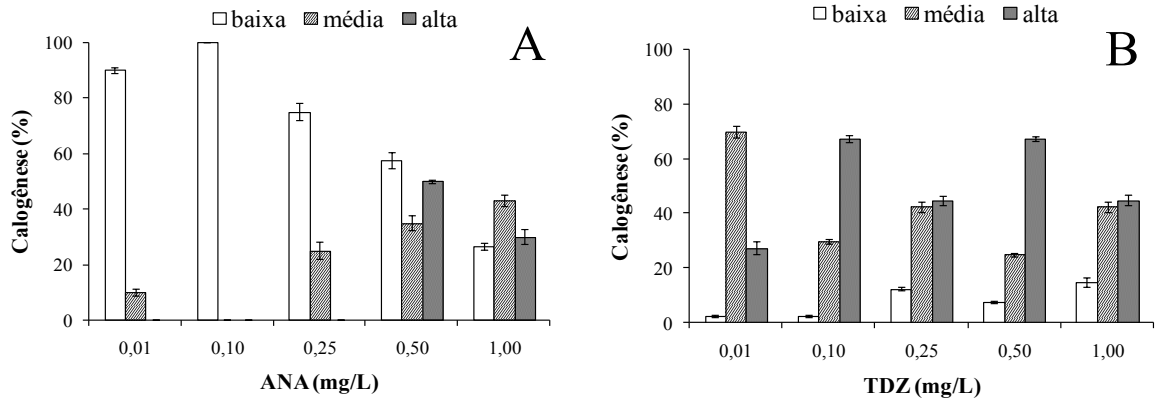


Figura 3 – Percentual de calogênese das folhas cotiledonares de *E. cloeziana* na fase de indução organogênica nas diferentes concentrações de ANA (A) e TDZ (B), aos 30 dias de cultivo *in vitro*

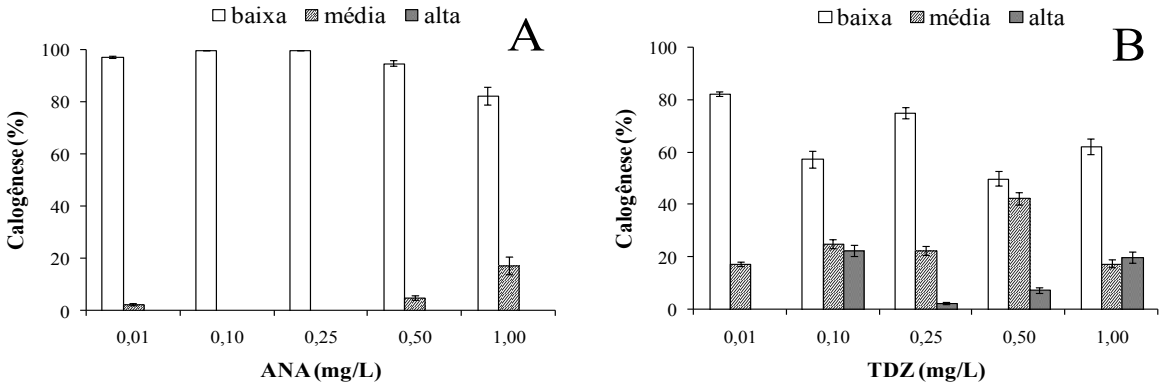


Figura 4 – Percentual de calogênese dos hipocótilos de *E. cloeziana* na fase de indução organogênica nas diferentes concentrações de ANA (A) e TDZ (B), aos 30 dias de cultivo *in vitro*

A calogênese teve início a partir de 10 dias de cultivo*in vitro*, sendo observada em todos os tratamentos independentemente do regulador de crescimento utilizado para a indução das culturas organogênicas (Figuras 5A e 5B). Em geral, os calos organogênicos formados eram friáveis, apresentando uma coloração amarela esbranquiçada (Figura 5C).

A rizogênese foi observada em calos de hipocótilos e de folhas cotiledonares para os tratamentos com as maiores concentrações de ANA (0,5 e 1,0 mg $L^{-1}$), enquanto no tratamento com 0,01 mg $L^{-1}$ de TDZ ocorreu a formação de raízes adventícias apenas em folhas cotiledonares (Figura5D).

Nos tratamentos de indução não se observou a formação de gemas adventícias, porém, esta fase foi determinante para a obtenção da regeneração destas na próxima etapa.

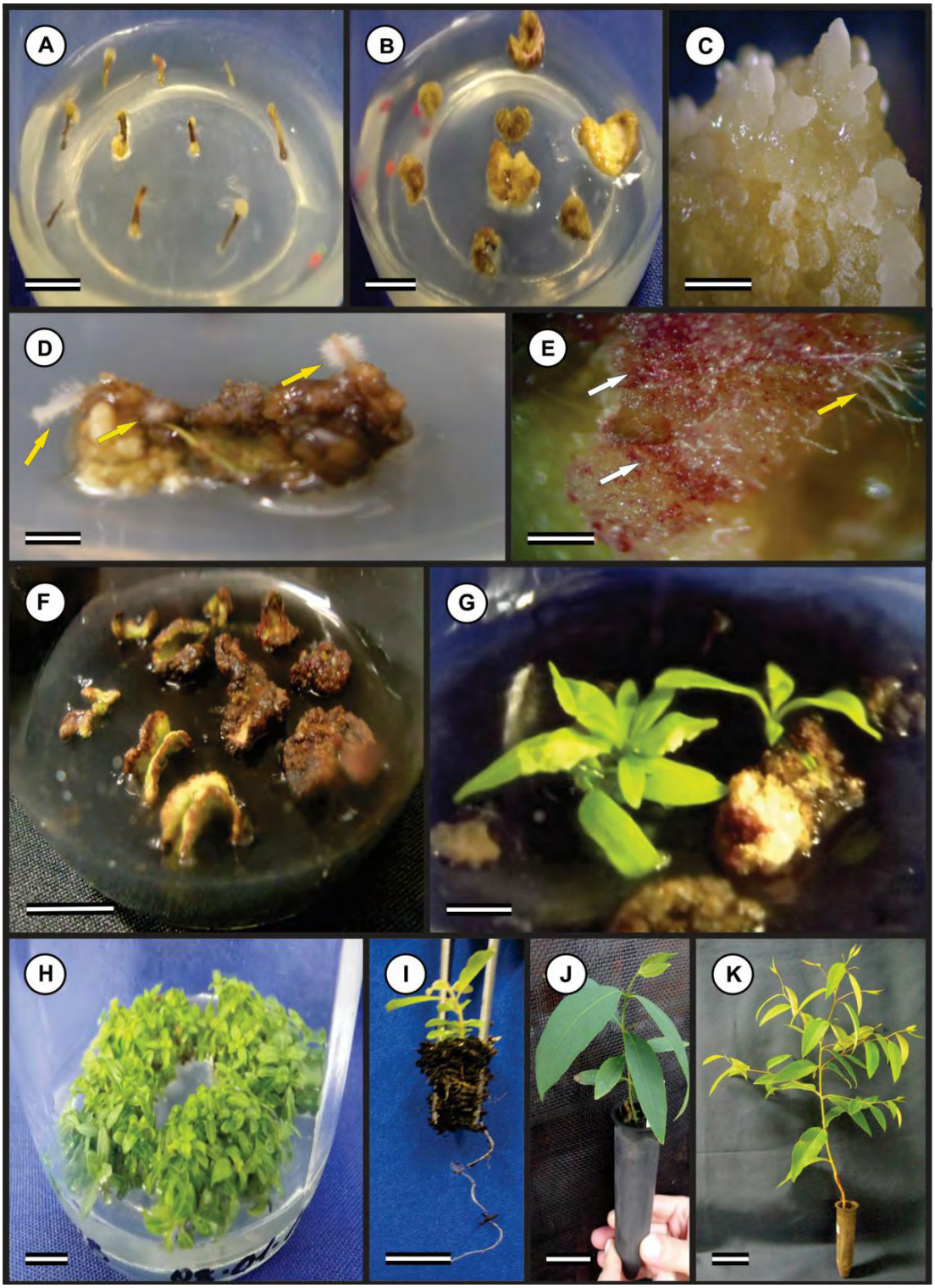


Figura 5 – Detalhe das fases da organogênese indireta e do posterior enraizamento e aclimatização das gemas adventícias de *E. cloeziana*.A = Hipocótilos na fase de indução. Barra = 1 cm; B = Folhas cotiledonares na fase de indução. Barra = 1 cm; C = Detalhe do calo em tratamento com TDZ na fase de indução. Barra = 50 µm; D = Rizogênese (setas) em folhas cotiledonares na fase de indução. Barra = 0,1 cm; E = Detalhe da presença de antocianinas (setas brancas) e raízes (seta amarelas) em calos de folhas cotiledonares na fase de indução. Barra = 50 µm; F = Oxidação em calos induzidos em folhas cotiledonares. Barra = 1 cm; G = Gemas adventícias em folha cotiledonar. Barra = 1 cm; H = Microcepas formadas a partir das gemas adventícias na fase de multiplicação *in vitro*. Barra = 1 cm; I = Microplanta proveniente de microestaca enraizada em miniestufa. Barra = 1 cm; J = Microplanta enraizada e transplantada para tubete. Barra = 1 cm; K = Microplanta enraizada completamente desenvolvida aos 120 dias após a aclimatização. Barra = 2 cm

### 2.3.2 Fase de diferenciação

A regeneração de gemas adventícias de *E. cloeziana* somente foi obtida a partir de calos induzidos nos tratamentos com TDZ na fase anterior. Nesses tratamentos observou-se a presença de antocianinas nos calos induzidos nos explantes (Figura 5E). Os calos induzidos pelo uso de ANA, quando subcultivados em meio de diferenciação, apresentaram elevada oxidação (Figura 5F).

A frequência de regeneração de gemas adventícias foi maior no meio de cultura suplementado com 1,00 mg $L^{-1}$ de BAP (T1) a partir de calos induzidos em folhas cotiledonares (Tabela 2). Para esse mesmo tratamento também foi obtida a regeneração de gemas adventícias em calos induzidos em hipocótilos, porém, em menor frequência (Tabela 2). Nos demais tratamentos, a organogênese de gemas adventícias foi obtida apenas em calos induzidos em folhas cotiledonares (Figura 5G). Na fase de diferenciação, a regeneração de gema adventícia ocorreu nos calos induzidos nos tratamentos com concentrações superiores a 0,01 mg $L^{-1}$ de TDZ.

Tabela 2 - Frequênciade regeneração(%) de gemas adventícias em calos induzidos em hipocótilos (hip) e folhas cotiledonares (cot) de *E. cloeziana*na fase de diferenciação nostratamentos com BAP e ANA, aos 60 dias de subcultivo *in vitro*

| Tratamentos | BAP (mg/L) | ANA (mg/L) | explante | tratamentos de indução TDZ (mg $L^{-1}$) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 0,01 | 0,1 | 0,25 | 0,50 | 1,00 |
| T1 | 0,50 | 0,00 | hip | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | | | cot | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| T2 | 1,00 | 0,00 | hip | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 6,0 | 0,0 |
| | | | cot | 0,0 | 0,0 | 14,0 | 0,0 | 15,0 |
| T3 | 0,50 | 0,50 | hip | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | | | cot | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| T4 | 1,00 | 0,50 | hip | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| | | | cot | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

Amostras foram coletadas dos calos organogênicos aos 60 dias de cultura em meio de diferenciação. Em cortes longitudinais, áreas meristemáticas foram observadas nos calos organogênicos na região do pecíolo de folhas cotiledonares (Figura 6A). As áreas meristemáticas consistiram de células pequenas e isodiamétricas e com elevada relação núcleo/plasmática, que permite diferi-las das demais células indiferenciadas do calo (Figura 6B). O desenvolvimento destes centros meristemáticos foi apenas identificado a partir do segundo subcultivo em meio de cultura de diferenciação. Nas demais áreas dos explantes, ocorreram apenas uma intensa proliferação celular, a partir de células meristemáticas com grandes espaços intercelulares, sem haver diferenciação em regiões meristemáticas. No

decorrer dos subcultivos da fase de diferenciação observou a emergência de protuberâncias originadas a partir do desenvolvimento dos meristemas (Figura 6C).

Associado a estas regiões meristemáticas e meristemas observou-se o acúmulo de fenóis em suas células adjacentes, denotado pela coloração vermelho alaranjada, principalmente das células epidérmicas do calo organogênico (Figuras 6B e 6C).

A evidência da organogênese adventícia indireta em calos induzidos em hipocótilos e folhas cotiledonares de *E. cloeziana*foi comprovada pela conexão vascular entre as gemas adventícias e o tecido vascular do explante (Figura 6D).

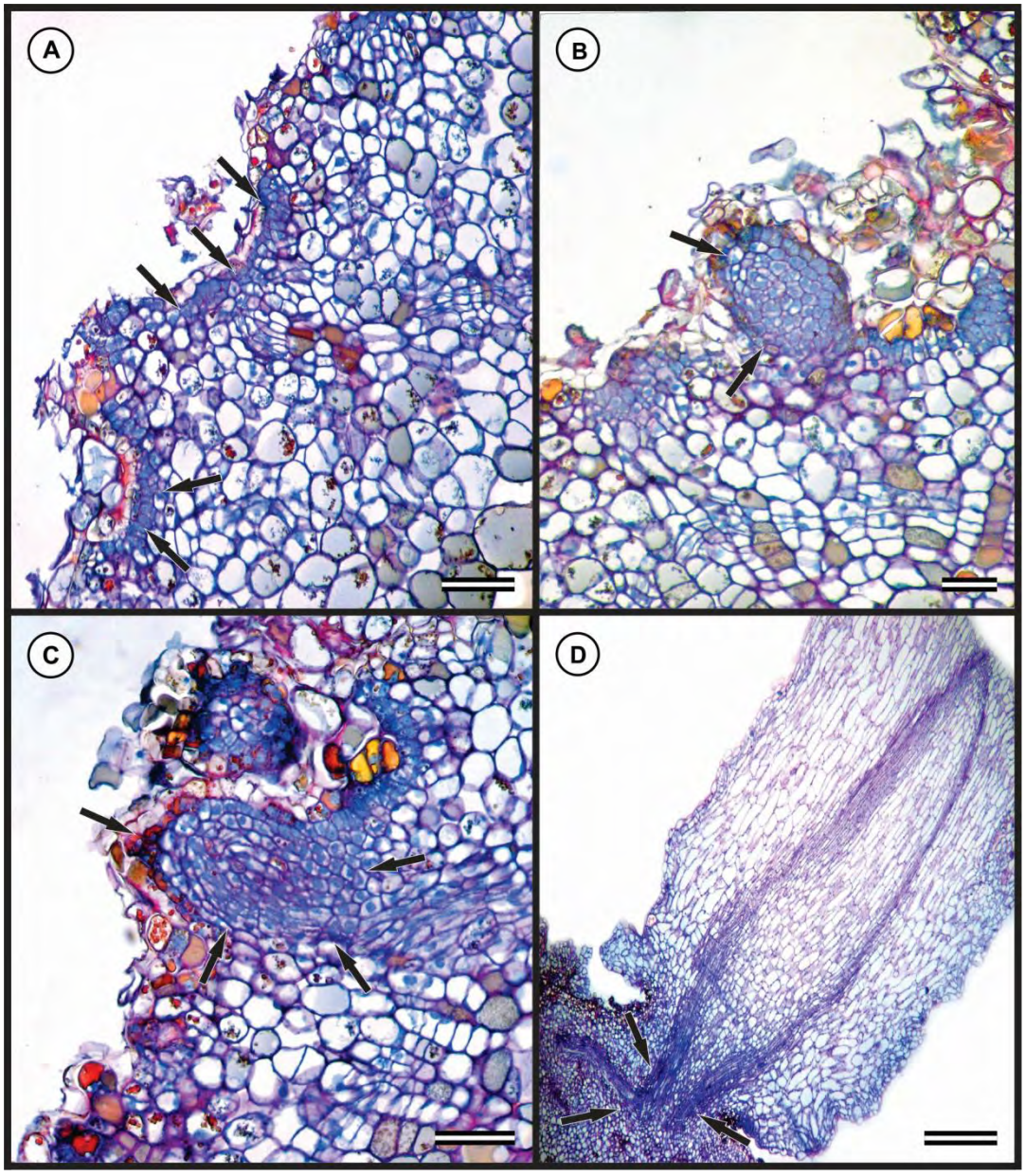


Figura 6 - Análise histológica da regeneração em calos induzidos nas folhas cotiledonares de *E. cloeziana*: A – Células meristemáticas (setas) na camada superficial do calo de folha cotiledonar; B = Meristema se desenvolvendo na superfície do calo induzido em folha cotiledonar (seta); C = Desenvolvimento de gema adventícia em calo de folha cotiledonar (seta); D = Corte longitudinal de brotação adventícia evidenciando a conexão vascular entre o tecido materno (setas). Barras = 50 µm

### 2.3.3 Multiplicação e alongamento das gemas adventícias

A micropropagação para ser considerada eficiente depende de elevados índices de proliferação durante o estádio de multiplicação. Nesse sentido, as gemas adventícias regeneradas foram transferidas para meio de cultura de multiplicaçãovisando incrementar o número das microcepas obtidas a partir das gemas adventícias. Os resultados evidenciaram no decorrer dos subcultivos, um incremento na taxa de multiplicação das microcepas (Figura5H). As maiores taxas de multiplicação foram observadas para os tratamentos de indução com 0,5; 0,1 e 0,25 mg $L^{-1}$ de TDZ, respectivamente com percentual de 35, 28 e 26% de multiplicação(Figura 7).

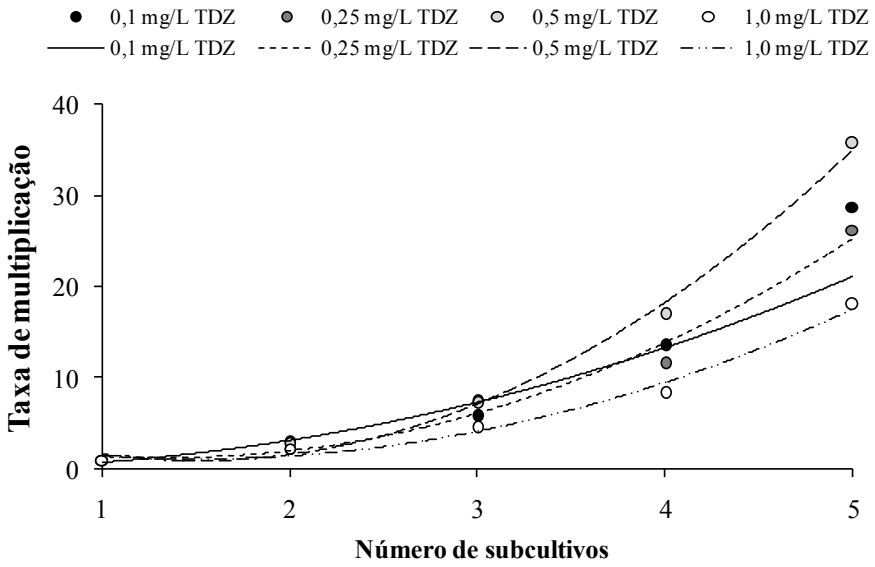


Figura 7 - Taxa de multiplicação de microcepas obtidas a partir de gemas adventícias induzidas em calos em folhas cotiledonares de *E. cloeziana*nos tratamentos de indução com TDZ, ao longo de cinco subcultivos na etapa de multiplicação

### 2.3.4 Aclimatização e enraizamento*ex vitro* das brotações

O percentual de enraizamento *ex vitro* obtido foi de 70% para as brotações acondicionadas em miniestufas por 30 dias (Figura5I). O sistema radicular formado apresentou bom vigor e estrutura morfológica padrão, com emissão de elevado número de raízes secundárias. As mudas enraizadas apresentaram sobrevivência superior a 90% nas etapas posteriores de aclimatização na casa de sombra aos 45 dias e aos 90 dias na área de pleno sol (Figuras 5J e 5K). Destaca-se que a aclimatização das brotações alongadas de *E. cloeziana* acompanhada do enraizamento *ex vitro* foi realizada com sucesso no sistema de miniestufa.

## 2.4 Discussão

### 2.4.1 Efeito do tipo de explantes e dos reguladores de crescimento

Os resultados obtidos confirmam o potencial morfogênico de folhas cotiledonares e hipocótilos de *E. cloeziana*. Estes resultados, assim como os encontrados na literatura, evidenciam as diferenças nos potenciais de regeneração dos tecidos na presença de reguladores de crescimento. A presença de reguladores de crescimento na cultura de tecidos é essencial para a morfogênese *in vitro* levando-se em consideração a regulação da interação e balanço entre os reguladores de crescimento e os hormônios vegetais (PERES, 2002). Além disso, o modo de interação entre os reguladores de crescimento é frequentemente dependente da espécie da planta e do tipo de tecido utilizado na cultura(COENEN; LOMAX, 1998).A escolha dos reguladores de crescimento constitui a primeira fase a ser abordada para a definição da melhor condição para a organogênese (PIERIK, 1997).

As auxinas e as citocininas são reconhecidas como os principais reguladores de crescimento envolvidos na morfogênese vegetal (GENEVE et al., 2011). No presente trabalho, durante a fase de indução foi possível observar diferenças significativas entre os reguladores de crescimento TDZ e ANA, em que os melhores resultados quanto à calogênese dos explantes, acompanhada de menores percentuais de oxidação foram obtidas nos tratamentos com TDZ, independentemente da concentração utilizada. O TDZ é um regulador de crescimento com atividades similares a das citocinas, atuando em várias respostas morfogênicas (MOK; MOK, 2001; GUO et al., 2013), incluindo o estímulo na regeneração de brotações adventícias em diversas espécies lenhosas (HUETTAMAN; PREECE, 1993; IPEKCI; GOZUKIRMIZI, 2004; AFTAB; PREECE, 2007). Especificamente para *Eucalyptus* o TDZ foi utilizado na indução de calos de *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* (BARRUETO CID et al., 1999; ALVES et al., 2004), organogênese de *E. globulus* (AZMI et al., 1997) e embriogênese somática de *E. microtheca* (MAMAGHANI et al., 2009).

Um dos principais objetivos deste trabalho foi verificar qual o tipo de explante que apresenta menor oxidação e maior potencial organogênico dos tecidos. Independentemente do explante testado, a rota organogênica foi idêntica para ambos. Inicialmente, houve o desenvolvimento de calos e a partir das camadas superficiais destes ocorreu a formação de brotações adventícias.

No decorrer do experimento constatou-se que a intensidade de oxidação dos explantes aumentou conforme transcorria o período de cultivo *in vitro*, provavelmente devido à exposição à luz na sala de cultivo (Figura 4F). A presença de substâncias oxidantes no meio de indução organogênicapossivelmente tenha sido um dos principais fatores limitantes para o

sucesso da regeneração *in vitro* de *E. cloeziana*. As substâncias oxidantes presentes no meio de cultura têm sido caracterizadas como resultado da oxidação de compostos fenólicos, os quais atuam como sinalizadores no processo de crescimento das plantas, diferenciação celular e na organogênese (ASSIS et al., 2004). Contudo, o acúmulo destas substâncias no meio de cultura pode alterar a indução de estruturas organogênicas. No presente trabalho, a oxidação dos explantes provavelmente se deu pelas condições de cultivo *in vitro*, principalmente a radiação, uma vez que a luz está diretamente relacionada à síntese de fenóis (DIBAX et al., 2005; MAHAJAN et al., 2012). A redução dos períodos de subcultivos e o acréscimo ao meio de cultura de antioxidantes podem contribuir para a redução da oxidação dos fenóis (JONES; SAXENA, 2013). Na organogênese de *E. cloeziana* a oxidação ocorreu praticamente em todos explantes nos três tratamentos utilizados para a diferenciação das gemas adventícias (Figura 5I), mas aadição de carvão ativado ao meio de cultura fase de diferenciação reduziu a progressão da oxidação dos explantes.

Os resultados revelaram que ambos os tipos de explantes produziram calos, entretanto, as folhas cotiledonares foram mais responsivas que os hipocótilos, com maior formação de calos (Figuras 3A e 3B). As diferenças observadas no potencial organogênico dos explantes podem estar correlacionadas às alterações no nível endógeno de hormônios, os tipos celulares responsivos à indução de formação de gemas adventícias. Resultados similares em relação à resposta do tipo de explante à organogênese foram reportados para *E. grandis* × *E. urophylla* (BARRUETO CID et al., 1999).

Os calos formados nos tratamentos com TDZ apresentaram pigmentação avermelhada denotando a presença de antocianinas, principalmente nos calos oriundos das folhas cotiledonares(Figura5E). Diversos são os trabalhos que mencionam a presença, síntese e acúmulo de antocianinas, bem como sua correlação ao controle do desenvolvimento *in vitro* de células e calos de inúmeras espécies vegetais (MATHUR et al. 2009). A relação entre a presença de antocianina e a de organogênese foi relatada para *E. camaldulensis* (MURALIDHARAN; MASCARENHAS, 1987; DIBAX et al., 2005;), *E. tereticornis* (SUBBAIAH; MINOCHA, 1990), *E. gunnii* (HERVÉ et al., 2001), *E. urophylla* x *E. grandis* (ALVES et al., 2004).

Na indução da calogênese em ambos os explantes avaliados de *E. cloeziana* observou-se que a rizogênese foi induzida nas maiores concentrações de ANA, tanto em hipocótilos, como em folhas cotiledonares (Figura5D). Possivelmente, a absorção de auxina exógena elevou os níveis endógenos de auxina nas células e redirecionou a rota morfogênica à

indução de raízes adventícias. Os altos teores endógenos de auxina nas folhas representam um entrave para a regeneração *in vitro* de brotações adventícias (SANIKHANI et al., 2006).

A regeneração dessincronizada de gemas adventícias em *E. cloeziana* ocasionou a formação e crescimento heterogêneos de gemas adventícias nos explantes (Figura5G). As diferenças observadas na regeneração *in vitro* de um mesmo tipo de explante decorrem da variação genotípica entre as sementes utilizadas para a formação dos explantes (TIBOK et al., 1995). Como se pode observar nas Figuras 3 e 4 os melhores resultados obtidos tanto em folhas, quanto nos hipocótilos de *E. cloeziana,* no que se refere a indução calogênica foi para os tratamentos nos quais o TDZ foi acrescido ao meio de cultura. O efeito residual do TDZ, utilizado nessa fase de indução, possivelmente esteja relacionado a este resultado.Esse regulador de crescimento induz a formação de gemas adventícias e embriões somáticos em maior frequência do que tratamento auxina-citocinina (RADICE, 2010; ASGHAR et al., 2013). Não obstante, o TDZ é resistente às oxidases, sendo estável e biologicamente ativo em concentrações menores que as demais citocininas (MOK et al., 1987). Este efeito foi constatado para *Eucalyptus saligna*, *E. smithii*, *E. macarthurii* e *E. macarthurii* x *E. grandis* cultivados em meio contendo 0,45 e 0,9 μM de TDZ (LE ROUX; VAN STADEN, 1991).

Os calos foram induzidos nas extremidades dos hipocótilos e na região basal do pecíolo na folha cotiledonar. Esta resposta provavelmente esteja ligada a exposição direta das células do câmbio vascular desses explantes ao meio de cultura, uma vez que se trata de tecido muito responsivo à regeneração de brotações adventícias (CUENCA; VIEITEZ, 1999; HAJARI et al., 2006; MICOCK; WATT, 2012). De maneira similar, maior indução de gemas adventícias de *E. camaldulensis* ocorreu na região basal do pecíolo de folhas cotiledonares (DIBAX et al., 2005, 2010) e também a partir de calos induzidos na região proximal ao pecíolo de folhas de *E. gunnii* (HERVÉ et al., 2001).

