

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE GENÓTIPOS DE
Eucalyptus dunnii MAIDEN**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marcio Carlos Navroski

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE GENÓTIPOS DE *Eucalyptus dunnii* MAIDEN

Marcio Carlos Navroski

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lia Rejane Silveira Reiniger

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

N327m Navroski, Marcio Carlos

Multiplicação *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden / por Marcio Carlos Navroski. – 2011.

101 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Lia Rejane Silveira Reiniger

Coorientador: Maristela Machado Araújo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2011

1 .Engenharia florestal 2. Micropropagação 3. Cultura de tecidos
4. Propagação vegetativa 5. Silvicultura I. Reiniger, Lia Rejane Silveira
II. Araújo, Maristela Machado III. Título.

CDU 630.1

Ficha catalográfica elaborada por Denise Barbosa dos Santos – CRB 10/1756

Biblioteca Central UFSM

Correção de Português: Melissa Heberle

©2011

Todos os direitos autorais reservados a Marcio Carlos Navroski. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Avenida Roraima, n° 1000, prédio 77, sala 36. Santa Maria, RS, Brasil, CEP: 97105-900;

Endereço Eletrônico: navroskiflorestal@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE GENÓTIPOS DE *Eucalyptus dunnii*
MAIDEN**

elaborada por
Marcio Carlos Navroski

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

COMISSÃO EXAMINADORA:

Lia Rejane Silveira Reiniger, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Leandro Vieira Astarita, Dr. (PUCRS)

Maristela Machado Araújo, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2011.

DEDICATÓRIA

DEDICO

À DEUS, por ter me concedido a graça de concluir mais uma etapa de minha caminhada com sucesso.

Aos meus pais, que com grande esforço e amor me deram muito mais do que a vida.

Aos meus irmãos pelo incentivo.

A minha noiva Mariane, pelo apoio e compreensão em todos os momentos.
E a todos que acreditaram em mim, com carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais Alberto e Jandira, pelo apoio, carinho, compreensão e amor. Aos meus irmãos Roberto e Cláudia, pelo constante incentivo.

À orientadora e amiga, professora Dr^a. Lia Rejane Silveira Reiniger, pela orientação e dedicação a mim dispensada. Obrigado pelos inúmeros ensinamentos transmitidos, por todas as vezes que precisei, e me ajudou. Obrigada por tudo.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de realização do mestrado; bem como ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal.

À CAPES, pela bolsa concedida, fundamental para a viabilização deste trabalho.

A Empresa Stora Enso pela disponibilidade de coleta do material para a pesquisa.

Às co-orientadoras, Dr^a Maristela Machado Araújo e Dr^a Marlove Fátima Brião Muniz, pelo apoio, ensinamentos e amizade.

Os Professores Dr^a. Lia Rejane Silveira Reiniger (UFSM), Dr^a Maristela Machado Araújo (UFSM) e Dr. Leandro Vieira Astarita (PUCRS) pela participação na banca de defesa. Agradeço pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições.

Aos colegas de Laboratório, Aline Ritter Curti, Aline Ferreira Paim e Enrique Astério Benitez León, e Diego Pascoal Golle pela amizade, auxílio e pelo convívio. As colegas Iana Somavilla e Marta Stochero Deprá pela amizade.

À secretária do PPGEF, Tita; por todo o apoio, amizade e auxílio.

Aos meus amigos e colegas de mestrado: Magnos, Weslley, Felipe, Guilherme e Eduardo pela amizade, apoio e pelos momentos de distração com o futebol.

À família da Mariane pelo acolhimento, amizade e apoio em todos os momentos.

E, finalmente, agradeço imensamente à Mariane, meu amor, quem escolhi – e infinitas vezes escolheria – para compartilhar todos os dias de minha vida.

“O homem põe pedra sobre pedra e faz um castelo. Deita umas sementes ao chão e faz uma floresta. Escolha cada qual o que quiser, mas por mais pequena que seja a floresta, ela é sempre maior que qualquer castelo. Mesmo sendo a sua história apenas a história de suas árvores.”