A diferenciação e formação de gemas adventícias apenas ocorreram nos tratamentos onde o BAP foi acrescido isoladamente ao meio de cultura ou quando combinado, em concentração superior à de ANA (Tabela 2). Os resultados evidenciaram o efeito positivo do BAP na organogênese de gemas adventícias de *E. cloeziana* na fase de diferenciação (Figura 4G). A organogênese a partir de explantes foliares para muitas espécies foi obtida com o emprego combinado de auxinas e citocininas (SANIKHANI et al., 2006). O balanço entre auxina e citocinina, com favorecimento da citocinina parece ter papel central na regeneração (DIBAX et al., 2005). Em *E. globulus* a maior frequência de regeneração foi verificada nos tratamentos que associaram BAP e TDZ (AZMI et al., 1997). A utilização do BAP na

diferenciação de gemas também foi relatada em *Eucalyptus tereticornis* (AGGARWAL et al., 2010; PRAKASH; GURUMURTHI, 2005), *E. camaldulensis* (DIBAX et al., 2005).

Análises histológicas foram realizadas nos calos desenvolvidos a partir das folhas cotiledonares para se confirmar a origem ontogênica das brotações adventícias. Por meio de cortes histológicos observou-se a presença de células com tamanho reduzido, isodiamétricas e com elevada relação núcleo/plasmática, características essas que permitiram distingui-las das demais células indiferenciadas do calo (Figuras 6B e 6C). O agrupamento de células com essas características define as regiões meristemáticas ou centros meristemáticos (THORPE; KUMAR, 1993), os quais apresentam intensa atividade mitótica, responsáveis pela diferenciação celular dos calos.

As brotações se diferenciaram a partir das camadas celulares superficiais dos explantes em regiões com a formação de calos (Figuras 6A-C). As células da camada superficial do calo apresentaram alta atividade meristemática, diferenciando-se em meristemóides, os quais por sua vez se desenvolveram em brotações adventícias (Figuras 6B e 6C). Os meristemas se originaram das divisões periclinais e anticlinais das células epidérmicas e subepidérmicas dos calos. A organização inicial do meristema em diferentes tecidos ficou evidente no corte histológico, evidenciada por uma camada celular mais externa organizada de maneira diferenciada da região central, com a formação de meristemóides (Figura 6C).

As análises histológicas revelaram que todas as brotações formadas nos explantes provenientes de folhas cotiledonares apresentaram uma conexão ao sistema vascular do explante que lhe deu origem (Figura 6D). Esses resultados corroboram com as afirmações realizadas por Almeida et al. (2012), que mencionam a influência de combinações de reguladores de crescimento aplicados exogenamente (ANA/BAP e ANA/TDZ ), na atividade de células pré-procambiais, as quais podem atuar em diferentes vias morfogênicas para estabelecer células competentes de nicho.

### 2.4.2 Multiplicação e alongamento das gemas adventícias

Os resultados demonstraram que o cultivo das gemas adventícias em meio WPM suplementado com 0,2 mg $L^{-1}$ de BAP foi favorável para a sua multiplicação e obtenção de brotações alongadas. Brotações alongadas aptas para serem aclimatizadas foram obtidas apenas a partir do 5º subcultivo no meio de multiplicação.

As brotações adventícias foram multiplicadas com sucesso, através da proliferação de brotações axilares (Figura 4H). O balanço hormonal utilizado entre BAP (0,2 mg $L^{-1}$) e

ANA (0,01 mg $L^{-1}$) foi adequado para promover a multiplicação e o alongamento das brotações adventícias em meio de cultura WPM. O BAP corresponde a citocinina mais utilizada no meio de multiplicação de *Eucalyptus* (ALVES et al., 2004). Entretanto, observaram-se variações nas taxas de multiplicação das microcepas de acordo com a concentração de TDZ, na fase anterior de indução (Figura 7).

A menor taxa de multiplicação das gemas regeneradas a partir de calos induzidos com 1,0 mg $L^{-1}$ de TDZ provavelmente esteja relacionado a um efeito inibitório desse regulador de crescimento. As brotações obtidas a partir desse tratamento não alongaram e apresentaram no decorrer dos subcultivos, intensocalejamentona base dos explantes. O efeito inibitório do TDZ no alongamento *in vitro* foi relatado em vários trabalhos com espécies lenhosas (THENGANE et al., 2001; PRUSKI et al., 2005). O TDZ estimula a biossíntese de citocininas nas plantas, elevando os níveis endógenos nos tecidos (RUZIC; VUJOVIC, 2008). Portanto, o tratamento com 1,0 mg $L^{-1}$ de TDZ possivelmente favoreceu a manutenção de um elevado nível endógeno de citocinina nas brotações resultando em um inadequado balanço hormonal para a multiplicação e o alongamento *in vitro.*

### 2.4.3 Aclimatização e enraizamento *ex vitro* das brotações

Os resultados obtidos na fase de enraizamento e aclimatização das brotações adventícias de *E. cloeziana* nas miniestufas demonstraram que os procedimentos adotados durante essa etapa foi bem sucedido (Figuras 4I-K). A possibilidade de conciliar o enraizamento *ex vitro* com a aclimatização das brotações é um fator de grande importância para o protocolo de propagação, tanto pela redução de custos, supressão de uma etapa de enraizamento *in vitro* (XAVIER; COMÉRIO, 1996) e principalmente por demonstrar a viabilidade do protocolo na obtenção de brotações adventícias fisiologicamente ativas. Destacando-se que a micropropagação é limitada pela reduzida sobrevivência das plantas quando transferidas para as condições *ex vitro* (ROHR et al., 2003).

A aclimatização *ex vitro* de plantas micropropagadas é realizada progressivamente, promovendo-se o incremento na irradiância e mantendo-se, inicialmente, alta umidade relativa do ar logo após o transplantio, com gradativa redução da mesma, até que a fase de rustificação se complete (CAMPOSTRINI; OTONI, 1996). A aclimatização das brotações corresponde a uma etapa crítica, devendo ser realizada gradativa e cuidadosamente para que se obtenha um alto percentual de sobrevivência.As miniestufas favoreceram o estabelecimento de umadequado microclima que contribuiu para a redução da perda de água

pelas microestacas, adaptação ao crescimento autotrófico e induziuao enraizamento adventício (BRONDANI et al., 2012a).

A regeneração *in vitro* de *E. cloeziana*, via organogênese adventícia representa uma nova oportunidade para a propagação dessa espécie, considerada recalcitrante ao enraizamento adventício via miniestaquia (ALFENASet al., 2009). Acrescenta-se que estes resultados constituem informações importantes para o entendimento da via organogênica em *Eucalyptus*e abrenovas oportunidades para estudos com a regeneração *in vitro* da espécie, incluindo a embriogênese somática, além de permitir futuros trabalhos envolvendo sua transformação genética, podendo o protocolo de organogênese obtido ser utilizado em programas de melhoramento genético para a espécie.

Os resultados encontrados no presente trabalho referem-se ao primeiro trabalho reportado de organogênese indireta de *E. cloeziana* a partir de hipocótilos e folhas cotiledonares. Todavia, os reduzidos percentuais de regeneração de gemas adventícias inviabilizam o imediato estabelecimento da clonagem do *E. cloeziana*, em larga escala. Nesse sentido, a adoção da técnica de micropropagação via proliferação de gemas axilaresapresenta-se como uma alternativa para viabilizara propagação do *E. cloeziana* de maneira mais efetiva. Ademais, a utilização dessa técnica permite a multiplicação de genótipos adultos selecionados, o que é desejável em programas de melhoramento florestal. Para tanto, faz-se necessário o emprego de técnicas de resgate vegetativo das matrizes adultas de *E. cloeziana* para a obtenção de explantes para o estabelecimento *in vitro* das mesmas, tema esse abordado no próximo capítulo.

## 2.5 Conclusão

As folhas cotiledonares corresponderam aos explantes mais responsivos aos tratamentos utilizados, produzindo maior número de brotações adventícias.

A regeneração *in vitro* de brotações adventícias de *E. cloeziana* foi obtida apenas para os calos induzidos nos tratamentos com TDZ na fase de indução.

O tratamento com 1,0 mg $L^{-1}$ de BAP proporcionou os maiores percentuais de formação de brotações adventícias.

A multiplicação *in vitro* das microcepas no meio de cultura WPM suplementado com 0,2 mg $L^{-1}$ de BAP e 0,01 mg $L^{-1}$ de ANA garantiu a obtenção de taxas de multiplicação crescentes.

A aclimatização e o enraizamento *ex vitro* das brotações foram obtidas com sucesso em miniestufas e posteriormente em casa de sombra.

**Referências**

AFTAB, F.; PREECE, J.E. Forcing and *in vitro* establishment of softwood shoots from large stem segments of woody plants. In: XU, Z.; LI, J.; XUE, Y.; YANG, W. (Ed.). **Biotechnology and sustainable agriculture 2006 and beyond**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 437-444.

AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; REDDY, M.S. Shoot organogenesis in elite clones of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, n. 1, p. 45-52,2010.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2.ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 500p.

ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C.V.; GRANER, E.M.; BRONDANI, G.E.; ABREU-TARAZI, M.F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 31, n. 8, p. 1495-1515, 2012.

ALVES, E.C.S.C.; XAVIER, A.; OTONI, W. Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptusgrandis* W. Hill ex Maiden x *E. urophylla* S. T. Blake.**Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n.5, p. 643-653, 2004.

ASGHAR, S.; SAYED J.A.; FAZLI WAHAB, N.H.K.; NASEEM, A.; LIGENG, C.X.H.; ONGHUA, Q. Direct induction of somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explantsof *Myrica rubra* Sieb. & Zucc.**African Journal of Agricultural Research**, Nairobi,v. 8, n. 2, p. 216-223, 2013.

ASSIS, T.F.; MAFIA, R.G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.) **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 93-121.

ASSIS, T.F.; FETT-NETO, A.G.; ALFENAS, A.C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: WALTER, C.; CARSON, M. (Ed.). **Plantation forest biotechnology for the 21$^{th}$ century**. Kerala: Research Signpots, 2004. p. 303-333.

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

BANDYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSSEN, G.; HAMILL, J. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species – *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Plant Science**, New York, v.140, n. 2, p. 189-198, 1999.

BARRUETO CID, L.P.; MACHADO, A.C.M.; CARVALHEIRA, S.R.C.; BRASILEIRO, A.C.M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **PlantCell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 56, n. 1, p. 17–23, 1999.

BELTRAME, R.; BISOGNIN, D.A.; MATTOS, B.D.; CARGNELUTTI, F.A.; HASELEIN, C.R.; GATTO, D.A.; SANTOS, G.A. Desempenho silvicultural e seleçãoprecoce de clones de híbridos de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 6, p. 791-796, 2012.

BRONDANI, G.E.; ONDAS, H.W.W.; BACCARIN, F.J.B.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. ***In Vitro*** **Cellular Development and Biology-Plant**, Columbia, v. 48, n. 5, p. 478-487, 2012a.

BRONDANI, G.E.; ARAUJO, M.A.; ALCÂNTARA, B.K.; CARVALHO, J.G.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. *In vitro* organogenesis of *Eucalyptus grandis*: effects of boron and calcium. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 34, n. 4, p. 403-411, 2012b.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W.C. **Aclimatação de mudas:** abordagens recentes. Brasília, EMBRAPA, CNPH, 1996. 12 p. (ABCTP Noticias,25).

COENEN, C.; LOMAX, T.L. The*Diageotropica*gene differentially affects auxin andcytokinin responses throughout development in tomato. **Plant Physiology**, New York, v. 117, n. 1, p. 63-72, 1998.

CUENCA, B.; VIEITEZ, A.M. Histological study of *in vitro* development of adventitious buds on leaf explants of oriental beech (*Fagus orientalis* lipsky). ***In Vitro*** **Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 35, n. 4, p. 326-332, 1999

DIBAX, R.; EISFELD, C.L.; CUQUEL, F.L.; KOEHLER, H.; QUOIRIN, M. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 4, p. 406–412, 2005.

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*. **Brazillian Archives Biology Technology**, Curitiba, v.53, n.2, p. 311-318, 2010.

FISHER, D.B. Protein staining of ribonnedepon section for light microscopy. **Histochemie**, Berlin, v.16, n. 1, p. 92-96, 1968.

GENEVE, R.L. Propagation from nonmeristematic tissues: organogenesis. In: TRIGIANO, R.C.; GRAY, D.J. **Plant tissue culture, development and biotechnology.**Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 245-258.

GIRIJASHANKAR, V. *In vitro* regeneration of *Eucalyptus camaldulensis*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Lucknow, v. 18, n. 1, p. 79–87, 2012.

GLOCKE, P.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. 6-Benzylamino purine stimulates *in vitro* shoot organogenesis in *Eucalyptus erythronema*, *E. stricklandii* and their interspecific hybrids. **ScientiaHorticulturae**, Amsterdan, v.109, n. 4, p. 339–344, 2006.

GRATTAPAGLIA, D.Forward genomics in *Eucalyptus:* from phenotypes to genes involved in wood formation. In: ICEP INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON *Eucalyptus* PULP, 3., 2007, Belo Horizonte. **Proceedings…** Belo Horizonte:UFV, LCP, 2007. p. 1-8.

GUO, B.; ABBASI, B.H.; ZEB, H.; XU, L.L.; WEI, Y.H. Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.10, n. 45, p. 8984-9000, 2013.

HAJARI, E.; WATT, M.P.; MYCOCK, D.G.; MCALISTER, B. Plant regeneration from induced callus of improved *Eucalyptus* clones. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 72, n. 2, p. 195-201, 2006.

HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J.N.; BOUDET, A.M.; TEULIÈRES, C.A. Procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, Oxford, v. 161, n. 4, p. 645-653, 2001.

HUETTAMAN, C.A.; PREECE, J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 33, n. 2, p. 105–119, 1993.

IPEKCI, Z.; GOZUKIRMIZI, N. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongate*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 22, n. 1, p. 16-24, 2004.

JONES, A.M.; SAXENA, P.K. Inhibition of phenylpropanoid biosynthesis in *Artemisia annua* L.: a novel approach to reduce oxidative browning in plant tissue culture. **Plos One**, São Francisco, v. 8, n. 10. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/related/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0076802;jsessionid=AE2131C737C457B867747E9C753042BB>. Acesso em: 03 outubro 2013.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal Cellular Biology**, New York, v. 27, n. 15, p. 137–138, 1965.

LE ROUX; J.J.; VAN STADEN, J. Micropropagation of *Eucalyptus* species. **Hortscience**, Alexandria, v. 26, n. 2, p. 199-200, 1991.

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**, Ashville, v. 30, p. 421–427, 1980.

MAHAJAN, N.;KUMAN, M.; SHRIVASTAVA, V.; SHARMA, V.; BHARDWAJ, U. Direct regeneration of HFRI-5 from nodes internodesand apical shoot explants.**Asian Journal of Plant Science and Research**, Pelagia, v. 2, n. 6, p. 653-658,2012.

MAMAGHANI, M.S.; ASSAREH, M.H.; OMIDI, M.; MATINIZADEH, M.; GHAMARI-ZARE, A.; SHAHRZAD, S.; FOROOTAN, M. The effect of thidiazuron level on in vitro regeneration typeand peroxidase profile in *Eucalyptus microtheca* F. Muell. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 59, n. 3, p. 199-2005, 2009.

MATHUR, A.; MATHUR, A.K.; GANGWAR, A.; YADAV, V.P.; SANGWAN, R.S.Anthocyanin production in a callus line of *Panax sikkimensis*Ban. ***In Vitro* Cellular and Development Biology-Plant**,Columbia, v. 46, n. 1, p. 13-21, 2009.

MICOCK, D.J.; WATT, M.P. Shoot and root morphogenesis from *Eucalyptus grandis* x *urophylla*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 101, p.16669-16676, 2012.

MOK, D.W.S.; MOK, M.C. Cytokinin metabolism and action. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Stanford, v. 52, n. 1, p. 89–118, 2001,

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E.; MUJER, C.V. Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 6, p. 1194-1197, 1987.

MULLINS, K.V.; LLEWELLYN, D.J.; HARTNEY, V.J.; STRAUSS, S.H. DENNIS, E.S. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 16, n. 11, p.787–791, 1997.

MURALIDHARAN, E.M.; MASCARENHAS, A.F. *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *E. camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. **PlantCell Reports**, Heidelberg, v. 6, n. 3, p.256–259, 1987.

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

NICCOL, R.J.; REGAN, P.A.; DE FILIPPIS, L.F. Simplified protocol for the micropropagation of selected *Eucalyptus* and *Banksia* species. **Australian Forestry**, Armidale, v. 57, n. 4, p. 143–147, 1994.

NUGENT, G.; CHANDLER, S.F.; WHITEMAN, P.; STEVENSON, T.W. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus*Labill. ***In Vitro*** **Cellular Development and Biology-Plant**, Columbia, v. 37, n. 3, p. 388–391, 2001a.

_____. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 6, n. 3, p. 785–788, 2001b.

PERES, E.P.L. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.25, p.44-48, 2002.

PIERIK, R.L.M. ***In vitro*****culture of higher plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997.348 p.

PINTO, G.; SANTOS, C.; NEVES, L.; ARAÚJO, L. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, New York, v.21, n.3, p.208-213, 2002.

PINTO, G.; PARK, Y.S.; SILVA, N.L.; ARAUJO, C.; SANTOS, C. Factors affecting maintenance, proliferation and germination of secondary somatic embryos of *Eucalyptus globulus*Labill. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 9, n. 1, p. 569–578, 2008.

PRAKASH,M.G.;GURUMURTHI,K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in*Eucalyptus tereticornis* Sim. **Current Science**, Bangalore, v. 88, n. 8, p. 1311-1316, 2005.

PRUSKI, K.; ASTATKIE, T.; NOWAK, J. Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa*) and Nanking cherry (*Prunus tomentosa*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 82, n. 2, p. 207–211, 2005.

RADICE, S. Micropropagation of *Codiaeum variegatum* (L.) blume and regeneration induction via adventitious buds and somatic embryogenesis. In: JAIN, S.M.; OCHATT, S.J. **Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants**. Helsink: Humana Press, 2010. p. 187-195.

RANI, G.; VIRK, G.S.; NAGPAL, A. Callus induction and plantlet regeneration in *Withaniasomnifera* (L.) Dunal. ***In Vitro* Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 39, n. 5, p. 468-474, 2003

RIBAS, L.L.F.; GUERRA, M.P.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L. Somatic embryogenesis in *Aspidospermapolyneuron*Mull. Arg. In: JAIN, S.M.; GUPTA, P.K.; NEWTON, R.J. **Somatic embryogenesis in wood plants**.6th ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 509-537.

ROHR, R.; ILIEV, I.; SCALTSOYIANNES, A. TSOULPHA. P. Acclimatization of micropropagated forest trees. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ACCLIMATIZATION AND ESTABLISHMENT OF MICROPROPAGATED PLANTS, 1., 2003, Sani-Halkidiki. **Proceedings…**Sani-Halkidiki: ISHS, 2003. p.59-69.

RUZIC, D.V.; VUJOVIC, T.I. The effects of cytokinin types and their concentration on *in vitro* multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). **Horticultural Science**, Praga, v. 35, n. 1, p. 12-21, 2008.

SANIKHANI, M.; FRELLO, S.; SEREK, M. TDZ induces shoot regeneration in various *Kalanchoeblossfeldiana*Poelln. cultivars in the absence of auxin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 85, n.1, p.75–82, 2006.

SARTORETTO, L.M.; SALDANHA, C.W.; CORDER, M.P.M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 861-871, 2008.

SUBBAIAH, M.M.; MINOCHA, S.C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 9, n. 7, p. 370–373, 1990.

THENGANE, Z.; KULKARNI, D.K.; SHRIKHANDE, V.A.; KRISHNAMURTHY, K.V. Effect of thidiazuron on adventitious shoot regeneration from seedling explants of *Nothpodytes foetida*. ***In vitro* Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 37, n. 2, p. 206–210, 2001.

THORPE, T.A.; KUMAR, P.P. Cellular control of morphogenesis. In: AHUJA, M.R. **Micropropagation of wood plants**.Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. p. 11-29.

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

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Enraizamento *ex vitro* de gemas de *Eucalyptusspp.* multiplicadas e alongadas in vitro. **Scientia Forestales**, Piracicaba, v.51,n. 1, p.29-36, 1997.

# 3 RESGATE DE MATRIZES ADULTAS DE *E. cloeziana* POR MEIO DE MEGAESTACAS

**Resumo**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da época do ano de coleta de megaestacas e do diâmetro das mesmas no resgate de matrizes adultas de *E. cloeziana.* Para tanto, avaliou-se a influência da época do ano (estação seca e chuvosa) de coleta das megaestacas e do diâmetro (1,0 – 8,0 cm) das mesmas na indução de brotações epicórmicas no resgate no resgate vegetativo de 5 matrizes adultas de *E. cloeziana*. Além disso, no segundo período de resgate (estação chuvosa), avaliou-se as diferenças entre as árvores matrizes e dos diâmetros das megaestacas coletadas na indução das brotações epicórmicas. A época correspondente à estação chuvosa demonstrou ser a mais adequada para o resgate das matrizes adultas de *E. cloeziana*. As megaestacas com diâmetros, compreendidos no intervalo de 2,0 e 5,0 cm, proporcionaram maior indução de brotações epicórmicas. De modo geral, o resgate de matrizes adultas de *E. cloeziana* foi tecnicamente eficiente.

Palavras-chave:Brotações adventícias; Maturação; *Eucalyptus*; Silvicultura clonal

**Abstract**

Theaim of this study was to evaluate the effect of season collection cuttings and cutting diameter in the rescue of *E.cloeziana* adult matrices. Thus, we evaluated the influence of season (dry and rainy seasons) to collect mega-cuttings and its diameter (1.0 – 8.0 cm) in the induction of epicormic shoots in the vegetative rescue of five *E. cloeziana* adult matrices. In addition, in thesecond rescue performed (rainy season), evaluated thedifferencesbetween the*E.cloeziana* adult matricesandthe cuttings diameters collectedin the inductionofepicormic shoots. The time corresponding to the rainy season proved to be the most suitable for the rescue of *E.cloeziana* adult matrices. Thecuttings, with diametersbetween 2.0and 5.0cm, showed higher induction of epicormic shoots. In general, the rescue of *E. cloeziana* adult matrices was technicallyefficient.

Keywords:Adventitious shoots; Maturation; *Eucalyptus*; Clonal forestry

## 3.1 Introdução

As espécies do gênero *Eucalyptus* correspondem às espécies florestais mais produtivas e plantadas nas regiões tropicais. O Brasil apresenta aproximadamente 4 milhões de hectares plantados com *Eucalyptus*, sendo estes plantios restritos a algumas espécies e seus híbridos. Entretanto, o plantio de outras espécies de *Eucalyptus* tem sido considerado, uma vez que a madeira de *Eucalyptus* tem sido recomendada para diversos fins, estimulando a implantação de florestas de uso múltiplo. Neste contexto, o *E. cloeziana* destaca-se principalmente pelas características tecnológicas de sua madeira, com ampla aplicabilidade de usos.

Na silvicultura clonal a seleção dos genótipos de *Eucalyptus* realiza-se na idade adulta, fase essa em que se observa um acentuado decréscimo na capacidade de propagação desses materiais genéticos. A transição da fase juvenil para a adulta é acompanhada de várias modificações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas espécies florestais, refletindo diretamente sobre a capacidade de clonagem dos materiais genéticos selecionados. Dessa forma, a escolha de propágulos com características juvenis é um dos principais pré-requisitos a serem considerados para obter sucesso na clonagem.

Os principais métodos de resgate de brotações de árvores adultas de *Eucalyptus* são destrutivos, onerosos e dificilmente podem ser aplicados. Isso se deve às dificuldades de rebrota das matrizes, ou ainda, pela impossibilidade de corte em vista de serem preservadas em razão do grande valor genético, como no caso de exemplares raros, históricos, presentes em áreas de proteção, de produção e coleta de sementes. Neste contexto, o resgate por meio da coleta de megaestacas (galhos podados da copa da árvore) apresenta-se como uma alternativa promissora, uma vez que mantém a integridade da árvore matriz.

A indução de brotações epicórmicas nas árvores de *Eucalyptus* apenas ocorre com um estímulo externo (BURROWS, 2002; WATERS et al., 2010; CRISP et al., 2011), sendo basicamente uma resposta ao estresse (BURROWS, 2008). Dentre os principais agentes estressores e indutores à formação de brotações epicórmicas em árvores pode-se citar o ataque de insetos (PIENE; EVELIGH, 1996), o fogo (BÉGIN; FILION, 1999), o vento (COOPER-ELLIS et al., 1999) ou as doenças (LANNER; BRYAN, 1981). No entanto, outros fatores como a seca (BURROWS, 2002), competição (NICOLINI et al., 2001), baixa qualidade de sítio (MUJURI; DEMCHIK, 2009), orientação do fuste (DELLA-BIANCA, 1972; DEAL et al., 2003), embolia nos sistema vascular (NICOLINI et al., 2001), o vigor da árvore matriz (MILLER; STRINGER, 2004; COLIN et al., 2008) e a luz (GORDON et al., 2006) também são citados por promover a indução de brotações epicórmicas.

Entretanto, é grande a carência de estudos sobre os fatores abióticos, como a sazonalidade, os efeitos do acúmulo de substâncias de reserva e dos genótipos na indução de brotações epicórmicas em megaestacas de *Eucalyptus.* Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da época do ano de coleta de megaestacas e do diâmetro das mesmas na indução de brotações epicórmicas no resgate vegetativo de cinco diferentes matrizes adultas de *E. cloeziana.*

### 3.2 Material e Métodos

Foram selecionadas 5 árvores com idade de 26 anos, em uma população base de *E. cloeziana*, originária de sementes de polinização aberta de 25 árvores matrizes. As progênies são procedentes da CSIRO (Lote 14425), coletadas na região de Gympie, estado de Queensland, Austrália (Lat. 26º18´, Long. 152º18´, Alt. 600 m). A população base foi instalada em março de 1983 na Estação Experimental de Ciências Florestais do departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), localizada no município de Anhembi – SP (22º 47' S de latitude; 48º 09' W de longitude e altitude de 500m).

As árvores dominantes do plantio foram escolhidas, com base na mensuração do DAP e altura (Tabela 1). Além disso, o critério visual foi utilizado selecionando árvores de fuste mais retilíneo possível e livre de defeitos, com a copa com menor número de galhos e sem visível de ataque de pragas e doenças.

Tabela 1 - Valores de diâmetro à altura do peito (DAP) e de altura das 5 árvores matrizes de *Eucalyptus cloeziana*, com 26 anos de idade, selecionadas para a coleta de megaestacas para indução de brotações epicórmicas

| Árvore matriz | DAP (cm) | Altura (m) |
|---|---|---|
| 3 | 59,21 | 27,2 |
| 5 | 48,06 | 31,2 |
| 6 | 51,25 | 26,8 |
| 13 | 54,75 | 26,6 |
| 15 | 44,56 | 27,0 |

O resgate das árvores selecionadas de *E. cloeziana*no campo foi realizado, conforme relatado por Almeida et al. (2007), pela retirada de galhos situados na posição mais baixa da copa, com o intuito de minimizar os efeitos da idade ontogenética.

As megaestacas (denominação dos galhos podados) foram seccionadas com um tamanho de aproximadamente 0,60 m de comprimento. Estas foram acondicionadas em condições de casa de vegetação climatizada (umidade relativa do ar > 80%, temperatura entre 26 e 30 ºC), no viveiro do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP). As megaestacas foram dispostas na posição vertical dentro de vasos de polipropileno (3 L) preenchidos com areia lavada para a indução de brotações epicórmicas (Figura 1A).

Duas coletas de materiais foram realizadas no ano, sendo a primeira (época 1) em maio e a segunda (época 2) em dezembro de 2011. No mês de maio coletou-se megaestacas

com menores diâmetros, em torno de 3,4 cm, enquanto no mês de dezembro os galhos coletados possuíam diâmetros maiores, em média 5,1 cm.

Avaliou-se a capacidade de emissão de brotações epicórmicas nas megaestacas nas duas diferentes épocas do ano e também nas diferentes classes de diâmetro das megaestacas. Os dados obtidos foram coletados após 60 dias de permanência das megaestacas na casa de vegetação e analisados por meio das médias e desvio padrão da média.

No segundo resgate realizado, no mês de dezembro, avaliou-se também o número, a sobrevivência, o comprimento das brotações epicórmicas e o número de brotações epicórmicas induzidas por ponto de formação das mesmas nas megaestacas coletadas das árvores matrizes de *E. cloeziana*, após 60 dias de permanência na casa de vegetação. Este experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, utilizando 3 repetições compostas de três megaestacas por repetição.

Os dados foram submetidos ao teste de Hartley ($P<0,05$) e Lilliefors ($P<0,05$) para verificar a normalidade e a homogeneidade de variância dos dados. Em seguida, foi realizada a análise de variância (ANOVA) ($P<0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P<0,05$), utilizando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa – OK, USA).

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Resgate de matrizes adultas em diferentes épocas do ano

Os resultados demonstraram maior indução de brotações epicórmicasnas megaestacas coletadas na época 2, independentemente da matriz da qual foi realizada o resgate (Tabela2 e Figura 1A).Todavia, o número de brotações epicórmicas induzidas nas megaestacas coletadas na época 2 variou entre as árvores matrizes, apresentando a árvore matriz 15 produção maiores que as demais matrizes.

Tabela2 - Número médio de gemas epicórmicas induzidas em megaestacas de cinco árvores matrizes de *E. cloeziana*, coletados em duas diferentes épocas do ano

| **Época do** | **Árvores matrizes** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **ano** | **03** | **05** | **06** | **13** | **15** |
| **1** | 20 ± (2,4) | 25 ± (1,0) | 21 ± (2,5) | 24 ± (0,8) | 26 ± (1,3) |
| **2** | 183 ± (2,7) | 247 ± (2,5) | 205 ± (3,1) | 184 ± (3,2) | 323 ± (5,7) |

* valores entre parênteses representam o desvio padrão da média

Considerando os diâmetros das megaestacas coletadas ocorreu uma variação no número de brotações epicórmicas induzidas nas duas épocas de coleta das

megaestacas(Figura1). Os melhores resultados foram observados para megaestacas com diâmetros variando de 2,0 a 5,0 cm, independentemente da época de resgate do material (Figuras 2A e 2B). A época 2 apresentou maior número de brotações epicórmicas induzidas nas megaestacas coletadas comparativamente à época 1. Contudo, houve redução drástica no número de brotações epicórmicas induzidas nas megaestacas com diâmetros superiores a 5,0 cm coletadas na época 2.

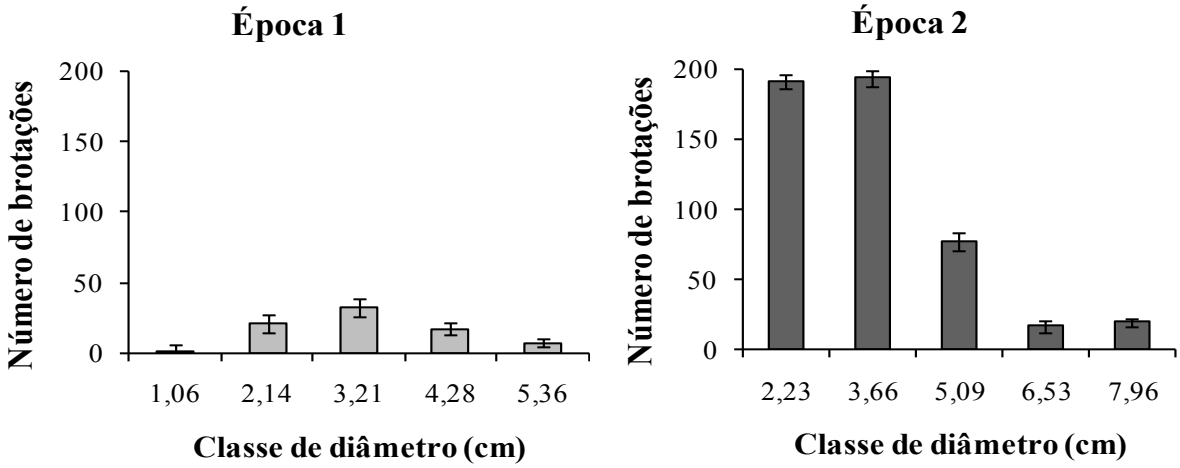


Figura 1 - Número médio de brotações epicórmicas em diferentes classes de diâmetro de megaestacas de cinco árvores matrizes de *E. cloeziana*, coletados em duas épocas do ano (época 1 – estação seca; 2 – estação chuvosa)

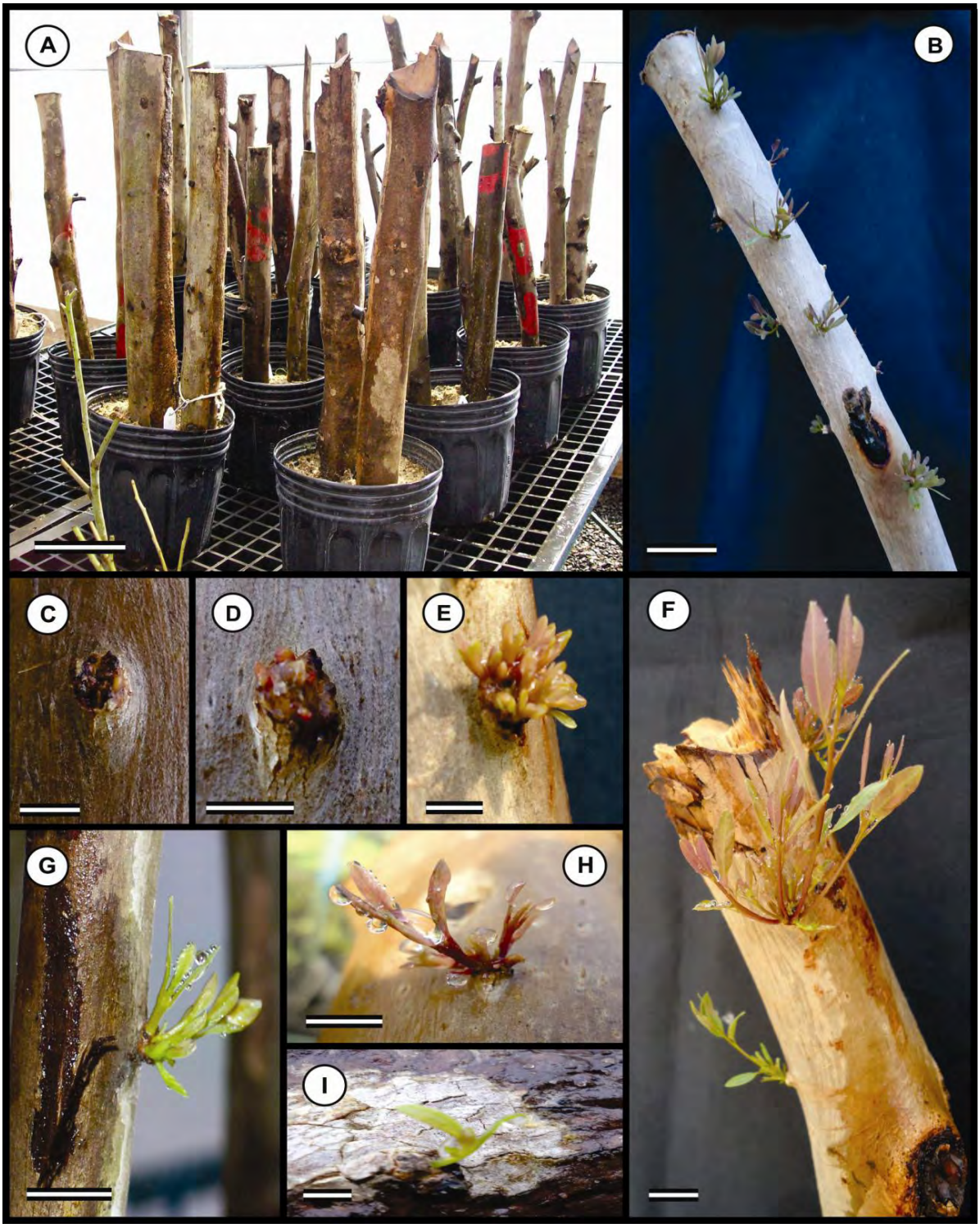


Figura 2 - Detalhe doresgate vegetativo de matrizes adultas de *E. cloeziana* por meio de megaestacas. A - Megaestacas acondicionadas em casa de vegetação para a indução de brotações epicórmicas. Barra = 10 cm; B – Brotações epicórmicas induzidas em megaestacas coletada na época 2. Barra = 4cm; C – Pontuação intumescida na megaestacas a partir da qual se formou as brotações epicórmicas. Barra = 0,5 cm; D – Desenvolvimento inicial das brotações epicórmicas nas megaestacas. Barra = 0,5 cm; E – Brotações epicórmicas induzidas a partir de um mesmo ponto na superfície da megaestaca. Barra = 4,0 cm; F = Brotações epicórmicas induzidas em megaestacas da árvore matriz 06 de *E. cloeziana*. Barra = 2,0 cm; G = Brotações epicórmicas induzidas em megaestacas com diâmetro médio de 2,0 cm. Barra = 1,0 cm; H = Brotações epicórmicas induzidas em megaestacas de casca de menor espessura. Barra = 1,0 cm; I = Brotações epicórmicas induzidas em megaestacas de casca de maior espessura. Barra = 0,5 cm

### 3.3.2 Resgate de matrizes adultas através de megaestacas de diferentes diâmetros

A indução de brotações epicórmicas nas megaestacas variou de acordo com o diâmetro das mesmas e entre as diferentes árvores matrizes de *E. cloeziana*estudadas. Os resultados demonstraram que para o diâmetro médio de 3,66 cm, todas as megaestacas das árvores matrizes induziram a formação de gemas epicórmicas, correspondendo também à classe de diâmetro com maior número de gemas epicórmicas induzidas (Tabela3). As megaestacas dentro da classe de diâmetro de 5,09 cm apresentaram a indução de gemas epicórmicas para quatro das cinco árvores matrizes avaliadas. Nas demais classes de diâmetro, a indução das gemas epicórmicas foi observada apenas para as árvores matrizes 5, 6 e 15 (Tabela3).

As megaestacas das árvores matrizes 6 e 15 corresponderam aos materiais genéticos com o maior número de gemas epicórmicas induzidas. A indução de gemas epicórmicas ocorreu em quatro das cinco classes de diâmetro das megaestacas destas matrizes (Tabela3). O maior número de gemas epicórmicas foi induzido dentro de um intervalo de diâmetro das megaestacas, compreendido entre 2,24 e 5,09 cm.

Tabela 3– Número médio de brotações epicórmicas induzidas em diferentes diâmetros de megaestacas coletadas de 5 árvores matrizes de *E. cloeziana*, após 60 dias de permanência em casa de vegetação

| **Árvore** | **Classe de diâmetro das megaestacas (cm)** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Matriz** | **2,23** | **3,66** | **5,09** | **6,53** | **7,96** |
| **3** | 0,00 Bb | 11,54 Aa | 3,00 Aab | 0,00 Bb | 0,00 Bb |
| **5** | 0,00 Bb | 7,00 Aab | 8,08 Aa | 9,93 Ba | 0,00 Bb |
| **6** | 33,02 Aa | 8,80 Aa | 4,61 Aa | 6,00 Ba | 0,00 Ba |
| **13** | 0,00 Ba | 12,97 Aa | 0,00 Aa | 0,00 Ba | 0,00 Ba |
| **15** | 0,00 Ba | 11,47 Aa | 12,97 Aa | 25,00 Aa | 18,51 Aa |

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna, dentro de uma classe de diâmetro entre as árvores matrizes e letras minúsculas iguais na mesma linha, para uma mesma árvore matriz entre as classes de diâmetro, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A indução de brotações epicórmicas nas megaestacas das árvores matrizes de *E. cloeziana* ocorreu ao longo de toda a superfície das mesmas, independentemente da posição apresentada na árvore no campo (mais próximo ou distante do tronco). As megaestacas apresentaram a indução de mais de uma brotação epicórmica nos locais onde ocorreu a sua formação. Inicialmente, nos primeiros 15 dias observou-se um intumescimento da casca em diversos pontos na superfície das megaestacas, sendo um indicativo dos locais de formação das brotações epicórmicas (Figuras2C-D e 2E).

Os resultados encontrados para o número médio de brotações epicórmicas induzidas por pontos nos quais ocorreu a formação destas brotações foram iguais aos encontrados para a avaliação do número de brotações. As megaestacas com diâmetros incluídos dentro do intervalo de 2,24 e 5,09 cm corresponderam àqueles com maior número de brotações epicórmicas induzidas por ponto de formação (Tabela4). Além disso, as megaestacas das árvores matrizes 6 e 15 foram as que apresentaram maior número de brotações epicórmicas e com formação destas e em maior número de classes de diâmetro (Tabela4).

Tabela 4– Número médio de brotações epicórmicas induzidas por ponto em que ocorreu a formação destas brotações, em diferentes diâmetros de megaestacas coletadas de 5 árvores matrizes de *E. cloeziana*, após 60 dias de permanência em casa de vegetação

| **Árvore** | **Classe de diâmetro das megaestacas (cm)** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Matriz** | **2,23** | **3,66** | **5,09** | **6,53** | **7,96** |
| **3** | 0,00 Ba | 4,67 Aa | 3,00 Aa | 0,00 Ba | 0,00 Ba |
| **5** | 0,00 Ba | 5,00 Aab | 3,67 Aab | 7,00 Aa | 0,00 Ba |
| **6** | 7,00 Aa | 4,50 Aa | 4,43 Aa | 4,00 Aa | 0,00 Ba |
| **13** | 0,00 Bb | 7,00 Aa | 0,00 Ab | 0,00 Bb | 0,00 Bb |
| **15** | 0,00 Ba | 3,50 Aa | 5,00 Aa | 9,00 Aa | 14,00 Aa |

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna, dentro de uma classe de diâmetro entre as árvores matrizes e letras minúsculas iguais na mesma linha, para uma mesma árvore matriz entre as classes de diâmetro, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Os resultados revelaram diferenças quanto à sobrevivência das brotações epicórmicas induzidas nas megaestacas das árvores matrizes de *E. cloeziana*(Figura 3).

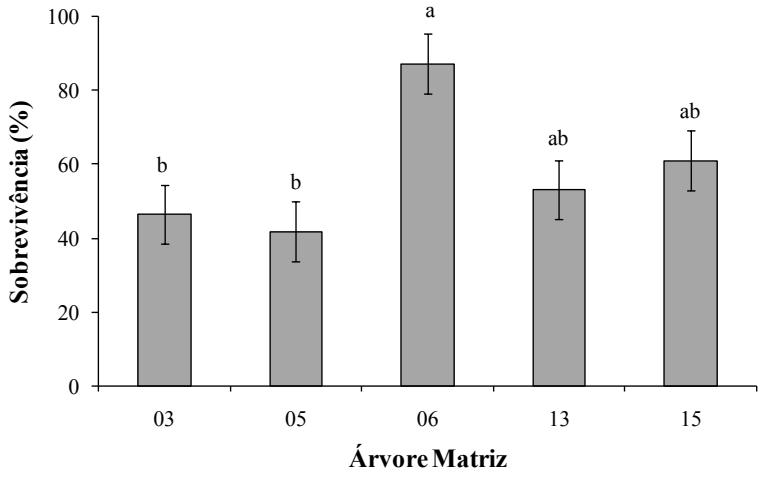


Figura 3 – Percentual de sobrevivência das brotações epicórmicas de megaestacas coletadas de cinco árvores matrizes de *E. cloeziana*,aos 60 dias de permanência em casa de vegetação. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Barras indicam o desvio padrão da média

A maior sobrevivência das brotações epicórmicas foi encontrada para as megaestacas da árvore matriz 06 (Figura2F), porém, não diferindo da observada para as árvores matrizes 13 e 15.

Os maiores percentuais de sobrevivência das brotações epicórmicas nas diferentes classes de diâmetro das megaestacas foram encontrados para aquelas brotações induzidas nas classes de 3,66 e 5,09 cm (Figura4). A sobrevivência das brotações epicórmicas induzidas nas megaestacas com o menor e o maior diâmetro foi inferior a 20% (Figura2G). Os resultados revelaram que o diâmetro das megaestacas compreendido entre 2,24 e 5,09 cm correspondeu àquele que proporcionou maior indução de brotações epicórmicas em megaestacas de árvores matrizes de *E. cloeziana*.

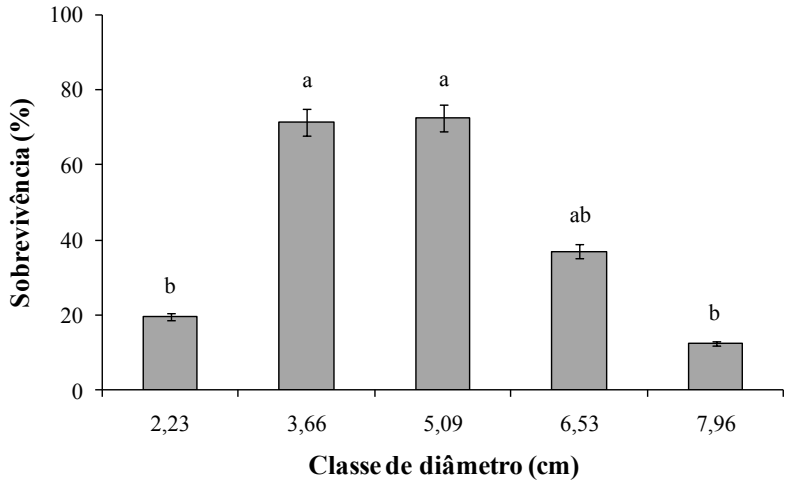


Figura 4 – Percentual de sobrevivência das gemas epicórmicas em diferentes classes de diâmetro de megaestacas de árvores matrizes de *E. cloeziana* aos 60 dias de permanência em casa de vegetação. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Barras indicam o desvio padrão da média

Os resultados revelaram que as brotações epicórmicas induzidas nas megaestacas da árvore matriz 15 apresentaram o maior comprimento médio destas em relação aos demais materiais genéticos, porém não diferindo das árvores matrizes 03, 05 e 06 (Figura5). Nota-se que apesar das diferenças com relação às árvores matrizes, as brotações não atingiram comprimento superior a 2,5 cm (Figura2H).

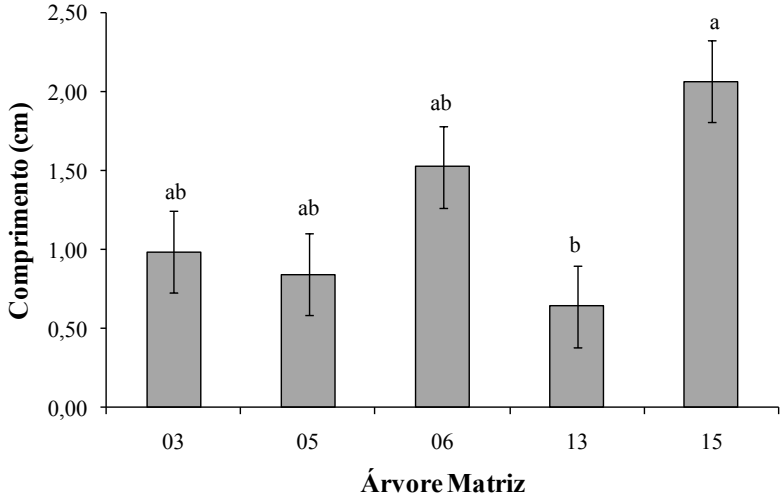


Figura 5 – Comprimento médio das brotações epicórmicas em induzidas em megaestacas coletadas de cinco diferentes árvores matrizes de *E. cloeziana* aos 60 dias de permanência em casa de vegetação. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Barras indicam o desvio padrão da média

### 3.4 Discussão

O presente trabalho demonstrou que a indução de brotações epicórmicas em megaestacas coletadas de matrizes adultas de *E. cloeziana*está associada aos materiais genéticos, à época do ano em que foram realizados o resgate destes propágulos, bem como o diâmetro das mesmas. Entretanto, estudos sobre a influência destes fatores neste processo são restritos às arvores vivas não sendo estendidos aos propágulos coletados das matrizes. Portanto, no presente trabalho foram realizadas avaliações sobre o efeito da época do ano em foram coletadas megaestacas de *E. cloeziana*.Consistente com os resultados aqui apresentados, o estudo de Almeida et al.(2007)revelou a viabilidade da indução de brotações epicórmicas em megaestacas de clones *E. cloeziana*. O trabalho atual complementa estes dados, priorizando no primeiro estudo uma abordagem a respeito do efeito de fatores abióticos (época do ano) e bióticos (genótipos e diâmetro das megaestacas) sobre a indução e desenvolvimento de brotações epicórmicas.

A diferença acentuada no número de brotações epicórmicas induzidas nas megaestacas coletadas nas duas diferentes épocas do ano demonstrou o efeito da sazonalidade sobre as plantas. Os melhores resultados obtidos na época 2 (estação chuvosa) pode ser explicado pela mobilização de substâncias de reservas para a parte aérea, por se tratar de uma estação de crescimento ativo das matrizes de *E. cloeziana*. Resultados semelhantes foram encontrados para *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *maidenii* (SOTELO; MONZA, 2007). Por outro lado, a época 1 correspondente ao outono compreende o período do ano em que há

redução do crescimento, havendo o acúmulo nas raízes de carboidratos como substâncias de reserva (SAKAI; SAKAI, 1998). Dessa forma, a disponibilidade de substâncias de reservas nas megaestacas coletadas na época 2, foi superior às da época 1, sendo determinante para garantir o maior desenvolvimento e vigor das brotações epicórmicas. O fato das megaestacas coletadas na época 1 somente ter iniciado a emissão das brotações epicórmicas após 20 dias de acondicionamento na casa de vegetação, enquanto que para a época 2 as primeiras brotações epicórmicas apareceram após 10 dias de coleta corrobora esta evidência. Além disso, esta diferença de substâncias de reserva possivelmente corresponde ao principal fator envolvido nas diferenças observadas quanto à indução de brotações epicórmicas nas 5 árvores matrizes de *E. cloeziana*.

As brotações epicórmicas em *Eucalyptus* surgem a partir de células meristemáticas na casca das árvores, próximos ao câmbio vascular (BURROWS, 2000, 2002; BURROWS et al., 2010; WATERS et al., 2010). A indução das brotações epicórmicas nas megaestacas ocorreu pela quebra do balanço hormonal presente nas matrizes que inibia a sua formação. Neste processo, as condições climáticas ambientais podem ter exercido um efeito marcante, sendo que na época 2, em vista das menores oscilações de temperatura e luminosidade, houve uma redução dos estresses que limitariam a indução e posterior desenvolvimento das brotações formadas.

De maneira semelhante, o diâmetro das megaestacas demonstrou influência direta na indução e o desenvolvimento das brotações epicórmicas, indicando uma restrita faixa de diâmetro das megaestacas para ser adotado no resgate de matrizes adultas de *E. cloeziana*. De maneira geral, a maior indução de brotações epicórmicas ocorreu no intervalo de diâmetro das megaestacas de 2 a 5 cm (Figura 2). O *E. cloeziana*por apresentar uma casca bastante espessa, pode ter interferido neste resultado, uma vez que a casca constituiu um impedimento físico para o desenvolvimento das brotações epicórmicas nas megaestacas de maiores diâmetros (BURROWS, 2002), mesmo que houvesse ocorrido um estímulo indutor (Figuras 1H e 1I). Além disso, pode ter havido abscisão dos centros meristemáticos que dariam origem às brotações epicórmicas durante a formação da casca (COLIN et al., 2010). No caso dos galhos com diâmetros inferiores a 2,0 cm, as substâncias de reserva não foram capazes de suprir a demanda nutricional das brotações induzidas, constatado pelo baixo vigor fisiológico e reduzido crescimento. Diante disso, ao realizar o resgate de megaestacas na época 2, optou-se pela coleta das mesmas com diâmetros superiores a 2,0 cm.

A sobrevivência das brotações epicórmicas indica uma correlação do estado fisiológico da própria megaestaca coletada da árvore matriz e a sua capacidade de promover o

desenvolvimento das brotações. Por sua vez, a indução de brotações epicórmicas nas megaestacas não implica que estas se desenvolverão e poderão ser utilizadas como propágulos na clonagem dos materiais genéticos. O maior crescimento das brotações representado pelo seu maior comprimento indica que estas apresentam maior probabilidade de sucesso na clonagem ao utilizá-las como propágulos. As brotações epicórmicas com maiores comprimento apresentam maior facilidade de manipulação e foram fisiologicamente mais resistentes aos fatores que afetam os processos de propagação clonal *in vitro* ou *ex vitro*. Provavelmente, um dos principais fatores que contribuiu para as diferenças no comprimento das brotações corresponde às substâncias de reserva das megaestacas que foi responsável pelo suprimento da sua demanda metabólica, garantindo sua sobrevivência e consequentemente o seu crescimento.

O estudo demonstrou a indução de múltiplas brotações epicórmicas a partir de um mesmo ponto na megaestaca, revelando a alta capacidade organogênica do *E. cloeziana* quanto à formação destas brotações. Uma investigação mais aprofundada sobre o processo de formação destas brotações, do ponto de vista morfogênico contribuiria para sua melhor compreensão.

A época do ano e o diâmetro das megaestacas influenciaram a indução de brotações epicórmicas em casa de vegetação de matrizes adultas de *E. cloeziana*. Sob o ponto de vista prático, esses resultados do estudo podem ajudar a estabelecer as melhores épocas do ano e dimensões das megaestacas para o resgate de matrizes adultas de *E. cloeziana*, abrindo novas perspectivas para a clonagem de genótipos adultos de outras espécies de *Eucalyptus* de interesse comercial. Além disso, comprovou-se a viabilidade desta técnica para o resgate de propágulos vegetativos de árvores que necessitam da manutenção da sua integridade.

As brotações epicórmicas induzidas nas megaestacas servem como propágulos para a clonagem das matrizes adultas de *E. cloeziana*. Nesse sentido, foi realizada a estaquia das brotações epicórmicas, porém, estas não enraizaram em nenhuma das duas épocas de coleta das megaestacas. Por outro lado, conforme descrito no próximo capítulo, a utilização das brotações epicórmicas como explantes representam uma alternativa para a micropropagação destes genótipos adultos de *E. cloeziana*.

### 3.5 Conclusões

A indução de brotações epicórmicas foi maior para as megaestacas coletadas na época do ano com maior incidência de chuvas e com temperatura mais elevada. As megaestacas das matrizes adultas de *E. cloeziana*, com diâmetro médio compreendido entre 2

e 5 cm, correspondeu ao mais adequado para a obtenção de maior número de brotações epicórmicas.

**Referências**

ALMEIDA, F.D.; XAVIER, A.; DIAS, J.M. Propagação vegetativa de árvores selecionadas de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell por estaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 445-453, 2007.

BÉGIN, C.; FILION, L. Black spruce (*Piceamariana*) architecture. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 77, n. 5, p.664–672, 1999.

BURROWS, G.E. An anatomical study of epicormic bud strand structure in *Eucalyptus cladocalyx* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 48, n. 2, p. 233–245, 2000.