José Saramago

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE GENÓTIPOS DE *Eucalyptus dunnii* MAIDEN

AUTOR: MARCIO CARLOS NAVROSKI
ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2011.

Eucalyptus é um gênero de grande importância para a economia e produção de vários bens. Entre as espécies deste gênero, *Eucalyptus dunnii* Maiden destaca-se pela importância, principalmente para os estados da região sul do Brasil, por apresentar um bom crescimento e resistência às geadas. Entretanto, essa espécie apresenta problemas em relação à produção de mudas por clonagem, devido, principalmente, à dificuldade de enraizamento. O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar metodologias para a desinfestação superficial, o estabelecimento, a multiplicação, o alongamento e o enraizamento *in vitro* de genótipos selecionados de *Eucalyptus dunnii*. O material genético utilizado no presente estudo foi coletado em áreas da empresa Stora Enso, localizadas no município de Alegrete - RS, em povoamentos comerciais de *Eucalyptus dunnii* de cerca de três anos de idade, originados do plantio de sementes. Decorridos 60 dias do abate das árvores, foram coletadas brotações de 10 genótipos selecionados, das quais foram isoladas estacas. No Laboratório, foram isolados segmentos caulinares em três posições nas estacas: ápice, porção intermediária e base, os quais foram avaliados em procedimentos de desinfestação superficial com hipoclorito de sódio. Foram testados diferentes tempos de imersão neste desinfestante a 1,5% e, em outro experimento, diferentes concentrações na imersão durante 10 minutos. Posteriormente, foi avaliado o desempenho dos genótipos no estabelecimento *in vitro*. Na etapa de multiplicação foram avaliadas concentrações do regulador de crescimento 6-Benzilaminopurina (BAP). Na etapa de alongamento realizaram-se dois experimentos, um utilizando ácido giberélico (GA_3) em concentrações variáveis na presença de Ácido alfa-Naftaleno Acético (ANA) e BAP, e outro utilizando apenas ANA e BAP. Na fase de enraizamento foram realizados dois experimentos, um utilizando AIB no meio nutritivo e outro, com tratamento pulso de AIB e, após, plantio em copos plásticos contendo vermiculita e meio líquido, para aclimatização das estacas em sala de cultivo. Foi possível o estabelecimento *in vitro* satisfatório de seis genótipos, sendo a oxidação fenólica e a contaminação as principais causas do fracasso de alguns genótipos. Na multiplicação, BAP, na faixa de concentração entre 0,25 e 0,75 mg L⁻¹ (1,11 e 3,33 µM), influencia positivamente a formação de gemas por explante, ocorrendo um comportamento variado no comprimento e número de gemas por explante conforme o genótipo. No alongamento há também influência genotípica e a utilização de ANA na concentração de 0,5 mg L⁻¹ (2,69 µM) associada a BAP promove o maior alongamento das brotações. A utilização de GA_3 no meio de alongamento pode ser dispensada, pois além de não promover o alongamento das brotações causa a formação de calos. AIB adicionado ao meio nutritivo ½ MS não tem efeito no enraizamento *in vitro* de microestacas de *Eucalyptus dunnii*. O emprego de vermiculita associado a meio nutritivo ½ WPM líquido, após tratamento pulso com solução de AIB promove a indução de raiz em algumas estacas, podendo ser considerado em estudos adicionais.

Palavras-chave: micropropagação, cultura de tecidos, propagação vegetativa, silvicultura.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Post-Graduation Course in Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria

MULTIPLICATION *in vitro* GENOTYPES OF *Eucalyptus dunnii* MAIDEN

AUTHOR: MARCIO CARLOS NAVROSKI
ADVISOR: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER
Defense Place and Date: Santa Maria, February 28nd, 2011.