_____. Epicormic strand structure in *Angophora*, *Eucalyptus* and *Lophostemon* (Myrtaceae): implications for fire resistance and recovery. **New Phytologist**, Cambridge, v. 153, n. 1, p. 111–131, 2002.

_____. Syncarpia and Tristaniopsis (Myrtaceae) possess specialised fire-resistant epicormic structures. **Australian Journal Botany**, Melbourne, v. 56, n. 3, p. 254–264, 2008.

BURROWS, G.E.; HORNBY, S.K.; WATERS, D.A.; BELLAIRS, S.M.; PRIOR, L.D.; BOWMAN, M.J.S. A wide diversity of epicormic structures is present in Myrtaceae species in the northern Australian savanna biome-implications for adaptation to fire. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 58, n. 6, p. 493-507, 2010.

COLIN, F.; ROBERT, N.; DRUELLE, J.L.; FONTAINE, F. Initial spacing has little influence on transient epicormic shoots in a 20-year-old sessile oak plantation. **Annals Forest Science**, Paris, v. 65, n. 5, p.508, 2008.

COLIN, F.; MOTHE, F.; FREYBURGER, C.; MORISSET, J.B.; LEBAN, J.M.; FONTAINE, F. Tracking rameal traces in sessile oak trunks with X-ray computer tomography: biological bases, preliminary results and perspectives. **Trees Structure Functional**, Berlin, v.24, n. 5, p. 953–967, 2010.

COOPER-ELLIS, S.; FOSTER, D.R.; CARLTON, G.; LEZBERG, A. Forest response to catastrophic wind: results from an experimental hurricane. **Ecology**, New York, v. 80, n. 8, p. 2683–2696, 1999.

CRISP, M.D., BURROWS, G.E.; COOK, L.G.; THORNHILL, T.H.; BOWMAN, D.M.J.S. Flammable biomes dominated by eucalypts originated at the Cretaceous-Palaeogene boundary. **Nature Communication 2**, London, n. 193, p. 1-8, 2011. Disponível em: <http: //www. nature.com/ncomms/journal/v2/n2/full/ncomms 1191.html>. Acesso em: 11 out. 2013.

DEAL, R.L.; BARBOUR, R.J.; MCCLELLAN, M.H.; PARRY, D.L. Development of epicormic sprouts in *Sitka spruce* following thinning and pruning in south-east Alaska. **Forestry**, Oxford, v. 76, n. 4, p. 401–412, 2003.

DELLA-BIANCA, L. Notes: screening some stand variables for post-thinning effect on epicormic sprouting in even-aged yellow-poplar. **Forest Science**, Paris, v. 18, n. 2, p.155–158, 1972.

GORDON, D.; ROSATI, A.; DAMIANO, C.; DEJONG, T.M. Seasonal effects of light exposure, temperature, trunk growth and plant carbohydrate status on the initiation and growth of epicormic shoots in *Prunuspersica*. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 81, n. 3, p. 421–428, 2006.

LANNER, R.M.; BRYAN, J.A. Association of *Rhabdocline* needle blight and epicormic branching in Douglas-fir.**Great Basin Naturalist**, Provo, v. 41, n. 4, p. 476–477, 1981.

MILLER, G.W.; STRINGER, J.W. Effect of crown release on tree grade and DBH growth of white oak sawtimber in eastern Kentucky. In: CENTRAL HARDWOOD FOREST CONFERENCE, 14., 2004, Wooster.**Proceedings…** Wooster: USDA, 2004. p. 37–44.

MUJURI, E.; DEMCHIK, M.C. Viability of northern pin and white oak reserve trees in Wisconsin scrub oak sites. **Northern Journal Applied Forestry**, Bethesda, v. 26, n. 3, p. 111–117, 2009.

NICOLINI, E.; CHANSON, B.; BONNE, F. Stem growth and epicormic branch formation in understorey beech trees (*Fagussylvatica* L.). **Annals of Botany**, Oxford, v. 87, n. 6, p. 737–750, 2001.

PIENE, H.; EVELEIGH, E.S. Spruce budworm defoliation in young balsam fir: the ‘green’ tree phenomenon. **TheCanadian Entomology**, Toronto, v. 128, n. 6, p. 1101–1107, 1996.

SAKAI, A.; SAKAI, T. A test for the resource remobilization hypothesis: tree sprouting using carbohydrates from above-ground parts. **Annals of Botany**, London, v. 82, n. 2, p. 213-216, 1998.

SOTELO, M.; MONZA, J. Micropropagation of *Eucalyptus maidenii* elite trees. **Agrocência**, Montevidéu, v. 11, n. 1, p. 81-89, 2007.

WATERS, D.A.; BURROWS, G.E.; HARPER, J.D.I. *Eucalyptus regnans (*Myrtaceae): a fire-sensitive eucalypt with a resprouterepicormic structure. **American Journal of Botany**, New York, v. 97, n. 4, p. 545-556, 2010.

# 4 MICROPROPAGAÇÃO DE MATRIZES ADULTAS DE *Eucalyptus cloeziana*


## Resumo

O *Eucalyptuscloezianaé* plantado no Brasil apesar haver limitações para a expansão das áreas plantadas devido a dificuldades encontradas quanto à sua propagação clonal. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia para a clonagem de matrizes adultas de *E. cloeziana*por meio da técnica de micropropagação. Brotações epicórmicas induzidas em megaestacas foram utilizadas como explantes para o estabelecimento *in vitro* das matrizes. A multiplicação *in vitro* das brotações foi realizada no meio de cultura WPM acrescido dos reguladores de crescimento BAP e ANA, sendo que a concentração mais adequada destes para promover o maior índice de proliferação das brotações foi genótipo-dependente. Os melhores resultados para a multiplicação *in vitro* foram obtidos com concentrações de BAP superiores a 0,60 mg $L^{-1}$combinado com 0,10 mg $L^{-1}$ de ANA para os genótipos 03 e 13, ao passo que para as brotações da árvore matriz 05 o melhor resultado ocorreu em meio isento do regulador de crescimento (ANA). O tratamento de "pulse" com $GA_3$ demonstrou ser inviável para o alongamento *in vitro* das brotações, o qual foi obtido em meio de cultura WPM suplementado com 0,1 mg $L^{-1}$ de BAP. O enraizamento *ex vitro* e a aclimatização dasmicroestacasforam realizadas com sucesso nos miniestufas, garantindo a obtenção de mudas clonais e subsequente composição de um microjardim clonal das matrizes adultas de *E. cloeziana*.


Palavras-chave: Propagação *in vitro*; Reguladores de crescimento; Juvenilidade


## Abstract

The *Eucalyptus cloeziana* is planted in Brazil, although there are limitations to the expansion of planted areas due to difficulties regarding its clonal propagation. The aim of this study was to develop a methodology for cloning *E. cloeziana* mature matrices. Epicormic shoots induced in branches were used asexplants for *in vitro* establishment of matrices. The *in vitro* multiplication of shoots was performed in WPM medium culture and the BA and NAA concentration better suited to promoting the highest proliferation of shoots showed to be dependent on the genotype. The best *in vitro* multiplication results were obtained with BA concentrations greater than 0.60 mg $L^{-1}$plus the NAA concentration of 0.10mg $L^{-1}$ for genotypes 03 and 13, whereas for the 05 matrix the best results occurred in medium free from NAA. $GA_3$ pulse treatment proved impractical for the *in vitro* elongation of shoots, which was obtained on WPM supplemented with 0.1 mg$L^{-1}$ BA. The acclimatization and *ex vitro* rooting of microcuttings was successful in mini-incubators, ensuring the clonal seedlings and subsequent composition of clonal microgarden of *E. cloeziana* adult matrices.


Keywords:*In vitro* propagation; Growth regulators; Juvenility

## 4.1 Introdução

A propagação de genótipos selecionados de *Eucalyptus*,em larga escala, refletiu diretamente em uniformidade e aumentos de produtividade dos plantios florestais demonstrando a importância da clonagem (XAVIER et al., 2013). A clonagem de genótipos

adultos de *Eucalyptus* confere maior confiabilidade na seleção clonal, uma vez que não é possível determinar se as árvores em idades juvenis apresentarão as características de interesse quando na idade adulta (BECK et al., 1998).

Dentre as espécies de *Eucalyptus*plantadas no Brasil, o *E. cloeziana* tem papel destacado no setor florestal em razão das características tecnológicas da sua madeira, de grande durabilidade, de excelente qualidade para serrarias, para a produção de carvão e uso na construção civil (ALMEIDA et al., 2007). Os plantios florestais de *E. cloeziana* e destinam principalmente para a produção de madeira para construção civil, energia e carvão vegetal. Em vista das limitações da produção de mudas seminais, bem como a propagação clonal por meio da estaquia de *E. cloeziana* (ALFENAS et al., 2009), o rejuvenescimento via micropropagação é uma alternativa para contornar este problema de genótipos adultos de *Eucalyptus*, possibilitando a sua propagação (DUTRA et al., 2009; BORGES et al., 2011; BRONDANI et al., 2011).

O resgate de árvores adultas se dá pelo uso de técnicas que visem a obtenção de brotações com maior grau de juvenilidade, dado a sua maior facilidade de propagação. Na impossibilidade de adotar técnicas de resgate que envolva a decepa da árvore ou anelamento do tronco, o resgate por meio de megaestacas é recomendado. As brotações epicórmicas induzidas em megaestacas foram utilizadas como explantes para a micropropagação de *E. grandis* (IKEMORI et al., 1987), *Quercus robur* (VIEITEZ et al., 1994), *E. globulus* (TRINDADE; PAIS, 1997; SOTELO; MONZA, 2007), *Arbutus unedo* (GOMES; CANHOTO, 2009).

A micropropagação de *Eucalyptus*tem sido realizada por meio de diferentes técnicas, como a embriogênese somática (PINTO et al., 2002, 2008; MAMAGHANI et al., 2009; PRAKASH; GURUMURTHI, 2010), organogênese (AZMI et al., 1997; BANDYOPADHYAY et al., 1999; GLOCKE et al., 2006; AGGARWAL et al., 2010) e proliferação de gemas axilares (JAIN; HÄGGMAN, 2007). Dentre essas técnicas a proliferação tem sido indicada para o rejuvenescimento *in vitro* de *Eucalyptus* (BRONDANI et al., 2012), no entanto, não há protocolos estabelecidos para a micropropagaçãode *E. cloeziana*. A micropropagação via proliferação de gemas axilares é dividida em diferentes etapas (DUTRA et al., 2009). Nestas, a utilização de diferentes reguladores de crescimento e em distintas concentrações garante um balanço hormonal endógeno que direciona as rotas morfogênicas nas brotações micropropagadas (DAVEY; ANTHONY, 2010). Os reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido α-naftalenoacético (ANA) são os principais reguladores utilizados na micropropagação de *Eucalyptus*(HUNG; TRUEMAN,

2011). Entretanto, a especificidade de respostas obtidas na micropropagação de *Eucalyptus* revela que há a necessidade de protocolos específicos de micropropagação para os materiais genéticos (AGGARWAL et al., 2012).

O enraizamento das brotações obtidas no cultivo *in vitro* corresponde ao fator chave para o sucesso de um protocolo de micropropagação de *Eucalyptus*(ASSIS et al., 2004; MANKESSI et al., 2009). O enraizamento *ex vitro* das brotações de *Eucalyptus*é desejável uma vez que há a formação de um sistema radicular melhor estruturado e fisiologicamente ativo. Por outro lado, um dos principais gargalos na micropropagação de *Eucalyptus*consiste na alta mortalidade das brotações que ocorre durante a aclimatização (AGGARWAL et al., 2012). Portanto, o enraizamento *ex vitro* simultâneo a aclimatização das brotações representa uma vantagem não apenas do ponto de vista econômico, pela eliminação de uma etapa da micropropagação (YAN et al., 2010), mas também pela possibilidade de obter microestacas de melhor qualidade no que se refere ao sistema radicular.

Neste contexto, em vista da importância econômica do *E. cloeziana,* o objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo e eficiente protocolo de micropropagação de matrizes adultas de *E. cloeziana*, sendo para tanto avaliado: (1) o estabelecimento *in vitro* de brotações epicórmicas de megaestacas coletadas em duas diferentes épocas do ano; (2) as melhores concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido α-naftaleno acético(ANA) para a multiplicação *in vitro* das brotações; (3) o alongamento *in vitro* das brotações com tratamentos de ”pulse” de $GA_3$ esob diferentes concentrações de BAP e ANA; (4) o enraizamento *ex vitro* das microestacas em diferentes substratos e a aclimatização das mesmas em miniestufas para a obtenção de mudas clonais para constituir um microjardim clonal.

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Estabelecimento *in vitro*

O material utilizado como explantes foram brotações epicórmicas provenientes das megaestacas das árvores matrizes 03, 05, 06, 13 e 15 de *E. cloeziana*. Realizou-se a aplicação de solução fungicida de N-(trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide (2,4 g $L^{-1}$), uma semana antes da realização da coleta. Brotações epicórmicas, medindo cerca de 3 cm, foram coletadas e utilizadas para a confecção de dois tipos de explantes: segmentos apicais para os quais fez-se a redução das folhas pela metade e quando possível, segmentos nodais dos quais retirou-se as folhas. Após a coleta, os explantes foram imersos em água deionizada

e transportados ao laboratório de Fisiologia das Árvores do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP.

Inicialmente, os explantes foram lavados em água corrente durante vinte minutos com duas gotas de Twenn 20 e logo após procedeu-se uma lavagem em água deionizadaautoclavada. Em seguida, os explantes foram imersos em solução fungicida de N-(trichloromethylthio)cyclohex-4-ene-1,2-dicarboximide (2,4 g $L^{-1}$), por 15 minutos, ao final dos quais realizou-se três lavagens em água deionizada autoclavada. Posteriormente, os explantes foram imersos em solução de álcool (70%) durante 20 segundos, sendo depois, colocados em NaOCl 1% (v/v) por 5 minutos, adicionados por três gotas de Tween 20. Ao término desse tratamento, os explantes foram lavados em água deionizada autoclavada por quatro vezes e então inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescidos de BAP (0,5 mg $L^{-1}$), sacarose (30,0 mg.$L^{-1}$) e ágar (4,0 mg.$L^{-1}$). Os mesmos foram mantidos em câmara de crescimento a 26±2°C e fotoperíodo de 12 horas e radiância de 50 ± 2 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$, por 30 dias.

As avaliações foram realizadas quanto à contaminação fúngica determinada pela avaliação visual da presença de fungos no meio de cultura e/ou no explante. A oxidação e contaminação bacteriana foram avaliadas partir da visualização de tecidos oxidados e presença de culturas bacterianas no meio de cultura, respectivamente. Considerou-se contaminação as colônias bacterianas que surgiram no início do estabelecimento *in vitro* dos explantes, principalmente na superfície do meio de cultura. Realizou-se também a contagem do número de explantes estabelecidos *in vitro*.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 4 repetições compostas por 10 explantes em cada uma das repetições, sendo os tratamentos constituídos de 5 matrizes de *E. cloeziana*. Os dados foram analisados por meio das médias e desvio padrão da média.

### 4.2.2 Multiplicação *in vitro*

As microcepas, com cinco brotações maiores que 5 mm, das árvores matrizes 03, 05 e 13 obtidos na fase de multiplicação do material da primeira coleta, foram inoculadas em frascos de vidro transparente (Ø = 5,0 cm e 8,0 cm de altura) contendo 40 mL do meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado com 0,25; 0,50; 0,75 ou 1,0 mg $L^{-1}$ de BAP e 0,000; 0,017; 0,034 ou 0,050 mg $L^{-1}$ de ANA. Adicionou-se ainda ao meio de cultura 30g $L^{-1}$ de sacarose e 4 g $L^{-1}$ de ágar.

Decorridos 30 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados o número de brotações, produzidas por cada microcepa das árvores matrizes, a massa seca dessas microcepas e analisada a taxa de crescimento relativo de cada tratamento.

A massa seca inicial das microcepas foi inferida a partir de 5 exemplares selecionados aleatoriamente entre as repetições de cada tratamento. Ao final do experimento determinou-se a massa seca de todos os explantes. As amostras foram colocados separadamente em pacotes de papel Kraft e submetidos a estufa a 60 °C por no mínimo 72 horas até a obtenção de peso constante;

A avaliação das taxas de crescimento relativo foi definida com as médias do peso da massa seca, segundo a equação estabelecida por Hunt (1982):

$$R(\%) = \frac{\ln P2 - \ln P2}{T2 - T1} x100$$

onde:

R(%) = taxa de crescimento relativo (%)

P1 = peso da massa seca inicial

P2 = peso da massa seca final

T1 = tempo inicial

T2 = tempo final

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (3x4x4) testando-se três árvores matrizes (03, 05 e 13) de *E. cloeziana* e quatro concentrações de BAP combinadas com quatro concentrações de ANA, utilizando 4 repetições com 4 explantes por repetição.

Os dados foram analisados pelos testes de Hartley ($P<0,05$) e de Lilliefors ($P<0,05$). Em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA) ($P<0,05$). De acordo com a significância da ANOVA, os dados foram submetidos a análise de regressão polinomial ($P<0,05$) com representação em superfície de resposta. O software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa – OK, USA) foi utilizado na análise de variância e os parâmetros dos modelos de regressão estimados pelo software TABLE CURVE 3D (Systat Software Inc., versão 3, Richmond – CA, USA).

### 4.2.3 Alongamento *in vitro*

***Efeito do "pulse" com $GA_3$***

Microcepas, padronizadas com cinco brotações maiores que 5 mm, das árvores matrizes 03, 05 e 13, oriundas do 24º subcultivo mensal da fase de multiplicação *in vitro* foram inoculadas em frascos de vidro transparente (Ø = 5,0 cm e 8,0 cm de altura) contendo 40 mL do meio de cultura. O meio de cultura foi composto pela metade da concentração dos sais WPM, suplementado com 0,50 ou 1,00 mg $L^{-1}$ de ácido giberélico ($GA_3$). Ambos os tratamentos foram suplementados com 0,1 mg $L^{-1}$ de BAP, 20 g $L^{-1}$ de sacarose e 4 g $L^{-1}$ de ágar.

Para cada tratamento, 0,50 e 1,00 mg $L^{-1}$ de $GA_3$ foram preparados 20 frascos/árvore matriz, contendo 4 microcepas/frasco. A cada seis dias, a partir do início do experimento, retiraram-se como amostragem dois recipientes, considerando quatro amostras independentes por frasco. No total foram realizadas quatro amostragens.

O número e o comprimento de brotações alongadas foram determinados em cada amostragem. As microcepas amostradas foram transferidas para novo meio de cultura, composto de metade da concentração dos sais WPM, acrescido de 0,10 mg $L^{-1}$ de BAP, 20 g $L^{-1}$ de sacarose e 4 g $L^{-1}$ de ágar. As microcepas foram cultivadas *in vitro* nesse meio de cultura até completar o 30º dia do início do experimento. Ao final do experimento foi avaliada a sobrevivências das microcepas com diferentes períodos de permanência nos dois tratamentos.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas. Os dados dos tratamentos foram analisados pelos testes de Hartley ($P<0,05$) e de Lilliefors ($P<0,05$). Em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA) ($P<0,05$). De acordo com a significância da ANOVA, os dados foram submetidos a análise de regressão polinomial ($P<0,05$),

Os dados foram analisados com o auxílio do software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa – OK, USA) e os parâmetros dos modelos de regressão estimados pelo programa CurveExpert versão 1.4 (HYAMS, 2012).

***Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA***

Microcepas padronizadas com cinco brotações maiores que 5 mm, das árvores matrizes 03, 05 e 13 que foram subcultivadas no meio de cultura de multiplicação por 19 meses, inoculadas em frascos de vidro transparente (Ø = 5,0 cm e 8,0 cm de altura) contendo 40 mL do meio de cultura WPM suplementado com 30 g $L^{-1}$ de sacarose, 4 g $L^{-1}$ de ágar, 0,20 ou 0,10 mg $L^{-1}$ de BAP e 0,00; 0,017; 0,034 ou 0,050 mg $L^{-1}$ de ANA.

O número de brotações alongadas por microcepa foi avaliado após 60 dias de cultivo *in vitro*.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (3x2x4) testando-se três árvores matrizes (03, 05 e 13) de *E. cloeziana* e duas concentrações de BAP combinadas com quatro concentrações de ANA, utilizando 5 repetições com 4 explantes por repetição.

Os dados foram analisados pelos testes de Hartley ($P<0,05$) e de Lilliefors ($P<0,05$). Em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA) ($P<0,05$). De acordo com a significância da ANOVA, os dados foram submetidos a análise de regressão polinomial ($P<0,05$). O software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa – OK, USA) foi utilizado na análise de variância e os parâmetros dos modelos de regressão estimados pelo programa CurveExpert versão 1.4 (HYAMS, 2012).

### 4.2.4 Aclimatização e enraizamento*ex vitro*

O enraizamento *ex vitro* foi realizado com a transferência das brotações alongadas para uma bandeja de células (12 $cm^3$/célula), disposta em um recipiente retangular de plástico (47 x 17 x 3 cm). Nenhum tratamento com regulador de crescimento foi utilizado para a indução do enraizamento adventício. Após 30 dias, as microplantas (microestacas que enraizaram) foram transferidas para tubetes plásticos (55 $cm^3$). As bandejas e os tubetes foram cobertos com sacos de polietileno transparentes, formando miniestufas. Diariamente, a água foi reposta para evitar ressecamento do substrato. Nesta etapa, as microplantas foram aclimatizadas em casa de sombra com sombrite 50%. Decorridos 30 dias, as microplantas foram transferidas para área de pleno sol, até completarem o seu desenvolvimento. Em todas as etapas de formação da muda, o substrato utilizado foi composto de vermiculita granulometria média e de casca de *Pinus* decomposta (2:1, *v/v*).

As mudas formadas a partir das microestacas, com 15 cm de comprimento e cerca de 120 dias de idade, foram utilizadas para a constituição de um microjardim clonal de *E. cloeziana*.

O enraizamento das microestacas foi avaliado na saída das miniestufas (30 dias). O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado sendo os tratamentos constituídos por três árvores matrizes (03, 05 e 13) de *E. cloeziana*, com cinco repetições contendo 10 microestacas por repetição. Os dados foram analisados por meio das médias e desvio padrão da média.

### 4.2.5 Preparo do meio de cultura e condições experimentais

Os meios de cultura foram preparados utilizando água deionizada e o pH, ajustado para 5,8 ± 0,05 com NaOH (0,1 mol $L^{-1}$) e HCl (0,1 mol $L^{-1}$), antes da autoclavagem e da adição do ágar. O meio de cultura foi autoclavado na temperatura de 121 ºC e pressão de aproximadamente 1 kgf $cm^{-2}$, durante 15 min.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de cultura a 25 ± 2 ºC, com fotoperíodo de 12 h de luz e irradiância de 80 µmol $m^{-2}$ $s^{-1}$.

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Estabelecimento *in vitro*

O protocolo de desinfestação utilizado mostrou-se adequado para a introdução *in vitro* das brotações epicórmicas das árvores matrizes de *E. cloeziana* (Figuras 1A-C).

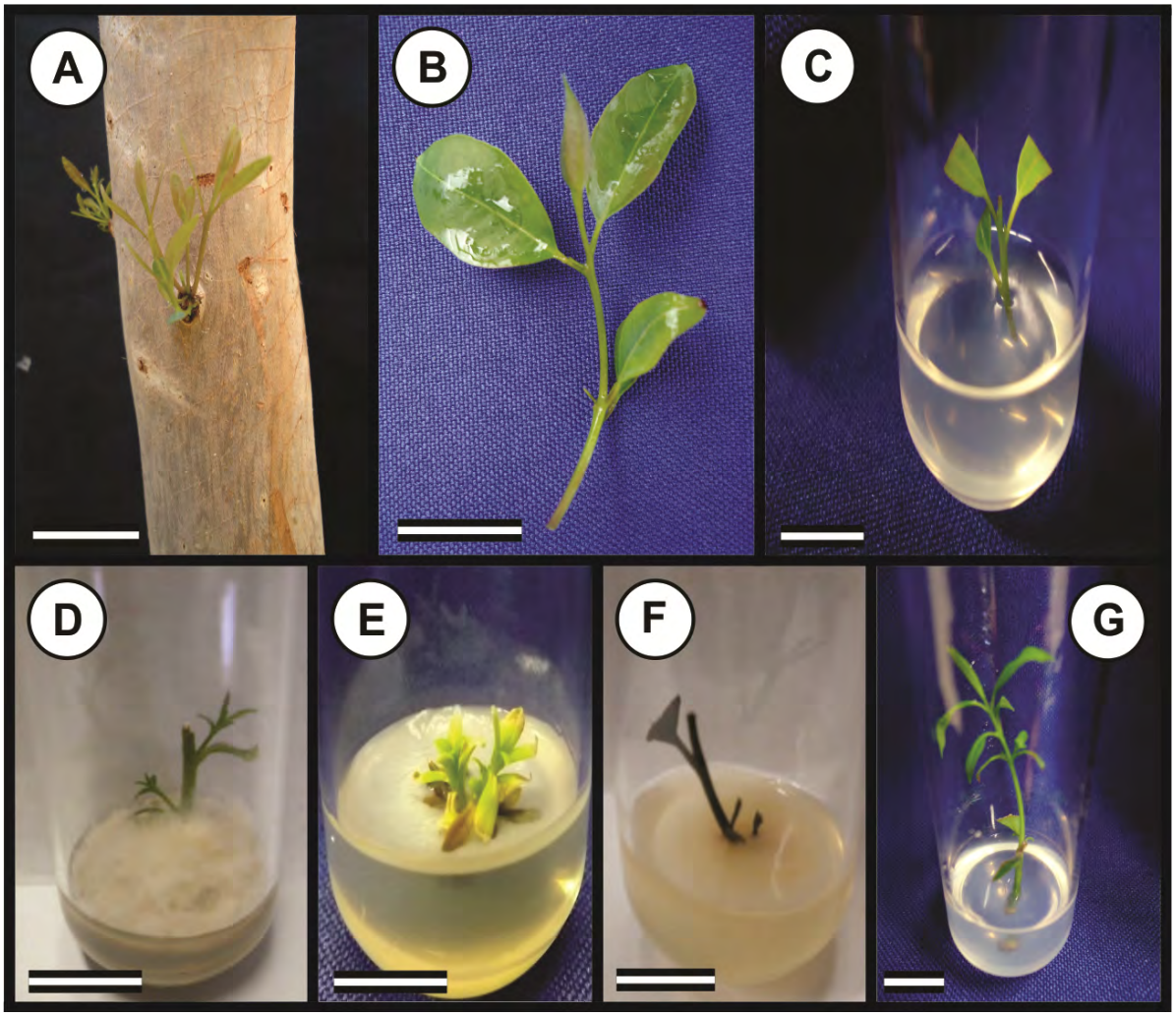


Figura 1 - Estabelecimento *in vitro* de brotações epicórmicas provenientes de megaestacas de *E. cloeziana* coletadas na época 2. A: Gemas epicórmicas induzidas na megaestaca da árvore matriz 3 de *E. cloeziana*; B: Explante padrão utilizado para a introdução *in vitro*; C: Brotação epicórmica, utilizada como explante, recém introduzida *in vitro*; D: Contaminação fúngica do explante; E: Contaminação bacteriana do explante; F: Oxidação do explante; G: Gema axilar de *E. cloeziana* 30 dias após a introdução *in vitro*. Barras = 1,0 cm

Por outro lado, contaminação fúngica e bacteriana não representaram uma barreira ao estabelecimento *in vitro* dos explantes de *E. cloeziana*. Os percentuais de contaminação fúngica variaram de 20 a 60% nas introduções realizadas nas duas épocas de coleta das megaestacas (Figura 1D). Fato que pode ser considerado esperado por se tratar de explantes provenientes de material do campo. Os explantes provenientes das megaestacas coletadas na época 2 apresentaram maiores percentuais de contaminação bacteriana (26,4 a 35,8%) que daquelas coletadas na época 1 (5,8 a 20%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Percentual de explantes estabelecidos *in vitro*, contaminação fúngica e bacteriana endofítica e oxidação dos explantes 25 dias após a introdução *in vitro* de brotações epicórmicas de cinco árvores matrizes de *Eucalyptus cloeziana* oriundas de megaestacas coletadas em duas épocas do ano

| Variáveis | Época do ano | Árvores matrizes | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 3 | 5 | 6 | 13 | 15 |
| % explantes estabelecidos | 1 | 24,0 ± (5,3) | 20,0 ± (3,1) | 23,8 ± (3,9) | 25,0 ± (3,6) | 16,7 ± (1,7) |
| | 2 | 47,4 ± (1,7) | 45,3 ± (5,9) | 51,2 ± (4,7) | 43,3 ± (3,6) | 26,4 ± (3,3) |
| % contaminação fúngica | 1 | 36,8 ± (3,5) | 60,0 ± (5,4) | 38,1 ± (5,2) | 35,0 ± (4,4) | 33,3 ± (4,3) |
| | 2 | 20,0 ± (0,9) | 41,5 ± (4,7) | 34,9 ± (6,5) | 27,8 ± (6,1) | 26,4 ± (3,5) |
| % contaminação bacteriana | 1 | 5,8 ± (0,3) | 20,0 ± (2,7) | 14,3 ± (1,9) | 15,0 ± (8,1) | 14,6 ± (5,4) |
| | 2 | 32,0 ± (2,8) | 35,8 ± (5,6) | 26,4 ± (7,5) | 32,2 ± (4,8) | 33,3 ± (4,1) |
| % oxidação dos explantes | 1 | 24,0 ± (1,1) | 20,0 ± (1,3) | 23,8 ± (4,3) | 25,0 ± (2,4) | 32,6 ± (1,5) |
| | 2 | 10,0 ± (0,8) | 1,9 ± (0,5) | 8,5 ± (2,5) | 8,9 ± (2,7) | 16,7 ± (2,9) |

* valores entre parênteses representam o desvio padrão da média

Os explantes das cinco matrizes de *E. cloeziana* estabelecidos *in vitro* a partir das brotações epicórmicas das megaestacas coletadas na época 1 apresentaram maiores percentuais de oxidação fenólica (Tabela 1). Neste caso, a oxidação foi caracterizada pela liberação de compostos fenólicos no meio de cultura, tornando-o enegrecido bem como ocasionando a morte do explante (Figura 1F).

Os genótipos não apresentaram diferenças acentuadas entre si quanto ao estabelecimento *in* vitro, exceção feita apenas à árvore matriz 15, para a qual a oxidação dos explantes representou um entrave. De maneira geral, o protocolo utilizado no estabelecimento *in vitro* das árvores matrizes de *E. cloeziana* foi eficiente para o desenvolvimento das brotações axilares nos explantes (Figura 1G), para as próximas etapas da micropropagação.

### 4.3.2 Multiplicação *in vitro*

Os materiais genéticos das três árvores matrizes (03, 05 e 13) de *E. cloeziana* apresentaram respostas diferenciadas quanto à multiplicação *in vitro*, não permitindo a

definição de uma combinaçãoótima de BAP/ANA para todos os materiais genéticos. A variação do número de brotações e do incremento de massa seca das microcepas em função das diferentes concentrações de BAP e ANA foi descrita adequadamente por modelos polinomiais (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Coeficientes de determinação ($R^2$) e parâmetros da função [NB = B1 + B2*BAP + B3*$BAP^2$ + B4*ANA + B5*$ANA^2$ + B6*$ANA^3$ onde NB é o número de brotações, B1, B2, B3, B4, B5 e B6 são parâmetros do modelo, BAP é a concentração do regulador de crescimento 6-benzilaminopurina em mg $L^{-1}$ e ANA é a concentração do regulador de crescimento ácido 1-naftaleno acético em mg $L^{-1}$] ajustada ao número de gemas das três árvores matrizes de *E. cloeziana* (03, 05 e 13) na fase de multiplicação *in vitro*

| | Parâmetros | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Árvore Matriz | B1 | B2 | B3 | B4 | B5 | B6 | $R^2$ | *p* |
| 03 | 3,0078 | 39,1094 | - 26,563 | 157,482 | - 1349,1 | 11488,8 | 0,92 | ** |
| 05 | 9,8047 | 26,4844 | - 21,562 | - 164,9 | 2262,98 | -23674,0 | 0,88 | ** |
| 13 | 6,7969 | 12,2031 | -5,9375 | 384,929 | - 7032,6 | 83556,1 | 0,83 | ** |

$R^2$ = coeficiente de determinação; *p* = p valor; ** = significativo a 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste F

Tabela 3 – Coeficientes de determinação ($R^2$) e parâmetros da função [M = B1 + B2*BAP + B3 *$BAP^2$ + B4*$BAP^3$ + B5*log (ANA) onde M é a massa das microcepas, B1, B2, B3, B4 e B5 são parâmetros do modelo, BAP é a concentração do regulador de crescimento 6-benzilaminopurina em mg $L^{-1}$ e ANA é a concentração do regulador de crescimento ácido 1-naftaleno acético em mg $L^{-1}$] ajustada à massa seca das brotações das três árvores matrizes de *E. cloeziana* (03, 05 e 13) na fase de multiplicação *in vitro*

| | Parâmetros | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Árvore Matriz | B1 | B2 | B3 | B4 | B5 | $R^2$ | *p* |
| 03 | 0,0268 | 0,0122 | - 0,0012 | - 0,0071 | 0,0016 | 0,84 | ** |
| 05 | 0,0008 | 0,2907 | - 0,5080 | 0,2463 | - 0,0040 | 0,77 | ** |
| 13 | 0,0253 | - 0,0162 | 0,0549 | - 0,0367 | 0,0011 | 0,90 | ** |

$R^2$ = coeficiente de determinação; *p* = p valor; ** = significativo a 1% de probabilidade, respectivamente pelo teste F

Os diferentes genótipos apresentaram variações quanto ao número de brotações e de massa seca das microcepas em relação às concentrações de BAP e ANA (Figuras 2 e 3).

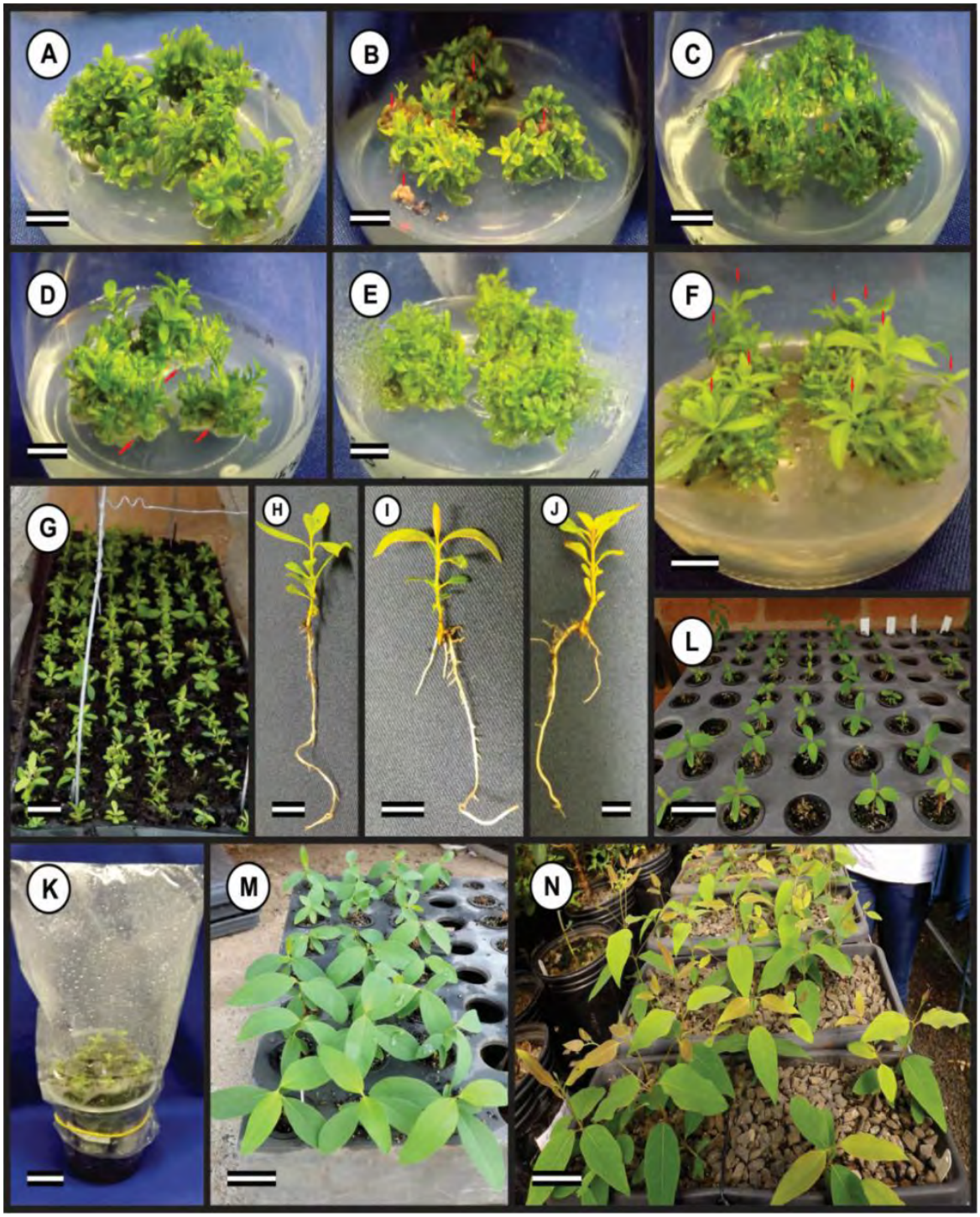


Figura 2 – Detalhes da multiplicação (A, B, C, D e E), alongamento (F), aclimatização e enraizamento *ex vitro* (G-N) das brotações de três árvores matrizes de *E. cloeziana.* A: Microcepas da árvore matriz 03 na fase de multiplicação *in vitro.* Barra = 1,0 cm; B: Presença de calos (setas vermelhas) nas microcepas da árvore matriz 03 na fase de multiplicação *in vitro*. Barra = 1,0 cm; C: Microcepa da árvore matriz 05 na fase de multiplicação *in vitro*. Barra = 1,0 cm; D: Manifestação bacteriana endofítica na multiplicação *in vitro* de microcepas da árvore matriz 05. Barra = 1,0 cm; E: Microcepa da árvore matriz 13 na fase de multiplicação *in vitro*. Barra = 1,0 cm; F: Brotações alongadas (setas vermelhas) da árvore matriz 13. Barra = 1,0 cm; G: Microestacas da árvore matriz 13 plantadas na miniestufa. Barra = 2,5 cm; H, I, J = Microplantas das árvores 03, 05 e 13, respectivamente. Barras = 1,0 cm; K = Microplantas transplantadas para tubetes cobertos com sacos de polietileno transparentes. Barra = 3,0 cm; L = Microplantas ao final da aclimatização em casa de sombra. Barra = 5,0 cm; M: Microplantas das matrizes de *E. cloeziana* na área de pleno sol. Barra = 5,0 cm; N: Microjardim clonal formado com microestacas da árvore matriz 13. Barra = 10 cm

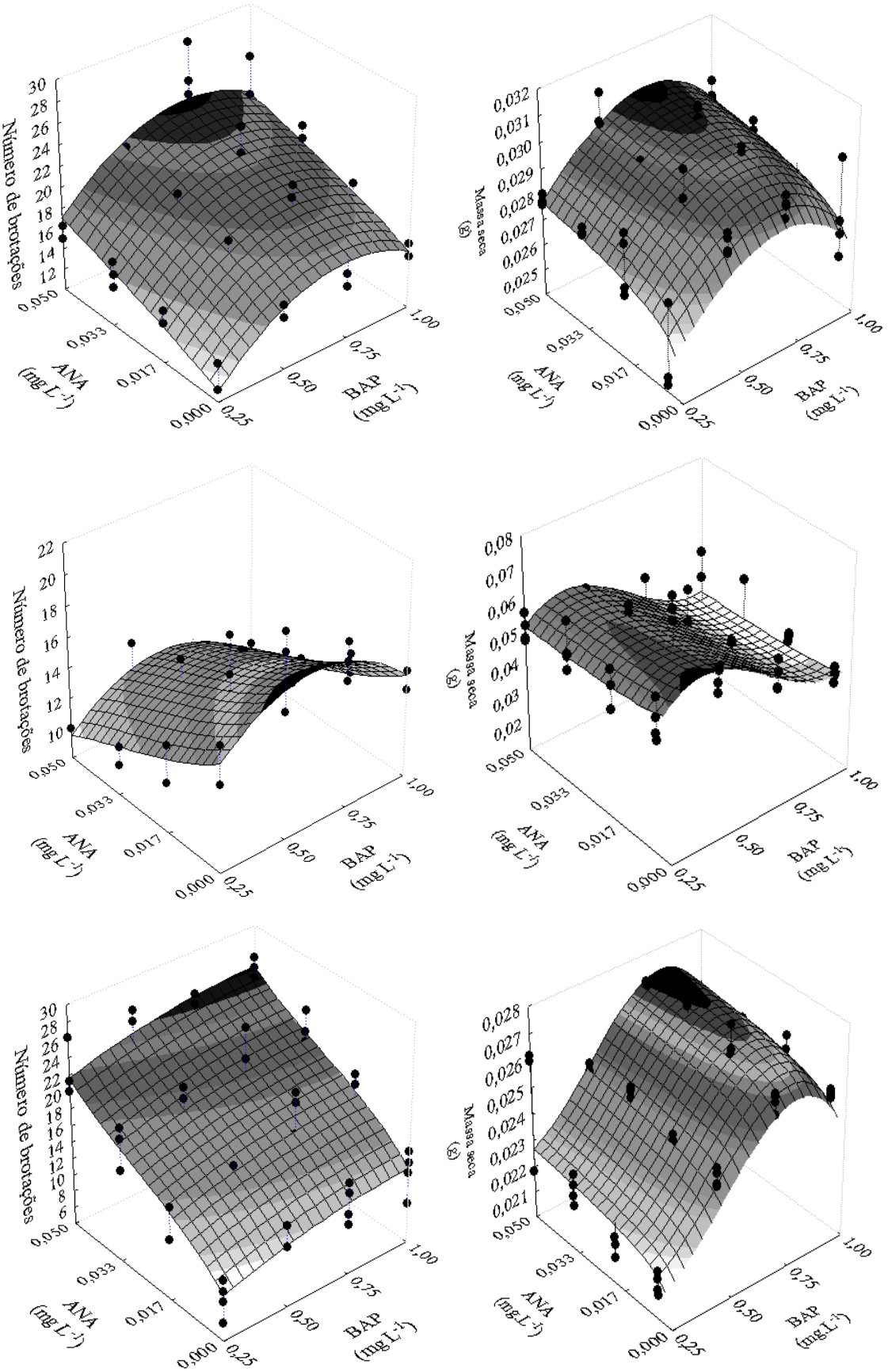


Figura 3 – Superfície de resposta para o número de brotações e de massa seca das microcepas, das árvores matrizes de *E. cloeziana* 03 (A e B) 05 (C e D) e 13 (E e F) em função das concentrações de BAP e ANA

Os valores estimados pela regressão polinomial para o número de brotações por explante revelou um aumento com acréscimos da concentração de BAP e ANA para as árvores matrizes 03 e 13 (Figuras 3A e 3E). As concentrações de 0,74 mg $L^{-1}$ de BAP e 0,09 mg $L^{-1}$ de ANA para a árvore matriz 03 e de 1,03 mg $L^{-1}$ de BAP e 0,06 mg $L^{-1}$ de ANA para a árvore matriz 13 correspondem às estimativas para maior proliferação das brotações dos respectivos materiais genéticos. As árvores matrizes 03 e 13 produziram em média 29,02 e 28,89 brotações por explantes, respectivamente. Esses genótipos corresponderam aos materiais mais responsivos à multiplicação *in vitro.*

A maior taxa de multiplicação das brotações, das árvores matrizes 03 e 13 nas concentrações mais elevadas de BAP e ANA, foram acompanhadas pelo incremento de matéria seca das microcepas das mesmas. Portanto, os resultados para a massa seca das microcepas foram semelhantes àqueles encontrados para o número de brotações. O maior acúmulo de matéria seca das microcepas foi estimado para as concentrações de 0,71 mg $L^{-1}$ de BAP e 0,10 mg $L^{-1}$ de ANA para a árvore matriz 03 (Figura 3B) e de 0,82 mg $L^{-1}$ de BAP e 0,10 mg $L^{-1}$ de ANA para a árvore matriz 13 (Figura 3F). As estimativas das concentrações ótimas para o número de brotações da árvore matriz 03 foram inferiores em relação à 13 devido intensa proliferação das brotações nos tratamentos para a concentração de 1,00 mg $L^{-1}$ de BAP (Figura 2A), porém com um aspecto rosetado, caracterizado por gemas de entrenós curtos. Acrescenta-se o intenso calejamento na interface explante/meio de cultura (Figura 3B). Desse modo, houve redução na multiplicação das brotações desse material genético, o que não ocorreu com as brotações da árvore matriz 13 (Figura 2E).

O valor médio da massa seca das microcepas das árvores matrizes 03 e 13 após 30 dias de multiplicação em meio de cultura WPM foram de 0,0308 e 0,0297 g por explante, respectivamente. Por outro lado, para a árvore matriz 05, observou-se um comportamento inverso para a multiplicação *in vitro* das brotações com relação à concentração de ANA (Figuras 2C-D e 3C), além de haver ocorrido manifestação bacteriana endofítica (Figura 2D). A maior proliferação das gemas e ganho de massa seca das brotações ocorreu nos tratamentos onde essa auxina não foi suplementada ao meio de cultura. Assim, a concentração de 0,61 mg $L^{-1}$ de BAP correspondeu aquela estimada para promover a maior multiplicação das gemas da árvore matriz 5, apresentando um número médio de 17,94 de gemas por explante. Em relação à massa seca das brotações, a concentração de 0,41 mg $L^{-1}$ de BAP proporcionou maior acúmulo de matéria seca, com estimativa de 0,06 g por explante.

A taxa de crescimento variou entre os tratamentos dentro e entre as árvores matrizes de *E. cloeziana* aos 30 dias de cultivo em meio de cultura WPM na fase de multiplicação *in*

*vitro* (Tabela 4). As maiores médias das taxas de crescimento das árvores matrizes 03 e 13, foram de 0,99 e 1,32%, respectivamente, obtidas nas concentrações de 0,75 mg $L^{-1}$ de BAP e de 0,033 mg $L^{-1}$ de ANA. Para a árvore matriz 05 a maior taxa de crescimento de 4,32% foi proporcionada pela combinação de 0,50 mg $L^{-1}$ de BAP e de 0,017 mg $L^{-1}$ de ANA.

Tabela 4 – Taxa de crescimento relativo (R%) da produção de matéria seca para brotações de três árvores matrizes (03, 05 e 13) de *E. cloeziana* na multiplicação *in vitro* no meio de cultura WPM em função das diferentes concentrações de BAP e ANA

| Tratamentos | | R(%) | | |
|---|---|---|---|---|
| BAP | ANA | Árvore matriz | | |
| (mg $L^{-1}$) | (mg $L^{-1}$) | 03 | 05 | 13 |
| 1,00 | 0,050 | 0,81 | 2,06 | 1,07 |
| 1,00 | 0,033 | 0,81 | 2,13 | 1,09 |
| 1,00 | 0,017 | 0,71 | 2,55 | 1,09 |
| 1,00 | 0,000 | 0,65 | 2,37 | 1,03 |
| 0,75 | 0,050 | 0,93 | 2,57 | 1,25 |
| 0,75 | 0,033 | 0,99 | 2,66 | 1,32 |
| 0,75 | 0,017 | 0,96 | 3,16 | 1,25 |
| 0,75 | 0,000 | 0,84 | 3,08 | 1,13 |
| 0,50 | 0,050 | 0,94 | 3,26 | 0,98 |
| 0,50 | 0,033 | 0,87 | 3,61 | 0,99 |
| 0,50 | 0,017 | 0,84 | 4,32 | 0,93 |
| 0,50 | 0,000 | 0,80 | 3,69 | 0,90 |
| 0,25 | 0,050 | 0,70 | 3,33 | 0,88 |
| 0,25 | 0,033 | 0,70 | 3,54 | 0,64 |
| 0,25 | 0,017 | 0,69 | 3,55 | 0,51 |
| 0,25 | 0,000 | 0,38 | 3,46 | 0,49 |

Na multiplicação das brotações das árvores matrizes de *E. cloeziana*, apesar das diferenças entre as taxas de crescimento relativo, observou-se para ambos os materiais genéticos que na primeira semana não ocorreu a multiplicação das brotações, correspondendo a um período de adaptação ao meio de cultura. O desenvolvimento de novas brotações iniciou-se na segunda semana, estendendo-se até a terceira semana de cultivo, onde ocorreu a estabilização da multiplicação *in vitro.*

De modo geral, a relação auxina/citocinina avaliada, representada pela combinação de ANA e BAP proporcionou respostas satisfatórias para a multiplicação *in vitro* das brotações das árvores matrizes 03, 05 e 15 no meio de cultura WPM. As brotações

apresentaram bom desenvolvimento e vigor vegetativo, isento de deficiências nutricionais visualmente perceptíveis.

### 4.3.3 Alongamento *in vitro*

***Efeito do "pulse" com $GA_3$***

Os tratamentos de "pulse" com GAcontribuíram, de forma geral para o alongamento *in vitro* das brotações das árvores matrizes de *E. cloeziana*, entretanto, observaram-se respostas diferenciadas entre os materiais genéticos para os diferentes tratamentos avaliados.

A sobrevivência das brotações caiu drasticamente depois de aplicado o primeiro tratamento de "pulse", independentemente da concentração de $GA_3$ avaliada (Figura4). O $GA_3$ apresentou um efeito deletério sobre as brotações dos materiais genéticos estudados, após um prolongado cultivo *in vitro* das mesmas, em meio de cultura suplementado com este regulador de crescimento. As brotações que permaneceram 12 dias ou mais em meio de cultura suplementado com $GA_3$ alongaram, porém,apresentaram hiperidricidade e baixo vigor. O subcultivo das brotações para novo meio de cultura isento de regulador de crescimento não garantiu a sobrevivência das brotações.

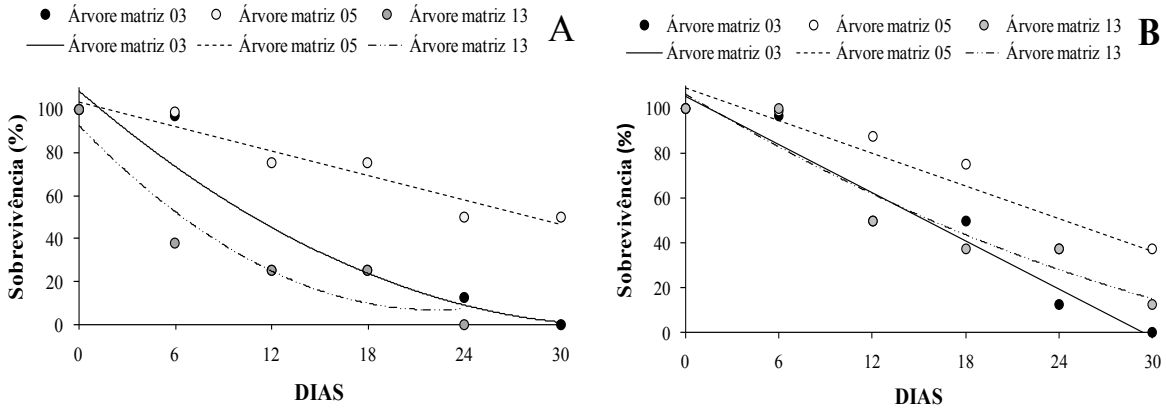


Figura 4 – Sobrevivênciadas brotações de três árvores matrizes de *E. cloeziana*: 03, 05 e 13 submetidas aos tratamentos de "pulse" de 05 mg $L^{-1}$ (A) e 1,0 mg $L^{-1}$ (B) de $GA_3$, ao longo de 30 dias de subcultivo em meio de cultura WPM

Houve um incremento no número de brotações alongadas da árvore matriz 05 ao longo do período de cultivo *in vitro*, independentemente da concentração de $GA_3$ estudada. Por sua vez, o maior número de brotações alongadas das árvores matrizes 03 e 13 foram observados para os 15 dias de cultivo *in vitro*, ocorrendo uma redução com o decorrer do mesmo (Figura5). O número médio de brotações alongadas das árvores matrizes 05 e 13 corresponderam a 5 brotações/explante. Entretanto, para a árvore matriz 03 esse número ficou aquém dos resultados dos demais materiais genéticos, com uma média de 1,2 brotações alongadas.

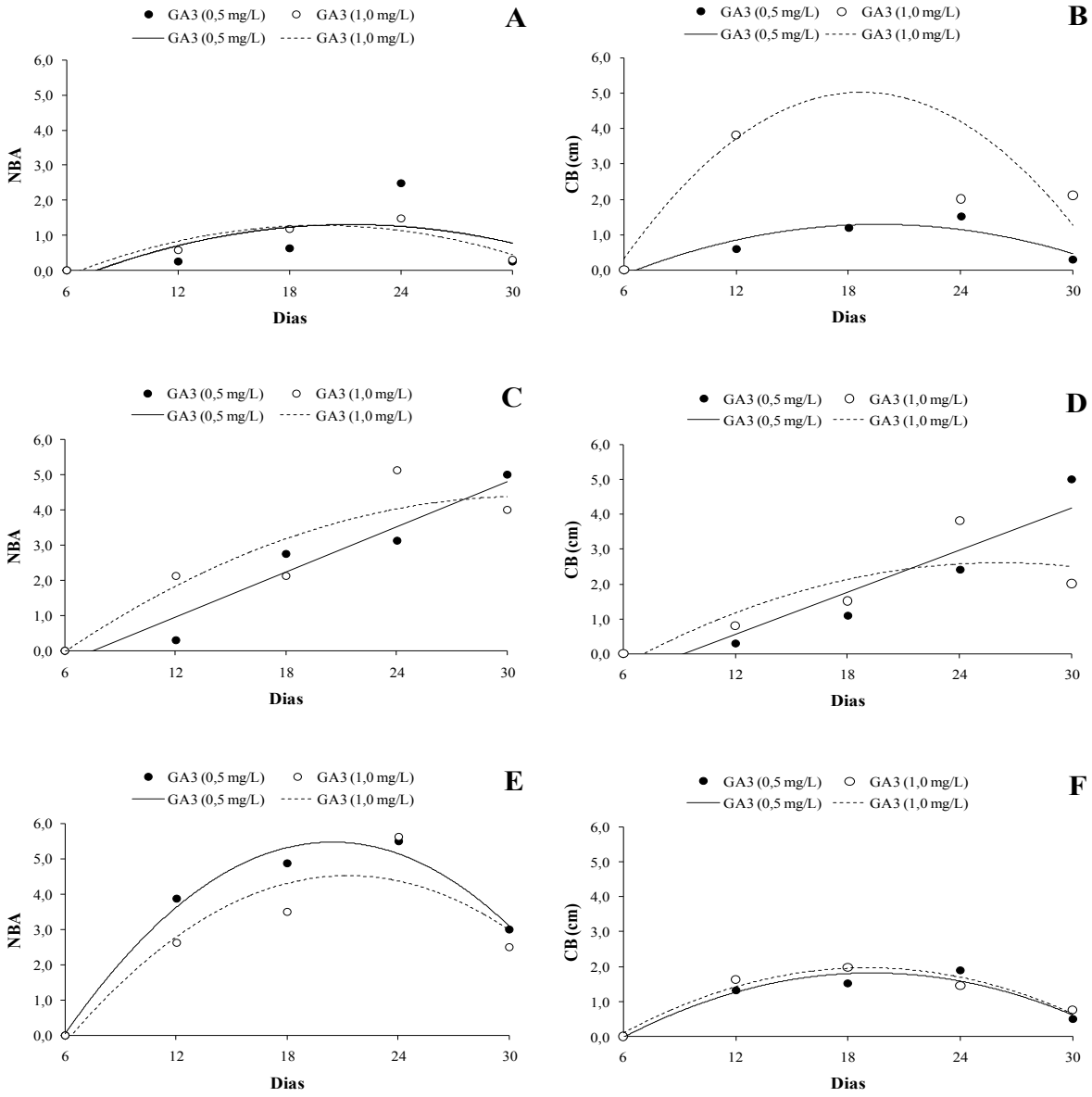


Figura 5 – Número médio de brotações alongadas (NBA) e comprimento médio das brotações (CB) de três árvores matrizes de *E. cloeziana*: 03 (A, B), 05 (C, D) e C13(E, F) submetidas aos tratamentos de "pulse" de 05 mg $L^{-1}$ e 1,0 mg $L^{-1}$ de $GA_3$, ao longo de 30 dias de subcultivo em meio de cultura WPM

### *Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA*

Brotações alongadas *in vitro* (> 1,0 cm de comprimento) foram obtidas para todos explantes das três matrizes de *E. cloeziana.* As brotações das árvores matrizes 03, 05 e 13 apresentaram comportamentos similares em relação às concentrações de BAP e ANA estudadas (Figura6).