Eucalyptus is a genus of great importance to the economy and production of various goods. Among the species of this genus, *Eucalyptus dunnii* Maiden stands out the importance, especially for the states of southern Brazil, to present a good growth and resistance to frost. However, this species presents problems for the production of seedlings by cloning, mainly due to the difficulty of rooting. The objective of this research was to assess methodologies for surface disinfection, establishment, multiplication, elongation and rooting *in vitro* of selected genotypes of *Eucalyptus dunnii*. The genetic material used in this study were collected in areas of the company Stora Enso, in the county of Alegrete - RS in commercial stands of *Eucalyptus dunnii* about three years old, originated from the planting of seeds. After 60 days, harvested, shoots were collected from 10 selected genotypes, which were isolated from cuttings. In the laboratory, stem segments were isolated at three positions on the cuttings: top, middle and base portion, which were evaluated in procedures for surface disinfection with sodium hypochlorite. We tested different immersion times in disinfest 1.5% and in another experiment, different concentrations of immersion for 10 minutes. Subsequently, we evaluated the performance of genotypes in *in vitro* establishing. During multiplication were evaluated concentrations of the growth regulators 6-benzylaminopurine (BAP). At the elongation step there were two experiments, one using gibberellic acid (GA₃) in varying concentrations in the presence of alpha-Naphthalene acetic acid (NAA) and BAP, and another using only NAA and BAP. In the rooting phase two experiments were conducted, using an IBA in nutrient medium and another pulse treatment with IBA and vermiculite in a liquid medium, the rooted cuttings were acclimatized in plastic cups. As a result it was possible to establish satisfactory six genotypes, and the phenol oxidation and contamination of the main causes of non-establishment of some genotypes. In the multiplication, BAP in a concentration range between 0.25 and 0.75 mg L⁻¹ (1.11 and 3.33 µM), positively influences the formation of buds, there is a behavior varied depending on genotype. At the elongation is also genotypic influence and the use of NAA at 0.5 mg L⁻¹ (2.69 µM) plus BAP promotes the greatest elongation of shoots. The use of GA₃ in the nutritive medium of elongation may be waived, because don't promote elongation of the shoots and cause the formation of callus. AIB added to the ½ MS nutritive medium has no effect on *in vitro* rooting of *Eucalyptus dunnii*. for the use of vermiculite associated with ½ WPM liquid nutritive medium after treatment pulse with solution of IBA promote root induction in some cuttings and may be considered in further studies.

Keywords: micropropagation, tissue culture, vegetative propagation, forestry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Visão de plantio comercial de *Eucalyptus dunnii*, com aproximadamente três anos de idade, utilizado na seleção de genótipos superiores para a realização dos experimentos. Alegrete-RS, 2009..... 23
- Figura 2 – Genótipo de *Eucalyptus dunnii* selecionado e abatido para indução de brotações e posterior coleta de material vegetal. Alegrete-RS, 2009..... 24
- Figura 3 – A - Aplicação semanal de fungicida nas brotações das árvores selecionadas para posterior coleta de material vegetal. B - Brotações emitidas após 60 dias do abate das árvores selecionadas para coleta de material vegetal para a realização dos experimentos. Alegrete-RS. 2010..... 25
- Figura 4 – Brotações de *Eucalyptus dunnii* utilizadas para a retirada de estacas e, posteriormente, para o isolamento de explantes. Posição de coleta correspondente ao 3º e o 4º par de folhas do ápice em direção à base. Alegrete - RS. 2010..... 25
- Figura 5 – Excisão das estacas de *Eucalyptus dunnii* (A) com o auxilio de bisturi, ficando com tamanho aproximado de 1,5 – 2,0 cm de comprimento (B) para posterior transporte até o Laboratório. Alegrete - RS. 2010..... 26
- Figura 6 – Contaminação fúngica (%) em segmentos caulinares de *Eucalyptus dunnii* após a desinfestação superficial em cinco tempos diferentes de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1,5%, após 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010..... 34
- Figura 7 – Contaminação bacteriana (%) em segmentos caulinares apicais, basais e intermediários de *Eucalyptus dunnii* submetidos a diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio, após 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010..... 35
- Figura 8 – Contaminação fúngica (%) em segmentos caulinares de *Eucalyptus dunnii* após a desinfestação superficial em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio durante 10 minutos, após 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010..... 37
- Figura 9 – Contaminação bacteriana (%) em explantes de *Eucalyptus dunnii* coletados em três posições da estaca submetidos a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, durante 10 minutos, após 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010..... 39
- Figura 10 – Segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* inoculados em meio nutritivo MS, objetivando-se o estabelecimento *in vitro*. Santa Maria, RS. 2010..... 45
- Figura 11 - Aspecto de brotações de *Eucalyptus dunnii* com hiperhidridicidade. As setas indicam brotações com hiperhidridicidade. Santa Maria-RS/UFSM, 2010..... 55
- Figura 12 - Segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* apresentando hiperhidridicidade (%) após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ½ MS acrescido de diferentes concentrações de BAP. Santa Maria-RS/UFSM, 2010..... 59
- Figura 13 - Número de gemas por explante em seis genótipos de *Eucalyptus dunnii*, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ½ MS acrescido de diferentes concentrações de BAP. Santa Maria-RS/UFSM, 2010..... 61