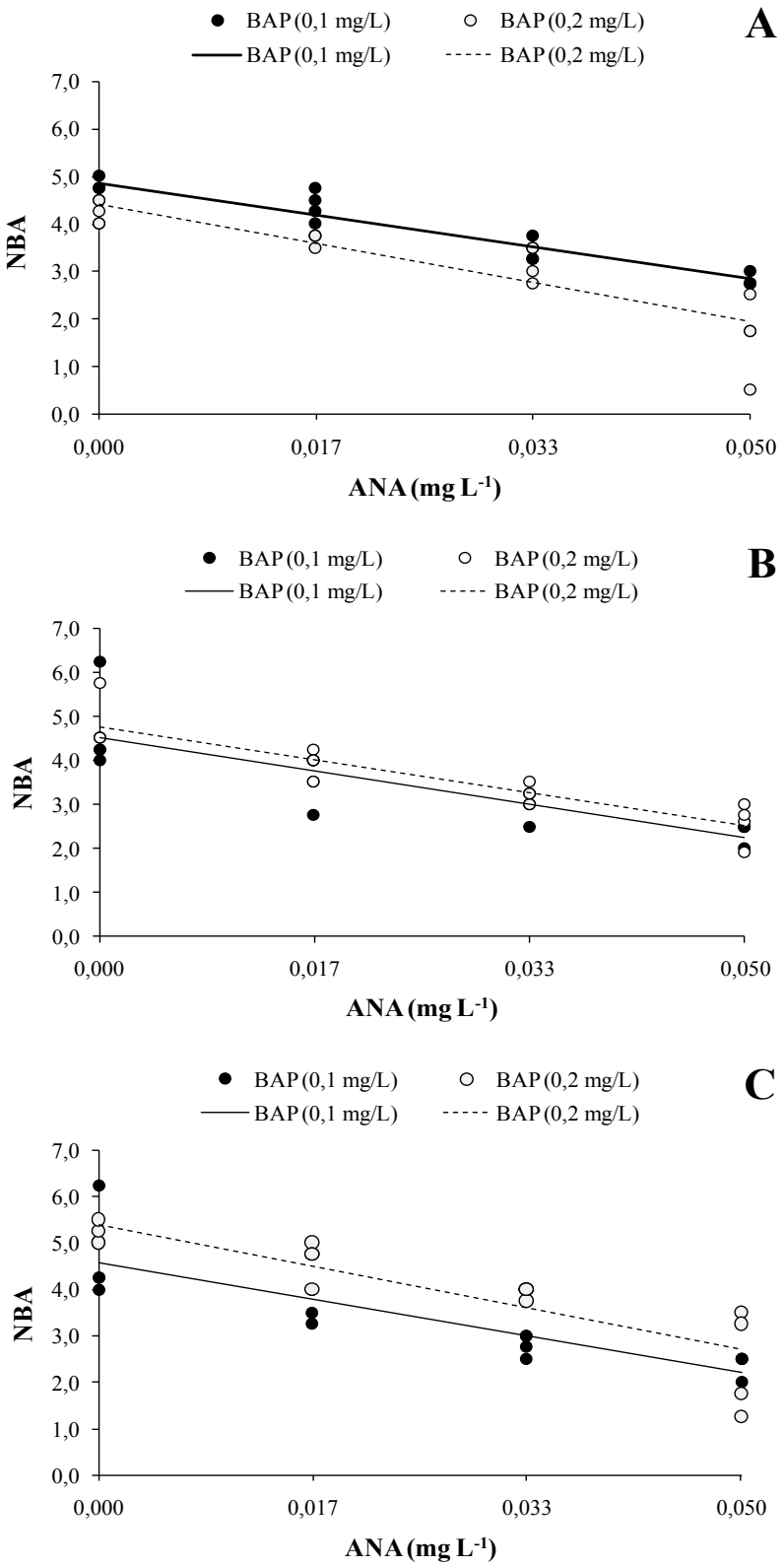


Figura 6 – Número médio de brotações alongadas (NBA) de três árvores matrizes de *Eucalyptus cloeziana*:03 (A), 05 (B) e 13(C), em função dos tratamentos com BAP e ANA, após 60 dias de cultivo

O número de brotações alongadas foi superior nos tratamentos nos quais o regulador de crescimento ANA, não foi suplementado ao meio de cultura, independentemente da

concentração de BAP. O número médio de 4 a 6 brotações alongadas/explante alongadas nos tratamentos isentos de ANA foi observado para todos os materiais genéticos de *E. cloeziana* estudados (Figura6).

As brotações alongadas mostraram-se vigorosas, requisito necessário para a fase de aclimatização e de enraizamento *ex vitro*. Portanto, apenas a redução da concentração de BAP da fase de multiplicação *in vitro* foi suficiente para obter brotações alongadas (> 1,0 cm) aos 30 dias de cultivo em meio de cultura ½ WPM.

### 4.3.4 Aclimatização das brotações

O enraizamento *ex vitro* das microestacas de ambos os materiais genéticos, no sistema de miniestufa foi obtido com sucesso (Figura2G). Entretanto, os percentuais de enraizamento das microestacas variaram entre os materiais genéticos, sendo que para a árvore matriz 13 obteve-se 50% de microestacas enraizadas, enquanto para as microestacas das árvores matrizes 05 e 03 observaram-se 32% e 25% de enraizamento, respectivamente (Figuras 7 e 3H-J). De forma geral, a aclimatização das brotações por um período de 30 dias no sistema de miniestufa mostrou ser viável para a indução de raízes adventícias nas microestacas de *E. cloeziana*.

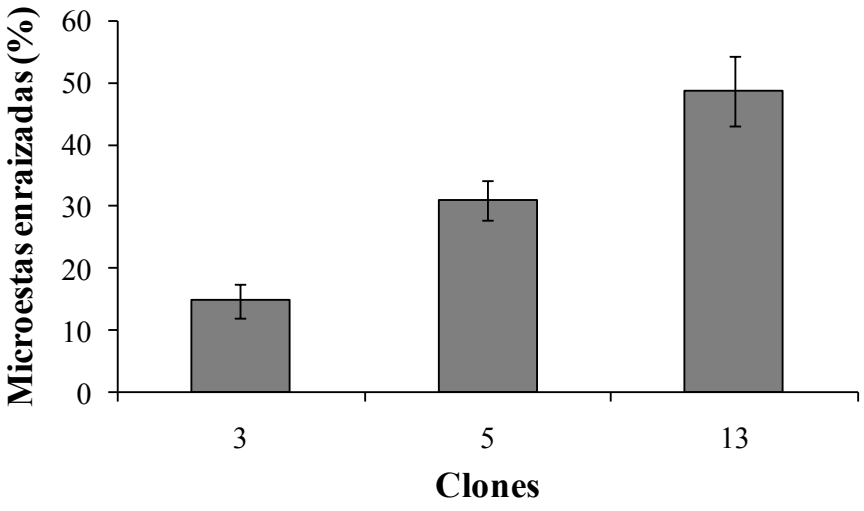


Figura 7 – Porcentagem de microestacas enraizadas das árvores matrizes 03, 05 e 13 de *E. cloeziana* aos 30 dias de aclimatização no sistema de miniestufa

O enraizamento adventício das microestacas das matrizes 03, 05 e 13 de *E. cloeziana* ocorreu via rizogênese direta, sem a formação de calo na base do propágulo. As raízes adventícias originaram-se a partir das células do câmbio vascular (Figura8).

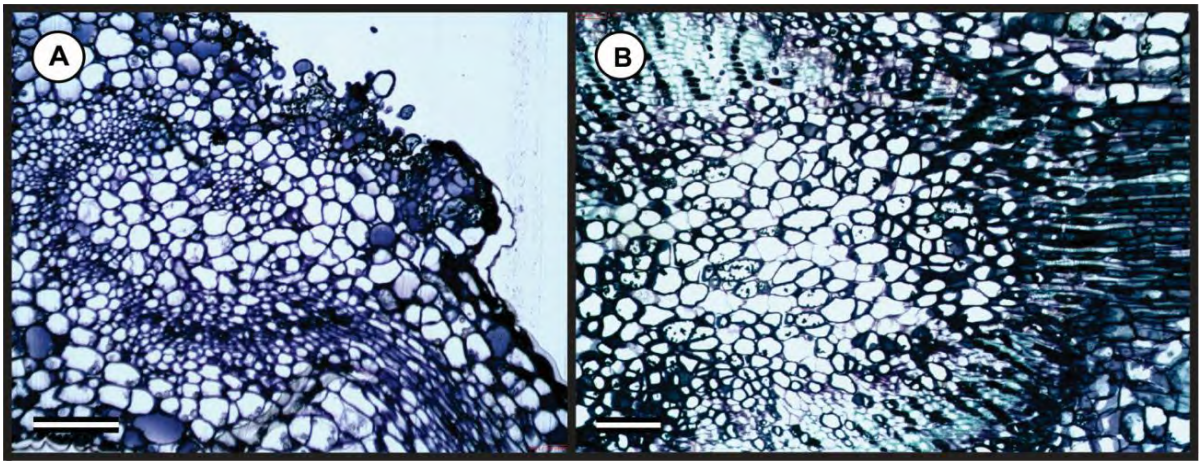


Figura 8 - Cortes histológicos transversais de raízes adventícias formadas na base de microestacas de *E. cloeziana* aclimatizadas em miniestufa. A: Raiz adventícia formada a partir do câmbio vascular da microestaca; B = Detalhe da conexão entre o feixe vascular da raiz adventícia e as células do câmbio vascular da microestaca; Barras = 10 µm

As posteriores etapas de aclimatização, com a transferência das microplantas enraizadas para tubetes (Figura 3K) e sua rustificação na casa de sombra (Figura 3L) e por último na área de pleno sol (Figura 3M) foi realizada com sucesso, com o percentual de sobrevivência acima de 90% para todos os materiais genéticos estudados.

**4.4 Discussão**

Este trabalho objetivou o estabelecimento de um protocolo de micropropagação via proliferação de gemas axilares de matrizes adultas de *E. cloeziana* com fins de rejuvenescimento *in vitro*.

O resgate destes materiais genéticos por meio de megaestacas revelou ser uma técnica eficiente e aplicável do ponto de vista prático. As brotações epicórmicas induzidas nas megaestacas corresponderam a uma fonte de explantes viável para a micropropagação dos materiais genéticos estudados, apesar do estabelecimento *in vitro* de explantes provenientes do campo a partir de árvores adultas ser problemático (BECK et al., 1998). Independentemente da época de coleta, as brotações epicórmicas das árvores matrizes de *E. cloeziana* para o estabelecimento *in vitro*, necessitaram ser coletadas até no máximo 20 dias após a sua emissão, período em que se inicia o declínio no vigor das brotações. Entretanto, diferenças foram observadas no estabelecimento *in vitro* dos explantes obtidos a partir das megaestacas coletadas nas diferentes épocas do ano, sendo os melhores resultados encontrados para o estabelecimento dos explantes na época 2 (Tabela 1). No estabelecimento *in vitro* de *E. tereticornis*, também foram encontradas grandes variações entre os meses do ano, bem como entre os genótipos estudados (SHARMA; RAMAMURTHY, 2000).

As diferenças encontradas quanto ao efeito da sazonalidade, provavelmente estejam correlacionadas ao vigor fisiológico da árvore matriz, decorrentes dasegunda época de coleta das megaestacas que representou um período de boa disponibilidade de água e luz, com condições mais favoráveis para o crescimento ativo das árvores e, consequentemente com maior disponibilidade de fotoassimilados. Dessa forma, as brotações epicórmicas com maior vigor fisiológico foram induzidas nas megaestacas coletadas nesta época do ano, obtendo-se melhores resultados quanto ao estabelecimento *in vitro* dos explantes e também menor oxidação destes (Tabela 1).

A contaminação fúngica corresponde a um dos principais um entrave no estabelecimento *in vitro* de explantes de *Eucalyptus* (BRONDANI et al., 2009; ALMEIDA et al., 2008). Provavelmente, as variações das condições ambientais durante as épocas influenciaram também a contaminação fúngica e bacteriana dos explantes das árvores matrizes de *E. cloeziana*. O período mais seco, correspondente à época 1 (estação seca), apresentou maior quantidade de esporos de fungos suspensos no ar que se depositam sobre a superfície dos vegetais, explicando os maiores percentuais de contaminação fúngica para os explantes coletados durante essa época do ano. Por outro lado, os maiores percentuais de contaminação bacteriana foram observados nos explantes coletados na época 2 (estação chuvosa), possivelmente devido às condições climáticas terem sido propícias para uma maior atividade fisiológica das plantas, o que consequentemente, refletiu em uma maior proliferação das comunidades bacterianas nas brotações epicórmicas.

As citocininas e as auxinas são utilizadas em diferentes concentrações combinadas para promover a multiplicação das brotações na multiplicação *in vitro* (DAVE; ANTHONY, 2010). Os resultados demonstraram que a multiplicação das brotações das árvores matrizes de *E. cloeziana* pode ser realizado no meio de cultura WPM suplementado com diferentes concentrações de BAP e ANA. A combinação BAP e ANA foi utilizada com sucesso na micropropagação de *Eucalyptus* (BISHT et al., 1999; SHARMA; RAMAMURTHY, 2000; GOMES; CANHOTO, 2003; JOSHI et al., 2003; BUNN, 2005; ARYA et al., 2009; BRONDANI et al., 2011, 2012). O BAP é reportado como a principal citocinina utilizada na micropropagação de *Eucalyptus* (BUNN, 2005).

Os materiais genéticos podem responder diferenciadamente quanto à propagação (HARTMANN et al., 2011). Neste estudo foram constatadas diferenças quanto à produção de brotações axilares e incrementos de massa seca entre os materiais genéticos (Figura 3), impossibilitando a definição de uma única concentração ótima de BAP e ANA para os mesmos. De modo geral, as concentrações de BAP utilizadas para promover maiores taxas de

multiplicação das brotações das árvores matrizes de *E. cloeziana* ficaram entre 0,60 e 1,00 mg $L^{-1}$, combinadas com a concentração de 0,1 mg $L^{-1}$ de ANA para as árvores matrizes 03 e 13. Procedências de *E. grandis* também apresentaram diferenças em relação à taxa de multiplicação (SOBROSA; CORDER, 2003). Possivelmente, serão necessários ajustes do meio de cultura para os clones, os quais poderão promover melhores resultados ao cultivo *in vitro*. A necessidade de otimização do meio de cultura de acordo com as necessidades específicas do *E. cloeziana*, é uma provável justificativa para as taxas de crescimento inferiores a 1% para todos os tratamentos na multiplicação das brotações da árvore matriz 03.

Na multiplicação da árvore matriz 05 houve um intenso calejamento da porção basal das brotações em contato com o meio de cultura, proporcionando um incremento na massa seca destas, o que foi constatado pelas maiores taxa de crescimento relativo observadas para este genótipo, comparativamente aos outras duas árvores matrizes (Tabela 4). Nesse sentido, menores concentrações de BAP e ANA foram estimadas para proporcionar melhores resultados quanto à multiplicação das brotações para este genótipo comparado aos demais, o que evidencia uma genótipo-dependência do balanço hormonal na multiplicação *in vitro* das árvores matrizes de *E. cloeziana*. No caso da árvore matriz 05, a concentração supra-ótima dos reguladores de crescimento, principalmente BAP resultou em maior calejamento das brotações e redução da multiplicação.

O efeito do $GA_3$ no alongamento de brotações deve-se ao aumento da solubilização de carboidratos solúveis pelo $GA_3$ e sua disponibilização para os processos metabólicos (BIALECKA; KEPCZNSKI, 2007). Contudo, o alongamento *in vitro* das brotações de *E. cloeziana* com tratamentos de "pulse" com $GA_3$ revelaram que a exposição prolongada das brotações acarretou o desenvolvimento anormal das mesmas, apresentando disfunções fisiológicas como alta hiperidricidade, estiolamento, que impossibilitaram a obtenção de microestacas vigorosas para a aclimatização. O $GA_3$ também provouser inadequado para promover o alongamento de brotações de clones de *E. benthamii* (BRONDANI et al., 2012). Os resultados revelaram uma relação inversa entre a sobrevivência das brotações e o alongamento das mesmas no decorrer do tempo (Figuras 3 e 4). A presença de citocinina no meio de cultura eleva os níveis da auxina livre (ativa) nos explantes (NORDSTRÖM et al., 2004) e o acréscimo de $GA_3$ contribui para a redistribuição da auxina nas brotações (ZIAUKA; KUUSIENÉ et al.; 2009). Além disso, as auxinas estão envolvidas na modulação de diversos processos fisiológicos nas plantas (WOODWARD; BARTEL, 2005), como a síntese de etileno, o qual está diretamente ligado à senescência nas plantas, o que

provavelmente explicaria a senescência das brotações de *E. cloeziana* com o decorrer do tempo quando expostas ao $GA_3$.

Diante dos resultados insatisfatórios do "pulse" com $GA_3$ na promoção do alongamento de brotações de *E. cloeziana*, fez-se necessário novos tratamentos com diferentes concentrações de BAP combinadas com ANA, sendo a redução da concentração de BAP no meio de cultura suficiente para promover o alongamento das brotações. Fato este também reportado por promover o alongamento de brotações de *E. tereticornis* (AGGARWAL et al., 2012). Entretanto, as brotações não atingiram comprimentos superiores a 3,0 cm. Provavelmente, a habituação das microcepas e um efeito residual de BAP da fase de multiplicação *in vitro* tenham sido responsáveis por este resultado, uma vez que as microcepas foram subcultivadas nesse meio de cultura de multiplicação por 19 vezes sucessivas. O subcultivo das brotações em meio de cultura sem reguladores de crescimento poderia favorecer para contornar este problema e promover o alongamento também das brotações, de forma similar ao reportado para *E. globulus* (GÓMEZ et al., 2007).

A aclimatização e o enraizamento das brotações representamos principais gargalos à micropropagação de *Eucalyptus* (AGGARWAL et al., 2012; ARYA et al., 2009; HUNG; TRUEMAN, 2011), podendo limitar o emprego dessa técnica para determinados genótipos (MANKESSI et al., 2009; NEHRA et al., 2005). Nesse trabalho, a aclimatização das brotações com o enraizamento das microestacas diretamente no substrato demonstrou ser um procedimento viável para a obtenção de mudas clonais das árvores matrizes de *E. cloeziana.* A aclimatização acompanhada do enraizamento *ex vitro* apresentam vantagens para o processo de micropropagação de *E. cloeziana*, reduzindo custos da formação da muda pela eliminação da etapa de enraizamento *in vitro* das brotações, (XAVIER et al., 2013). Outra vantagem é o aumento da possibilidade de sucesso na aclimatização dos explantes, pois evita-seestresses relacionados à transferência de raízes obtidas *in vitro* para o substrato, que podem danificá-las (BRONDANI et al., 2012).

O enraizamento *in vitro* tem sido realizado na grande maioria dos trabalhos de micropropagação reportados para materiais adultos de *Eucalyptus* (TRINDADE; PAIS, 1997; SHARMA; RAMAMURTHY, 2000; BENNETT et al., 2003; GOODGER et al., 2008; NOURISSIER; MONTEUUIS, 2008; ARYA et al., 2009; AGGARWAL et al., 2012). No entanto, as raízes formadas em condições *in vitro* não são funcionais, sem uma perfeita conexão vascular entre o sistema radicular e o caule da microestacas (DEBERGH; MAENE, 1981), além de não apresentarem crescimento adequado das raízes (PINTO et al., 2002).

As análises histológicas das microestacas enraizadas das matrizes de *E. cloeziana* revelaram conexão direta com o câmbio vascular caulinar sem a presença decalo, o que denota uma boa qualidade do sistema radicular formado. As células cambiais apresentam características de células meristemáticas e, portanto, mais responsivas a eventos morfogênicos, como a rizogênese. Além disso, o sistema radicular adventício formado com conexão direta com o câmbio vascular caulinar permitiu a formação de uma muda de melhor qualidade, com um sistema radicular mais vigoroso, garantindo uma eficiente absorção de água e translocação de nutrientes (GONÇALVES et al., 1998).Esse resultado reflete o vigor e a funcionalidade do sistema radicular formado no sistema de miniestufa durante a aclimatização, capaz de sustentar o crescimento e desenvolvimento de mudas para a composição de um microjardim clonal (Figura 3N).

Acrescenta-se que o enraizamento das microestacas sem o uso de reguladores de crescimento e sem a formação de calo na sua base pode ser um indicativo de rejuvenescimento destes materiais através da micropropagação, uma vez que se trata de brotações que foram multiplicadas sucessivamente ao longo de 19 subcultivos.

As diferenças observadas nos percentuais de enraizamento entre as microestacas das árvores matrizes de *E. cloeziana* podem estar relacionadas ao genótipo, uma vez que a capacidade de enraizamento das microestacas mostrou ser específica para cada genótipo (GOODGER et al., 2008). Todavia, um dos principais fatores que podem ter influenciado no enraizamento das microestacas corresponde às diferenças no vigor fisiológico das mesmas. A qualidade nutricional das brotações está associada ao seu enraizamento (SCHWAMBACH et al., 2005; HUNG; TRUEMAN, 2011), dessa forma, justificam-se os menores percentuais de enraizamento *ex vitro* da árvore matriz 03, uma vez que as sua microestacas apresentaram maior grau de hiperidricidade e menor comprimento. Ainda são necessários maiores ajustes na etapa de alongamento *in vitro* que proporcione a obtenção de microestacas fisiologicamente mais ativas. Novas avaliações se fazem necessárias, a respeito tanto de substratos para a aclimatização das mesmas, como do controle da umidade nas miniestufas, uma vez que a excessiva umidade do substrato utilizado no estudo causou a necrose e consequentemente, a perda de algumas microestacas.

Os resultados revelaram a viabilidade dos miniestufas para a aclimatização das microestacas de *E. cloeziana*, bem como comprovado para *E. benthamii* (BRONDANI et al., 2012). Asministufas contribuíram para a manutenção da umidade relativa do ar próximas a 100% e pequenas variações na temperatura, o que contribui sobre maneira para a sobrevivência das microestacas, uma vez que a reduzida deposição de cutícula nas folhas nas

condições *in vitro* faz com que haja excessiva perda de água pelas plantas na aclimatização (HAZARIKA, 2006).

Por fim, neste trabalho encontra-se descrito pela primeira vez um eficiente protocolo de micropropagação de árvores matrizes adultas de *E. cloeziana*, o que é de particular importância para a própria espécie. Além disso, corrobora o uso da técnica de cultivo *in vitro* como alternativa de rejuvenescimento *in vitro* de matrizes adultas de *E. cloeziana* cuja abordagem a esse respeito será realizada no próximo capítulo.

## 4.5 Conclusões

As brotações epicórmicas induzidas nas megaestacas corresponderam a explantes viáveis para o estabelecimento *in vitro* de matrizes adultas de *E. cloeziana*.

O resgate das matrizes de *E. cloeziana* na estação do ano mais quente mostrou-se mais favorável para a obtenção de brotações epicórmicas mais vigorosas.

A multiplicação *in vitro* das brotações comprovou-se adequada no meio de cultura WPM, suplementado com concentrações combinadas de BAP superiores a 0,60 mg $L^{-1}$com 0,10 mg $L^{-1}$ de ANA para os genótipos 03 e 13, e isento do regulador de crescimento ANA para as brotações da árvore matriz 05.

Os tratamentos de "pulse" com $GA_3$ não foi adequado para promover o alongamento *in vitro* das brotações, pelo contrário mostrou-se prejudicial ao desenvolvimento das mesmas. O cultivo i*n vitro* das brotações em meio de cultura WPM suplementado com 0,1 mg $L^{-1}$ de BAP proporcionou o alongamentodas brotações.

A aclimatização e o enraizamento *ex vitro* das microestacas foi realizada com sucesso nos miniestufas, garantindo a obtenção de mudas clonais das matrizes adultas de *E. cloeziana*.

## Referências

AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; REDDY, S. Shoot organogenesis in elite clones of *Eucalyptus tereticornis*.**Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, n. 1, p.45–52, 2010.

AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; SHARMA, J.; REDDY, M.S. Factors affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm. ***In Vitro* Cellular and .Development Biology - Plant**, Columbia, v. 48, n. 5, p. 521–529, 2012.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. de. **Clonagem e doenças do eucalipto.** 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 500p.

ALMEIDA, F.D.; XAVIER, A.; DIAS, J.M.M.; PAIVA, H.N. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptuscloeziana*F. Muell. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 455-463, 2007.

ALMEIDA, J.R.; MARTINS, C.R.; DUTRA, L.F. Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptusdunnii* visando estabelecimento *in vitro*. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 15, n. 1, p. 54-60, 2008.

ARYA, I.D.; SHARMA, S.; CHAUHAN, S.; ARYA, S. Micropropagation of superior *Eucalyptus* hybrids FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn x *E. tereticornis* Sm) and FRI-14 (*Eucalyptus torelliana* F. V. Muell x *E. citriodora* Hook): a commercial multiplication and field evaluation. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 21, p. 5718–5726, 2009.

ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A.G.; ALFENAS, A.C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: WALTER, C.; CARSON, M. (Ed.). **Plantation forest biotechnology for the 21th century**. Kerala: Research Signpots, 2004. p.303-333.

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

BANDYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSSEN, G.; HAMILL, J.D. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species – *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Plant Science**, Oxford, v. 140, n. 2, p.189–198, 1999.

BECK, S.L.; DUNLOP, R.; STADEN, J.V. Rejuvenation and micropropagation of adult *Acacia mearnsii* using coppice material.**Plant Growth Regulation**, New York, v. 26, n. 3, p.149-153, 1998.

BENNETT, I.J.; MCDAVID, D.A.J.; MCCOMB, J.A.The influence of ammonium nitrate, pH and índole butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated*Eucalyptus globulus*.**BiologiaPlantarum**, Praha, v. 47, n. 3, p. 355–360, 2003.

BIALECKA, B.; KEPCZNSKI, J. Changes in concentrations of soluble carbohydrates during germination of *Amaranthuscaudatus* L. seeds in relation to ethylene, gibberellin A3 and methyl jasmonate. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 5, n. 1, p. 21-31, 2007.

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.

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, 2011.

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 *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 4, p. 655-663, 2011.

BRONDANI, G.E.; WITONDAS, H.W.; BACCARIN, F.J.B.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. ***In Vitro*** **Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 48, n. 5, p. 478-487, 2012.

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.

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

DEBERGH, P.C.; MAENE, L. Ascheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture.**Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 335-345, 1981.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **PesquisaFlorestalBrasileira**, Colombo, v.58, n. 1, p.49–59, 2009.

GLOCKE, P.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. 6-Benzylamino purine stimulates in vitro shoot organogenesis in *Eucalyptus erythronema*, *E. stricklandii* and their interspecific hybrids. **ScientiaHorticulturae**, Amsterdan, v.109, n. 4, p. 339–344, 2006.

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.

_____. Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. ***In Vitro*** **Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v.45, n. 1, p.72–82, 2009.

GÓMEZ, C.; RÍOS, D.; SÁNCHEZ-OLATE, M. Effect of successive subculture on adventitious caulogenesis of *Eucalyptus globulus*.**Bosque**, Valdívia, v. 28, n. 1, p. 13-17, 2007.

GONÇALVES, J.C.; DIOGO, G.; AMANCIO, S.*In vitro* propagation of chestnut *Castanea sativa* x *C. crenata*: Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. **ScientiaHorticulturae**, Amsterdan, v. 72, n. 3, p.265–275, 1998.

GOODGER, J.Q.D.; HESKES, A.M.; KING, D.J.; GLEADOW, R.M.; WOODROW, I.E. Micropropagation of *Eucalyptus polybractea* selected for key essential oil traits. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 35, n. 3, p.247–251, 2008.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR., F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation:** principles and practices. 8thed. São Paulo: Prentice-Hall, 2011. 915 p.

HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants.**ScientiaHorticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006.

HUNG, C.D.; TRUEMAN, S.J. Preservation of encapsulated shoot tips and nodes of the tropical hardwoods *Corymbiatorelliana* x *C. citriodora* and *Khayasenegalensis*.**Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, n. 2, p.341-352, 2012.

IKEMORI, Y.K. Epicormic shoots from the branches of *Eucalyptus grandis* as an explant source for *in vitro* culture. **Commonwealth Foreign Review**, Camberra, v. 66, n. 4, p.351-356, 1987.

HYAMS, D. **CurveExpert 1.4**.Microsoft Corporation, 1993. Disponível em: <http://http://www.curveexpert.net/download/>. Acessoem: 20 set. 2013.

JAIN, S.M.*;* HÄGGMAN, H. **Protocols for micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Springer2007. 559p.

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

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**, Ashville, v. 30, p. 421–427, 1980.

MAMAGHANI, M.S.; OMIDI, M.H.A.M.; MATINIZADEH, M.; GHAMARI-ZARE, A. SHAHRZAD, S.; FOROOTAN, M.The effect of thidiazuron level on in vitro regeneration type and peroxidase profile in *Eucalyptus microtheca* F. Muell.**Plant Growth Regulation**, New York, v. 59, n. 3, p. 199–205, 2009.

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

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

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 - Plan**t, Columbia, v. 41, n. 6, p. 701-717, 2005.

NORDSTRÖM, A.; TARKOWSKI, P.; TARKOWSKA, D.; NORBAEK, R.; ASTOT, C.; DOLEZAL, K.; SANDBERG, G. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance auxin-cytokinin regulated development. **PNAS**, Washington, v. 101, n. 21, p. 8039-8044, 2009.

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.

PINTO, G.; SANTOS, C.; NEVES, L.; ARAÚJO, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus*Labill.**Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 3, p. 208–213, 2002.

PINTO, G.; PARK, Y. S.; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C. Genetic control of somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus*Labill. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 6, p. 1093–1101, 2008.

PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.100, n. 1, p. 13–20, 2010.

SCHWAMBACH, J.; FADANELLI, C.; FETT-NETO, A. G. Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*.**Tree Physiology**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 487–494, 2005.

SHARMA, S.K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees.**Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 5, p. 511–518, 2000.

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

SOTELO, M.; MONZA, J. Micropropagation of *Eucalyptus maidenii* elite trees. **Agrociencia**, Montevidéu, v. 11, n. 1, p. 81-89, 2007.

TRINDADE, H.; PAIS, M.*In vitro* studies of *Eucalyptus globulus* rooting ability.***In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 33, n. 1, p.1-5, 1997.

VIEITEZ, A.M.; SÁNCHEZ, M.C.; AMO-MARCO, J.B.; BALLESTER, A. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercusrobur* trees for micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.37, n. 3, p. 287-295, 1994.

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

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal:** princípios e técnicas. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 272 p.

YAN, H.; LIANG, C.; YANG, L.; LI, Y.*In vitro* and *ex vitro* rooting of *Siratiagrosvenorii*, a traditional medicinal plant.**Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 32, n. 1, p. 115-120, 2010.

ZIAUKA, J.; KUUSIENÉ, S. Plant hormone gibberellin induces decline of viability in isolated larch shoot buds. **Baltic Forestry**, Kaunas, v. 15, n. 1, p. 13-22, 2009.

# 5 MICROPROPAGAÇÃO COMO TÉCNICA DE REJUVENESCIMENTO *IN VITRO* DE MATRIZES ADULTAS DE *Eucalyptus cloeziana*


## Resumo

A micropropagação corresponde a uma importante ferramenta para a propagação de *Eucalyptus*, especialmente por deter a capacidade de rejuvenescer árvores adultas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a micropropagação como técnica para o rejuvenescimento *in vitro* de genótipos adultos de *E. cloeziana* visando aumentar a eficiência de sua propagação por meio da microestaquia. Para tanto a micropropagação de cinco matrizes adultas de *E. cloeziana* foram estabelecidas a partir de brotações epicórmicas e multiplicadas via proliferação de gemas axilares. A taxa de multiplicação de cada genótipo foi comparada com a de brotações de origem seminal durante 21 subcultivos sucessivos. A capacidade rizogênica das brotações de três árvores matrizes micropropagadas foi avaliada na fase de aclimatização das mesmas. Adicionalmente, também comparou-se o enraizamento de miniestacas provenientes de minicepas de origem seminal e de microestacas obtidas a partir de microcepas rejuvenescidas. Os resultados proveram a evidência da ocorrência de que ocorreu rejuvenescimento das árvores matrizes de *E. cloeziana* durante a micropropagação, resultando em incrementos nas taxas de multiplicação das microcepas de alguns materiais genéticos. Os percentuais de enraizamento das miniestacas e microestacas foram inferiores a 20%, sendo um indicativo de que além da maturidade dos tecidos outros fatores estão envolvidos no enraizamento adventício de *E. cloeziana*.


Palavras-chave: Propagação *in vitro*; Idade fisiológica; Enraizamento adventício; Microestaquia


## Abstract

Micropropagation represents an important tool to *Eucalyptus* propagation, especially to have the capacity of rejuvenated adult trees. The objective of this study was evaluated the micropropagation like an*in vitro* rejuvenation technique of *E. cloeziana* adult genotypes to increase the propagation efficiency by micro-cutting technique. The micropropagation from five *E. cloeziana* adults matrices was established from epicormic shoots and the multiplication by branchingfrom axillary bud. The multiplication rate of each genotype was compared with shoots from seminal origin, during 21 successive subcultives. The shoot rhizogenic capacity from three micropropagated matrices was evaluated in the acclimatization phase. Additionally, the rooting of minicuttings from seminal mini-stumps and microcuttings obtained by rejuvenated micro-stumps was compared, too. The results provide evidence that occurred rejuvenation of the *E. cloeziana* adult matrices during the micropropagation, resulting in the increase of multiplication rates of some genotypes. Both minicutting and microcutting rooting percentage**s** were lowerat 20%, suggesting that others factors besides rejuvenation are involvedin adventitious rooting of *E. cloeziana*.


Keywords: *In vitro* propagation, Physiologic age; Adventitious rooting; Micro-cutting technique

## 5.1 Introdução

A seleção de clones de *Eucalyptus* para diversos fins na atividade florestal é realizada na idade adulta, em razão de ser impossível de predizer precocemente e com precisão as características tecnológicas da madeira presentes na árvore adulta. No entanto, a clonagem de indivíduos adultos de algumas espécies de *Eucalyptus* é restringida pelos baixos percentuais de enraizamento de estacas. O declínio na capacidade de enraizamento adventício de propágulos das espécies lenhosas corresponde a um dos principais efeitos da maturação, sendo comumente utilizado como seu marcador morfo-fisiológico (GREENWOOD et al., 2001).

A clonagem *in vitro* ou *ex vitro* de espécies florestais adultas é afetada por características que acompanham a maturação como a redução da taxa de crescimento, redução da habilidade de enraizamento dos propágulos ou em alguns casos acompanhado do fenômeno de plagiotropismo em estacas enraizadas. A maturação, um fenômeno complexo, é o maior problema encontrado para a ampla adoção da cultura de tecidos na propagação de espécies lenhosas, como o *Eucalyptus*.

Nesse contexto, a utilização de técnicas, principalmente do uso de propágulos com características juvenis, coletados na região basal das árvores, a partir de pré-tratamentos *in vivo*,como estaquia seriada e enxertia seriada ou pela adoção da micropropagação, tem proporcionado resultados positivos para a propagação de genótipos adultos de *Eucalyptus* (XAVIER et al., 2009). Essas técnicas, que envolvem o incremento na capacidade de propagação, são frequentemente descritos pelo termo rejuvenescimento (FRANCLET et al., 1987). O rejuvenescimento constitui em um pré-requisito que possibilita a clonagem de árvores adultas, sendo que na prática, seu sucesso dependerá da competência da técnica utilizada em promovê-lo nos propágulos selecionados. Além disso, é difícil separar o rejuvenescimento em parcial e completo (PIERIK, 1990).

A micropropagação com fins de rejuvenescimento tem se tornado uma importante ferramenta para a propagação clonal de espécies de *Eucalyptus* recalcitrantes ao enraizamento adventício pelas técnicas comumente adotadas no setor florestal, como a estaquia e a miniestaquia (OLIVEIRA et al., 2012). O cultivo *in vitro* de tecidos adultos, como segmentos nodais e brotações epicórmicas via micropropagação por subcultivos sucessivos tem proporcionado o rejuvenescimento dos mesmos (DUTRA et al., 2009). Acredita-se ainda que o potencial de enraizamento dos propágulos de genótipos adultos melhore com subcultivos sucessivos (TITON et al., 2002; BRONDANI et al., 2012). Acrescenta-se que a

micropropagação promove a homogeneização fisiológica dos tecidos, seja em potencial de enraizamento ou qualidade do sistema radicular (ASSIS; MAFIA, 2007).

A utilização da cultura de tecidos para *Eucalyptus* tem-se justificado técnica e economicamente apenas para o rejuvenescimento de materiais genéticos de alto valor comercial para constituir um microjardim clonal com microcepas rejuvenescidas (XAVIERet al., 2009). O sucesso da propagação de genótipos adultos por meio da microestaquia tem sido reportado para *E. grandis* (TITON et al., 2002; SANTOS et al., 2005), clones híbridos de *E. grandis* (WATT et al., 1995; XAVIER; COMÉRIO, 1997; XAVIER et al., 2001), de *E. globulus* (OLIVEIRA et al., 2012). Nesse sentido, os resultados relatados referem-se principalmente ao melhor desempenho e velocidade de enraizamento e qualidade do sistema radicular. Outra vantagem corresponde à formação de um sistema radicular nas microestacas mais semelhante ao de mudas produzidas por sementes do que aquele de mudas oriundas de estacas (ASSIS; MAFIA, 2007).

O rejuvenescimento *in vitro* além de melhorar os índices de enraizamento dos propágulos, possibilita a aceleração dos programas de melhoramento genético de *Eucalyptus* pela propagação de genótipos adultos. Portanto, a micropropagação via proliferação de gemas axilares constitui uma importante ferramenta para contornar as restrições encontradas na propagação de genótipos adultos de *E. cloeziana,* o qual tem sido considerado recalcitrante ao enraizamento adventício (ALMEIDA et al., 2007).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o rejuvenescimento *in vitro* de matrizes adultas de *E. cloeziana* por meio da micropropagação via proliferação de gemas axilares e discutir a viabilidade da utilização da técnica como alternativa para a propagação da espécie por meio da microestaquia.

## 5.2 Material e Métodos

### 5.2.1 Material experimental

O material genético utilizado nesse estudo foi constituído por cinco árvores matrizes de *E. cloeziana* (03, 05, 06, 13 e 15) com idade de 26 anos, em uma população base de *E. cloeziana*, originária de sementes de polinização aberta de 25 árvores matrizes. As progênies são procedentes da CSIRO (Lote 14425), coletadas na região de Gympie, estado de Queensland, Austrália (Lat. 26º18´, Long. 152º18´, Alt. 600 m). A população base foi instalada em março de 1983 na Estação Experimental de Ciências Florestais do departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ),

Universidade de São Paulo (USP), localizada no município de Anhembi – SP (22º 47' S de latitude; 48º 09' W de longitude e altitude de 500m).

O material de origem seminal foi coletado na mesma população base (procedência Anhembi – SP, cultivar LCFA026 - IPEF).

### 5.2.2 Multiplicação *in vitro* de *E. cloeziana*

As microcepas das árvores matrizes 03, 05, 06, 13 e 15 de *E. cloeziana* produzidas na fase de estabelecimento *in vitro* foram inoculadas, sob condições assépticas, em frascos de vidro transparente (Ø = 5 cm e 8 cm de altura) contendo 40 mL do meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) suplementado com 0,5 mg $L^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,01 mg $L^{-1}$ de ácido α-naftaleno acético(ANA), 30 g $L^{-1}$ de sacarose e 4,0 g $L^{-1}$ de ágar.

A cada período de 30 dias, procedeu-se o subcultivo dos explantes para novo meio de cultura de igual composição, isolando microcepas (denominação aglomerado de brotações) padronizadas com cinco brotações maiores que 5 mm e com bom vigor vegetativo. Concomitantemente, a multiplicação *in vitro* de microcepas de material de origem seminal de *E. cloeziana* também foi avaliada. Para tanto, as sementes foram embebidas em água destilada por um período de12 hs, sendo em seguida lavadas em água corrente por cinco minutos e desinfestadas adotando a seguinte sequência: 30 seg em álcool 70% e 15 min em solução de hipoclorito de sódio 2.5% (v/v) mais uma gota de Tween-20 0.01% (v/v).

Após a desinfestação as sementes foram lavadas seis vezes em água deionizada autoclavada e inoculadas, sob condições assépticas, em frascos de vidro transparente (Ø = 5,0 cm e 8,0 cm de altura) contendo 40 mL do meio de cultura de germinação, composto pela metade da concentração dos sais MS (MURASHIDGE; SKOOG, 1962), suplementado com 15 g $L^{-1}$ de sacarose e solidificado com 4,0 g $L^{-1}$ de ágar. Transcorridos 30 dias, as plântulas foram excisadas de suas raízes, estabelecendo as estacas seminais que foram transferidas para meio de cultura WPM suplementado com 0,5 mg $L^{-1}$ de BAP, 0,01 mg $L^{-1}$ de ANA, 30 g $L^{-1}$ de sacarose e 4,0 g $L^{-1}$ de ágar.

A taxa de multiplicação de cada árvore matriz e do material de origem seminal foi determinada ao final de cada subcultivo, num total de 21 subcultivos. Para tanto, avaliou-se o número de microcepas produzidas em cada subcultivo. A avaliação do material de origem seminal teve início após as brotações apresentarem o tamanho da microcepa padrão. Para o estabelecimento do cálculo da taxa de multiplicação, o número de microcepas obtidas ao final de cada período de 30 dias, foi dividido pelo número de microcepas produzidas ao final do primeiro subcultivo.

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, utilizando 5 repetições compostas de quatro explantes (microcepas) por repetição. Os dados foram analisados por meio das médias e desvio padrão da média.

### 5.2.3 Miniestaquia e microestaquia de *E. cloeziana*

#### 5.2.3.1 Formação do minijardim e do microjardim clonal

O minijardim foi constituído de mudas seminais de *E. cloeziana,* produzidas em tubetes plásticos (55 cm³), contendo como substrato casca de *Pinus* decomposta no Viveiro de Pesquisas do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" ESALQ/USP. Foram semeadas dez sementes por tubete, com raleio realizado aos 40 dias quando necessário. As mudas receberam adubações semanais por fertirrigação (Tabela1) e foram transplantadas para o minijardim ao atingirem uma altura média de 10 cm.

Tabela 1 – Composição da solução nutritiva de fertirrigação das mudas do microjardim clonal e minijardim de *E. cloeziana*

| Fontes de Macro e Micronutrientes | Solução nutritiva (mg $L^{-1}$) |
|---|---|
| Nitrato de potássio | 206,85 |
| Monoamôniofostato | 44,57 |
| Nitrato de amônio | 140,50 |
| Cloreto de cálcio | 111,13 |
| Nitrato de cálcio | 57,18 |
| Cloreto de magnésio | 50,46 |
| Sulfato de magnésio | 60,49 |
| Sulfato de manganês | 4,92 |
| Sulfato de cobre | 0,39 |
| Sulfato de ferro | 9,95 |
| Sódio - EDTA | 13,31 |
| Molibdato de sódio | 0,05 |

O microjardim clonal foi constituído apenas de mudas das árvores matrizes 05 e 13 de *E. cloeziana*. A produção de mudas micropropagadas desses, para a obtenção do material experimental da microestaquia, foi realizada no Laboratório de Fisiologia das Árvores do Departamento de Ciências Florestais na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP).

O mini e microjardim foram estabelecidos em casa de vegetação climatizada (temperatura entre 26 e 30 ºC), recoberta com plástico de polietileno transparente e com renovação do ar forçado por dois ventiladores. As microestacas e mudas seminais foram plantadas em vasos plásticos (18 x 16 x 45 cm) com duas aberturas na porção inferior. O substrato foi composto de areia, fração fina. Os vasos ficaram suspensos por grades metálicas a 85 cm do solo, sendo plantadas seis mudas por vaso no espaçamento 10 x 8 cm.

As mini e microcepas ao atingirem altura de 15 cm, tiveram seus ápices podados à altura de 10 cm da base, visando estimular o desenvolvimento das brotações axilares e consequentemente a formação das mini d microcepas.

A irrigação foi realizada diariamente através de sistema automatizado de gotejamento, enquanto a nutrição mineral foi realizada por fertirrigação, realizada uma vez ao dia (Tabela 1).

**5.2.3.2 Coleta das brotações e preparo das miniestacas e microestacas**

As mini e microestacas apicais foram coletadas com comprimento de 10 cm, com os dois pares de folhas reduzidas à metade da sua área total. Os propágulos coletados foram imediatamente armazenados em caixa de isopor contendo água fria, visando manter a turgescência dos tecidos para o posterior estaqueamento,

**5.2.3.3 Condições de enraizamento das miniestacas e microestacas**

Amini e microestaquia foram realizadas em tubetes cônicos (55 $cm^3$) preenchidos com substrato orgânico à base de casca de *Pinus* decomposta. A adubação de incorporação não foi realizada. Para o enraizamento, os propágulos foram acondicionados em casa de vegetação climatizada (umidade relativa do ar > 80%, temperatura entre 26 e 30 ºC) com nebulização intermitente por 30 dias, sendo realizada por microaspersão automatizada, com intervalos pré-estabelecidos. O experimento de enraizamento adventício das mini e microestacas foi realizado no Viveiro de Pesquisas Florestais pertencente ao Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP.

**5.2.3.4 Avaliação do enraizamento das miniestacas e microestacas**

As avaliações compreenderam avaliações da sobrevivência e percentual de calejamento e enraizamento das mini e microestacas na saída da casa de vegetação, aos 30 dias de idade.

O experimento foi conduzido no delineamento em blocos ao acaso, em esquema fatorial (2 x 3 x 3), sendo os fatores constituídos de duas técnicas de propagação, miniestaquia e microestaquia, três materiais genéticos (2 clones de árvores matrizes 05 e 13 e material de origem seminal) e três épocas diferentes de realização do experimento de enraizamento das mini e microestacas. Os tratamentos foram realizados com cinco repetições, compostas por 8 mini ou microestacas por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ($P<0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P<0,05$), utilizando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa – OK, USA).

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Multiplicação *in vitro* de *E. cloeziana*

Os resultados relativos à taxa multiplicativa de brotações de *E. cloeziana* ao longo dos 21 subcultivos sucessivos revelaram diferenças entre os genótipos estudados. As brotações das árvores 03, 05 e 13 apresentaram tendência de aumento da taxa de multiplicação no decorrer dos subcultivos (Figura 1). O comportamento desses genótipos foi similar ao observado para o material de origem seminal, o qual serviu como parâmetro para avaliar a resposta *in vitro* das brotações.

As brotações da árvore matriz 03 apresentaram maiores taxas de multiplicação que as brotações das árvores matrizes 05 e 13. Os valores inferiores das taxas de multiplicação das brotações da árvore matriz 05 àqueles obtidos para as árvores matrizes 03 e 13, provavelmente, devem-se à alta manifestação bacteriana endofítica que pode ter exercido um efeito competitivo por nutrientes presentes no meio de cultura.

Por outro lado, não ocorreram incrementos na taxa de multiplicação das árvores matrizes 06 e 15 no decorrer dos subcultivos, sendo que para que as brotações da árvore matriz 15 sobreviveram apenas até o 14º subcultivo, enquanto para a árvore matriz 06 a taxa de multiplicação das brotações estabilizou-se no 16º subcultivo e permaneceu inalterada até o último subcultivo avaliado. (Figura 1).

O crescimento inicial das brotações foi caracterizado por ser irregular, produzindo brotações anormais, com folhas grandes e retorcidas. Houve também uma produção excessiva de calos na região basal dos explantes neste período. A estabilização das culturas *in vitro* é importante para promover maiores taxas de multiplicação. O período de estabilização das brotações variou entre os diferentes genótipos de *E. cloeziana* cultivados *in vitro*. A estabilização das brotações das árvores matrizes 03 e 13 ocorreram no 3º subcultivo, apresentando um crescimento contínuo com brotações uniformes, com pequenas folhas e sem evidências de calos nas brotações.

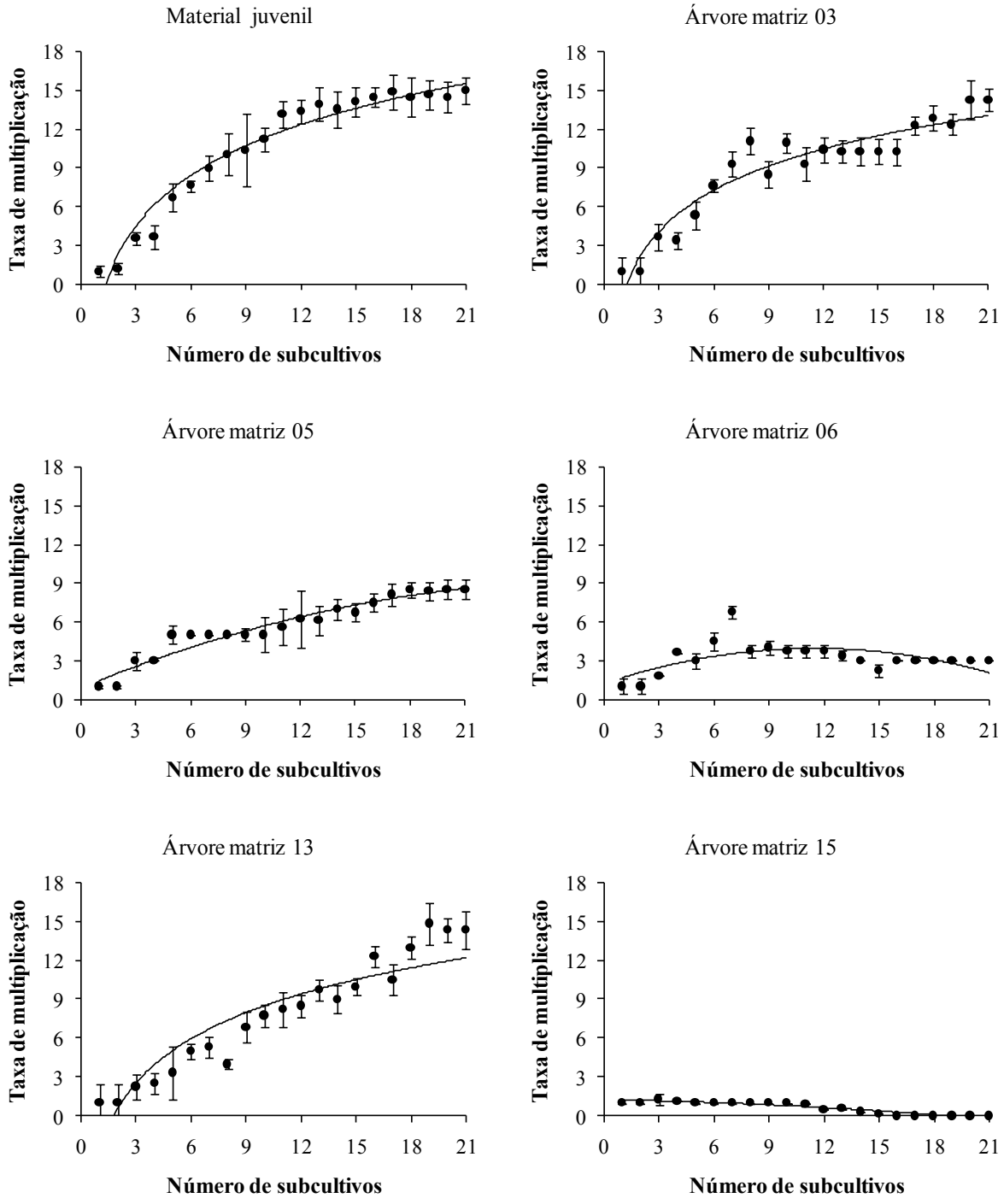


Figura 1 - Taxa de multiplicação de brotações de cinco árvores matrizes de *Eucalyptus cloeziana* (03, 05, 06, 13 e 15 ) e de material de origem seminal, na fase de multiplicação *in vitro* no meio de cultura WPM com 0,5 mg $L^{-1}$ de BAP e 0,01 mg $L^{-1}$ de ANA, em 21 subcultivos

Nos subcultivos subsequentes obtiveram-se brotações com o mesmo padrão de uniformidade, mesma aparência e com taxa contínua de crescimento (Figura 2). Essa resposta foi similar a encontrada para a multiplicação das brotações juvenis de origem seminal. No caso das brotações da árvore matriz 05, a estabilização das culturas ocorreu apenas a partir do

6º subcultivo, enquanto para os outros dois materiais genéticos (árvores matrizes 06 e 15) não ocorreu a estabilização das culturas *in vitro*.

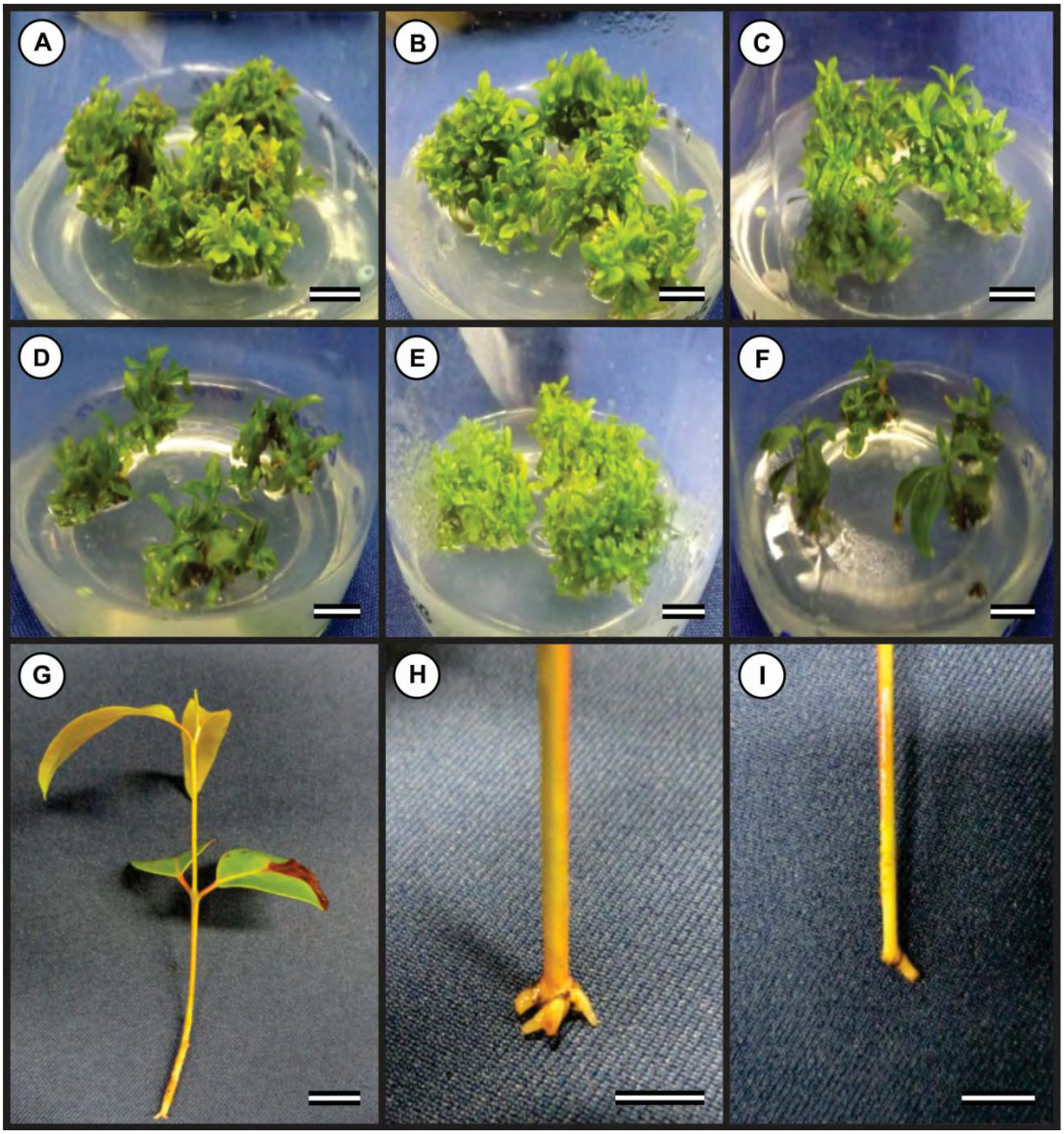


Figura 2 - Multiplicação *in vitro* de brotações de *E. cloeziana* de origem seminal (A) e das árvores matrizes 03 (B), 05 (C), 06 (D), 13 (E) e 15 (F) no 10º subcultivo *in vitro*; Microestaca da árvore matriz 13 (G) após 30 dias de permanência na casa de vegetação; Detalhe de raízes adventícias induzidas em microestaca da árvore matriz 05 (H) e em miniestaca do material proveniente de sementes. Barras = 1,0 cm

### 5.3.2 Miniestaquia e microestaquia de *E. cloeziana*

Os percentuais de sobrevivência e de calejamento das mini e microestacas de *E. cloeziana* foram superiores a 80% na saída da casa de vegetação nas 3 diferentes épocas de estaqueamento das mesmas (Figuras 3A e 3B). Não foram observadas diferenças entre as

miniestacas de material juvenil e as microestacas das árvores matrizes 05 e 13 e entre as épocas de estaqueamentos para essas características avaliadas.

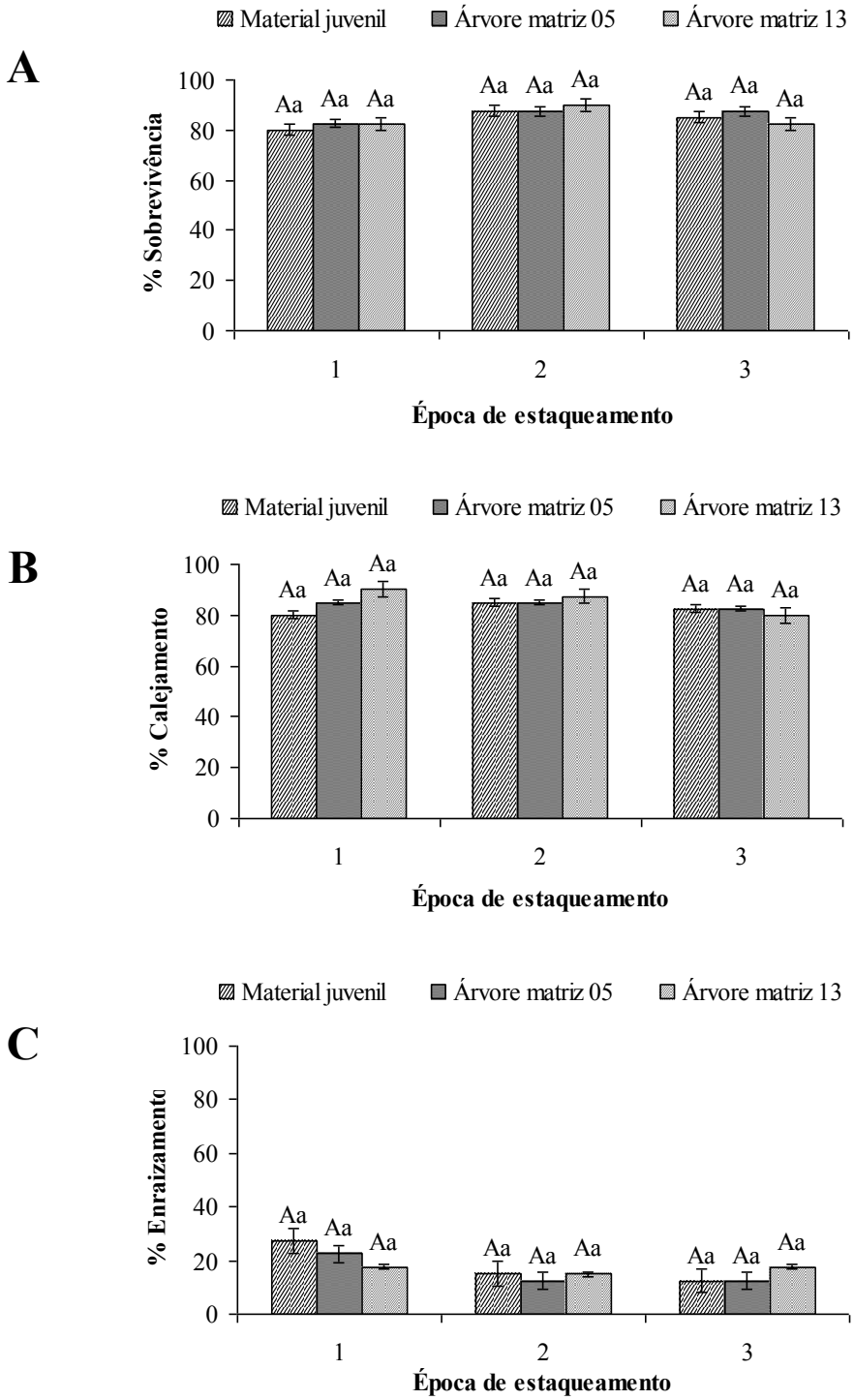


Figura 3 - Porcentagem de sobrevivência (A), calejamento (B) e de enraizamento (C) de miniestacas de material juvenil e de microestacas de duas árvores matrizes (05 e 13) de *E. cloeziana* em função da época de estaqueamento. Barras verticais indicam o desvio padrão das médias. Médias seguidas de uma mesma letra minúscula, entre genótipos e dentro de uma mesma época de estaqueamento, e as seguidas de uma mesma letra maiúscula, entre épocas de estaqueamento dentro do mesmo genótipo, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

As mini e as microestacas apresentavam bom vigor fisiológico, sem a ocorrência de necrose das mesmas e perda das folhas. O calejamento das mini e microestacas foram caracterizados pela presença na base do propágulo de algum grau de modificação, como o intumescimento, a presença de pontos translúcidos, a formação de calo e a presença de pontos de iniciação de raízes. O calejamento induzido nas mini e microestacas não foi acentuado, com a formação de extensos aglomerados celulares, compostos de tecidos indiferenciados.

Os percentuais de enraizamento das mini e microestacas de *E. cloeziana* foram inferiores a 20%, independentemente da época de estaqueamento, não havendo diferenças entre os materiais genéticos (Figura 3C). As raízes formadas nos propágulos, independentemente da origem (mini ou microestacas) apresentam pequenos comprimentos. No material juvenil, as miniestacas que enraizaram apresentaram uma única raiz, enquanto, nas microestacas das árvores matrizes 05 e 13, quando enraizaram, houve a indução de maior número de raízes.

**5.4 Discussão**

A dificuldade encontrada na propagação por meio do enraizamento adventício de estacas e miniestacas constituem em um dos principais problemas encontrados na produção de mudas clonais de muitas espécies de *Eucalyptus* selecionadas na idade adulta, entre as quais está o *E. cloeziana* (ALFENAS et al., 2009).

A multiplicação *in vitro* de brotações de *E. cloeziana*,a partir de explantes obtidos de brotações epicórmicas induzidas em megaestacas coletadas de árvores adultas, confirmam a viabilidade do uso da técnica de resgate de material adulto e da micropropagação para a clonagem da espécie.

Os resultados obtidos no cultivo *in vitro* demonstraram diferenças entre os cinco genótipos adultos de *E. cloeziana* quanto à taxa de multiplicação das brotações. Enquanto, obteve-se sucesso no cultivo *in vitro* das brotações das árvores matrizes 03, 05 e 13, as matrizes 06 e 15 demonstraram comportamento oposto (Figura1). O genótipo tem efeito direto na resposta ao cultivo *in vitro*, refletindo em variações na resposta dos materiais genéticos à multiplicação *in vitro*, similar ao observado para *Eucalyptus globulus* sub. *maidenii* (SOTELO; MONZA, 2007), *E. benthamii* (BRONDANI et al., 2012). As condições de cultivo *in vitro* também são responsáveis pelas variações das respostas dos genótipos de *E. cloeziana* ao longo dos subcultivos. A exposição excessiva, através de regimes de subcultivos de longo prazo, com inadequadas concentrações dos componentes do meio, pode resultar em elevação das concentrações ideais de determinadas substâncias dentro dos tecidos vegetais,

refletindo no desempenho da cultura como na obtenção de baixas taxas de multiplicação (MANKESSI et al., 2009). Dessa forma, há necessidade de maiores ajustes no meio de multiplicação e nas concentrações dos reguladores de crescimento para viabilizar a micropropagação dos genótipos recalcitrantes de *E. cloeziana*.

A micropropagação via proliferação de gemas axilares tem sido recomendada para o rejuvenescimento *in vitro* de *Eucalyptus* uma vez que há restauração das características juvenis dos materiais adultos através dos sucessivos subcultivos *in vitro* (BORGES et al., 2011, OLIVEIRA et al., 2012). O efeito rejuvenescedor dos sucessivos subcultivos, em meio enriquecido com BAP, já foi relatado para diferentes espécies arbóreas micropropagadas (PIERIK 1990; VON ADERKAS; BONGA, 2000), Dentre essas para *Eucalyptus* (TRINDADE; PAIS, 1997; SHARMA; RAMAMURTHY, 2000; MANKESSI et al., 2009).

Contudo, não há marcadores morfológicos e moleculares disponíveis que distinguem entre tecidos juvenis e adultos (HUSSEN, 2008) permitindo que se determine com precisão o rejuvenescimento *in vitro*. De maneira geral, os incrementos na taxas de multiplicação ao longo dos subcultivos dos materiais genéticos, revelaram que a multiplicação *in vitro* mostrou-se eficiente para indicar o seu rejuvenescimento, uma vez que a juvenilidade é um fator determinante para a obtenção de elevadas taxas de multiplicação (HALUPA, 2002). Outro critério adotado corresponde à estabilização das culturas *in vitro*, o qual foi variável entre os genótipos de *E. cloeziana*. A duração desse período de estabilização é variável de acordo com a espécie e idade do material de origem (BENNETT et al., 1994). As brotações coletadas de culturas estabilizadas respondem uniformemente e com maiores probabilidades de sucesso no enraizamento e aclimatização comparativamente àquelas obtidas de culturas não estabilizadas, sendo, portanto, um indício de rejuvenescimento das mesmas.

Se por um lado não há marcadores disponíveis para mensurar e quantificar o rejuvenescimento *in vitro*, o declínio na capacidade de enraizamento adventício de propágulos das espécies lenhosas corresponde a um dos principais efeitos da maturação (GREENWOOD et al., 2001; VIDAL et al., 2003). Atualmente, apenas as avaliações do enraizamento de microestacas coletadas de microcepas rejuvenescidas *in vitro* e estabelecidas em um microjardim clonal compreendem o meio mais adequado para avaliar o grau de rejuvenescimento dos genótipos adultos micropropagados. Dessa forma, apesar das evidências de rejuvenescimento na multiplicação *in vitro*, a realização da microestaquia das árvores matrizes de *E. cloeziana* foi imprescindível para comprovar a aplicabilidade da micropropagação com fins de rejuvenescimento de genótipos de *E. cloeziana*.

Os percentuais de enraizamento das microestacas das árvores matrizes 05 e 13 rejuvenescidas *in vitro* foram muito baixos. A princípio pode-se inferir que o número de subcultivos, na fase de multiplicação *in vitro* das brotações das árvores matrizes de *E. cloeziana*, não tenha sido suficiente para promover rejuvenescimento significativo dos materiais genéticos. Em geral, recomenda-se no mínimo de 10 a 12 subcultivos *in vitro* para que ocorra o rejuvenescimento de *E.urophylla, E. grandis* e seus híbridos(DUTRA et al., 2009; XAVIER et al., 2009). Entretanto, o número de subcultivos das matrizes de *E. cloeziana* foram no total 21, bem superior ao recomendado. Flutuações na capacidade rizogênica são capazes de ocorrer mesmo entre genótipos estritamente aparentados de acordo com um determinismo endógeno (MANKESSI et al., 2009), podendo não refletir de maneira idêntica o rejuvenescimento promovido pela micropropagação.

A posição de coleta dos explantes nas árvores adultas tem influência direta na resposta dos mesmos quanto à propagação. Os propágulos mais próximos da base conservam uma maior juvenilidade em relação aos que se encontram nas posições mais apicais, em conseqüência da sua formação ser mais próxima da época de germinação do que aquelas das regiões intermediárias ou apicais (HARTMANN et al., 2011). Assim, os brotos de cepas possuem características juvenis que facilitam a recuperação da competência ao enraizamento, além da manifestação de todo o potencial genético da planta (ALFENAS et al., 2009). O resgate das árvores matrizes de *E. cloeziana* foi realizado através da coleta de megaestacas da copa das árvores, cujos tecidos possuem um grau de maturidade maior comparados aos de brotações da porção basal das árvores. Nesse sentido, a maior idade ontogenética das brotações epicórmicas pode ter representado um entrave para ocorrer o rejuvenescimento *in vitro* dos genótipos adultos de *E. cloeziana*.

Os percentuais de enraizamento das miniestacas de *E. cloeziana* de origem seminal também foram baixos, não diferindo das microestacas nas três diferentes épocas de estaqueamento. Por conseguinte, esse resultado é um forte indicativo de que o número de subcultivos *in vitro* foi suficiente e consequentemente, que houve rejuvenescimento das brotações. Além disso, a sobrevivência das microestacas não diferiu das miniestacas demonstrando que ambos os propágulos apresentavam bom vigor fisiológico. Os altos percentuais de calogênese observados para as mini e microestacas são indícios que está ocorrendo a indução da rizogênese. Todavia, outros fatores, além da maturidade dos tecidos estão relacionados à incapacidade de formação de raízes adventícias tais como estado nutricional e hídrico da planta doadora de propágulos, balanço hormonal, constituição genética (ALMEIDA et al., 2007). Ademais, o sucesso no enraizamento *ex vitro* e

aclimatização das brotações micropropagadas das árvores matrizes 03, 05 e 13 de *E. cloeziana* reiteram essa hipótese.

No processo de enraizamento adventício, diversos fatores estão envolvidos na capacidade de formação de raízes adventícias em estacas. Dentre estes fatores estão os hormônios vegetais, os quais têm papel central na formação das raízes adventícias, principalmente as auxinas (FOGAÇA et al., 2005). Os fatores ambientais, como luz, temperatura e umidade também têm papel preponderante na rizogênese em *Eucalyptus*. Acrescenta-se que o estado nutricional, das mini e microcepas, é fundamental para o sucesso na propagação, sendo determinante para o acúmulo de carboidratos e síntese de hormônios vegetais, entre outros compostos metabólicos, essenciais ao enraizamento adventício e a velocidade em que ocorre. De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho há a necessidade de maiores estudos sobre a influência desses fatores na formação de raízes adventícias em *E. cloeziana* e assim otimizar as condições necessárias para o sucesso na propagação de genótipos da espécie.

Resultados preliminares da miniestaquia e microestaquia dos materiais genético avaliados nesse estudo com os reguladores de crescimento ANA e AIB apontaram que a sua aplicação é desnecessária uma vez que ocorreu apenas um acréscimo nos percentuais de calejamento, sem aumento do enraizamento. Por outro lado, variações na temperatura dos canaletões dos minijardins aumentaram o número de miniestacas produzidas pelas minicepas, além de constatar a relação positiva entre o aumento nos percentuais de enraizamento e a concentração de boro (TRUEMAN et al., 2013). Ainda, há evidências da necessidade de associações mutualísticas para o *E. cloeziana* (ARAÚJO et al., 2004; MAFIA et al., 2009) confirmando a influência da nutrição mineral na propagação de *E. cloeziana*. Portanto, há a necessidade de maiores estudos que contemplem a nutrição mineral das minicepas e microcepas e o controle das condições ambientais para otimizar a propagação de *E. cloeziana.*

Os resultados proveram evidências da ocorrência de que ocorreu o rejuvenescimento das árvores matrizes de *E. cloeziana* durante a micropropagação, resultando em incrementos nas taxas de multiplicação. Entretanto, os reduzidos percentuais de enraizamento das mini e microestacas fornecem indícios para o envolvimento de outros fatores estejam atuando no enraizamento adventício de *E. cloeziana*, além da maturidade dos tecidos, necessitando assim de maiores investigações.

## 5.5 Conclusão

Os genótipos adultos de *E. cloeziana* diferiram quanto às taxas de multiplicação no decorrer de 21 subcultivos *in vitro*.

Os percentuais de sobrevivência e calejamento das microestacas das árvores matrizes 05 e 13 de *E. cloeziana* foram elevados enquanto, o percentual de enraizamento foi reduzido, resultados semelhantes aos encontrados para miniestacas de origem seminal.

Os resultados semelhantes das microestacas em ralação às miniestacas de origem seminal confirmam a existência de rejuvenescimento do material micropropagado.

## Referências

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. de. **Clonagem e doenças do eucalipto.** 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 500p.

ALMEIDA, F.D.; XAVIER, A.; DIAS, J.M.M.; PAIVA, H.N.; Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 455-463, 2007.

ARAÚJO, C.V.M.; ALVES, L.J.; SANTOS, O.M.; ALVES, J.M. Micorrizaarbuscular em plantações de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell no litoral norte da Bahia, Brasil **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 18, n. 3, p. 513-520, 2004.

ASSIS, T.F.; MAFIA, R.G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**.Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 93-121.

BENNETT, I.J.; MCCOMB, J.A.; TONKINI, 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.

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, 2011.

BRONDANI, G.E.; WIT ONDAS, H.W.; BACCARIN, F.J.B.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. ***In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 48, n. 5, p. 478-487, 2012.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v.58, n. 1, p.49–59, 2009.

FOGAÇA, C.M.; FETT-NETO, A.G. Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance.**Plant Growth Regulation**, New York, v. 45, n. 1, p. 1–10, 2005.

FRANCLET, A.; BOULAY, M.; BEKKAOUI, F.; FOURET, Y.; VERSCHOORE-MARTOUZET, B.; QALKER, N. Rejuvenation. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and Tissue Culture in Forestry**, Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 232-248.

GREENWOOD, M.S.; CUI, X.; XU, F. Response to auxin changes during maturation related loss of adventitious rooting competence in loblolly pine (*Pinustaeda*) stem cuttings. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen,v. 111, n. 3, p. 373–380, 2011.

HALUPA, V.C. *In vitro* propagation of mature trees of *Sorbusaucuparia* L. and field performance of micropropagated trees.**Journal of Forest Science**, Praga, v. 48, n. 12, p. 529-535, 2002.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation:** principles and practices. 8th ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2011. 915 p.

HUSEN, A. Stock-plant etiolation causes drifts in total soluble sugars and anthraquinones, and promotes adventitious root formation in teak (*Tectonagrandis* L. f.) coppice shoots. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 54, n. 1, p. 13–21, 2008.

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**, Ashville, v. 30, p. 421–427, 1980.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, E.M.; BINOTI, D.H.B.; MAFIA, G.M.V.; MOUNTEER, A.H. Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and eucalypts species. **RevistaÁrvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2009.

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

MURALIDHARAN, E.M.; MASCARENHAS, A.F. *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *E. camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 6, n. 3, p. 256–259, 1987.

OLIVEIRA, L.S.; XAVIER, A.; DIAS, P.C.; CORREIA, A.C.G.; BORGES, S.R.; TAKAHASHI, E.K.; PAIVA, H.N. Enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus.* **ScientiaForestalis**, Piracicaba, v. 40, n. 96, p. 507-516, 2012.

PIERIK, R.L.M. Rejuvenation and micropropagation, In: NIJKAMP, H.J.J., VAN DER PLAS, L.H.V.; VAN AAJTRIK, J. (Ed.).**Progress in plant cellular and molecular biology**.Dordrecht: Kluwer Academic, 1990. p. 91-101.

SANTOS, A.P.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, M.L.; REIS, G.G. Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones de *Eucalyptus grandis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 68, n. 1, p. 29-38, 2005.

SHARMA, S.K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees.**Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 5, p. 511–518, 2000.

SOTELO, M.; MONZA, J. Micropropagation of *Eucalyptus maidenii* elite trees. **Agrociencia**, Montevidéu, v. 11, n. 1, p. 81-89, 2007.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Dinâmica do enraizamento de microestacas de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 6, p. 665–673, 2002.

TRINDADE, H.; PAIS, M.S.*In vitro* studies on *Eucalyptus globulus* rooting ability.***In Vitro* Cellular & Developmental Biology – Plan**t, Columbia, v. 33, n. 1, p. 1-5, 1997.

TRUEMAN, S.J.; MCMAHON, T.V.; BRISTOW, M. Production of Eucalyptus cloeziana cuttings in response to stock plant temperature. **Journal of Tropical Forest Science**, Kuala Lumpur, v. 25, n. 1, p. 60–69, 2013.

VIDAL, N.; ARELLANO, G.; SAN-JOSÉ, M.C.; VIEITEZ, A.M.; BALLESTER, A. Developmental stages during the rooting of *in vitro* cultured *Quercus robur* shoots from material of juvenile and mature origin. **Tree Physiology**, Oxford, v. 23, n. 18,p. 1247–1254, 2003.

VON ADERKAS, P.; BONGA, J.M. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment.**Tree Physiology**, Oxford, v. 20, n. 14, p. 921-928, 2000.

WATT, M.P.; DUNCAN, E.A.; ING, M.; BLAKEWAY, F.C.; HERMAN, B. Field performance of micropropagated and macropropagated *Eucalyptus* hybrids. **South African Forestry Journal**, Pretoria, v. 173, n. 1, p. 17-21, 1995.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Enraizamento "*ex vitro*" de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e alongadas "*in vitro*". **Scientia Forestalis**, Piraciaba, v. 51, n. 1, p. 29-36, 1997.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L.**Silvicultura clonal:** princípios e técnicas. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2009. 272 p.

XAVIER, A.; ANDRADE, H.B.; OLIVEIRA, M.L. WENDLING, I. Desempenho do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus cloeziana.* **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 403-411, 2001.

## 6 CONCLUSÃO GERAL

O protocolo de clonagem de *E. cloeziana* estabelecido no presente trabalho, atesta a aplicabilidade do uso da técnica de micropropagação na propagação dessa espécie considerada recalcitrante ao enraizamento adventício. A regeneração *in vitro* via organogênese indireta de *E. cloeziana* a partir de hipocótilos e cotilédones foi obtida com sucesso. Além disso, os resultados encontrados constituem em uma base para investigações futuras a respeito da propagação *in vitro* da espécie, trabalhos com marcadores moleculares e transformação genética. Entretanto, a micropropagação via proliferação de gemas axilares demonstrou ser mais adequada para alcançar os objetivos propostos no presente trabalho. As baixas freqüências de regeneração das gemas adventícias por meio da organogênese e a necessidade de clonagem de indivíduos adultos devido às características da seleção dos genótipos de *Eucalyptus* no melhoramento florestal foram os principais pontos que definiram a escolha da técnica de micropropagação a partir da multiplicação de gemas axilares. O resgate das árvores matrizes, a partir de megaestacas, demonstrou ser uma técnica viável, com a indução de brotações epicórmicas para serem utilizadas na propagação *in vitro*. Os resultados obtidos com o resgate das árvores matrizes de *E. cloeziana* trouxe à tona questionamentos para maiores estudos, principalmente relacionados à ontogenia das brotações epicórmicas e o grau de maturidade das mesmas. O protocolo de micropropagação via proliferação de gemas axilares foi estabelecido com sucesso para três genótipos adultos de *E. cloeziana* (árvores matrizes 03, 05 e 13), porém evidenciando diferenças no comportamento *in vitro.* Tais evidências abrem perspectivas para maiores pesquisas relacionadas à otimização da micropropagação, principalmente dos genótipos recalcitrantes ao cultivo *in vitro* (árvores matrizes 06 e 15). Os resultados positivos na aclimatização e no enraizamento *ex vitro* das brotações em miniestufas corroboraram o êxito na micropropagação dos genótipos adultos de *E. cloeziana*, mas sobretudo, comprovaram a viabilidade do uso da técnica com fins de rejuvenescimento *in vitro*, ainda que parcial desses materiais genéticos e a implantação de um microjardim clonal. As avaliações do enraizamento de microestacas dos genótipos de *E. cloeziana* micropropagados (árvores matrizes 05 e 13) comparativamente à miniestaquia de material de origem seminal forneceram subsídios para a confirmação do rejuvenescimento *in vitro.* Estudos futuros relacionados à metilação de DNA e de proteínas comparativamente entre microcepas e minicepas poderão contribuir para quantificar o grau de rejuvenescimento *in vitro* e serem utilizados como marcadores no processo. Não obstante, os baixospercentuais de enraizamento das microestacas e miniestacas destacaram a atuação de fatores extrínsecos à

maturação dos genótipos de *E. cloeziana*. Esses resultados têm implicações diretas na propagação da espécie e requer maiores estudos relacionados à nutrição mineral do microjardim clonal e otimização das condições ambientais do processo de miniestaquia e microestaquia. Em conclusão, os protocolos de micropropagação, via organogênese indireta e via proliferação de gemas axilares, foram efetivos para a propagação da espécie e abrem oportunidades de pesquisas futuras para incrementar os resultados obtidos e maximizar a clonagem do *E. cloeziana*.