Figura 14 – Culturas de <i>Eucalyptus dunnii</i> com presença de calos na base, caule e folhas (setas) durante a fase de alongamento <i>in vitro</i> em meio de cultura ½MS com adição de 0,8 mg L ⁻¹ (2,30 µM) de GA ₃ após 30 dias de cultivo. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.....	65
Figura 15 - Número de brotações alongadas por explante em genótipos de <i>Eucalyptus dunnii</i> , aos 30 dias após a inoculação, em função dos tratamentos de GA ₃ . Santa Maria-RS/UFSM, 2010.....	68
Figura 16 – Comprimento médio das brotações alongadas (mm) de genótipos de <i>Eucalyptus dunnii</i> , aos 30 dias após a inoculação, em função dos tratamentos de GA ₃ . Santa Maria-RS/UFSM, 2010.....	69
Figura 17 - Brotações de <i>Eucalyptus dunnii</i> apresentando formação de calos (%) após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo ½ MS acrescido de diferentes concentrações de GA ₃ . Santa Maria-RS/UFSM, 2010.	72
Figura 18 – A: Brotações alongadas de <i>Eucalyptus dunnii</i> cultivadas em meio nutritivo ½ MS na ausência de GA ₃ . B: Culturas com presença de calos (setas) e ausência de brotações alongadas cultivadas no meio de nutritivo ½ MS na presença de GA ₃ , durante 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> na fase de alongamento. Santa Maria/RN, UFSM, 2010.....	72
Figura 19 - Número de brotações emitidas por explante em <i>Eucalyptus dunnii</i> após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo ½ MS acrescido de diferentes concentrações de ANA. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.	76
Figura 20 - Comprimento médio das brotações alongadas por explante em <i>Eucalyptus dunnii</i> após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de cultura ½ MS acrescido de diferentes concentrações de ANA. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.	77
Figura 21 – Explantes de <i>Eucalyptus dunnii</i> em fase de alongamento apresentando estruturas calogênicas (%) após 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio de cultura ½ MS acrescido de diferentes concentrações de ANA. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.	78
Figura 22 – Microestacas de <i>Eucalyptus dunnii</i> 沿adas e prontas para a indução ao enraizamento <i>in vitro</i> . Santa Maria-RS/UFSM, 2010.....	82
Figura 23 – Microestacas alongadas de <i>Eucalyptus dunnii</i> em processo de indução ao enraizamento em meio nutritivo ½ MS suplementado com carvão ativado e diferentes concentrações de AIB. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.....	83
Figura 24 – Microestacas de <i>Eucalyptus dunnii</i> em processo de indução ao enraizamento em meio nutritivo ½WPM e vermiculita, após tratamento pulso na presença de diferentes concentrações de AIB. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.....	85
Figura 25 - Microestacas de <i>Eucalyptus dunnii</i> (genótipo 2) enraizadas em meio nutritivo ½WPM líquido e vermiculita, após tratamento pulso com 2,0 mg L ⁻¹ (9,84 µM) de AIB durante 24 horas. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.	87
Figura 26 - Microestacas de <i>Eucalyptus dunnii</i> (genótipo 3) enraizadas em meio nutritivo ½WPM líquido e vermiculita, após tratamento pulso com 4,0 mg L ⁻¹ (19,70 µM) de AIB durante 24 horas. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.	88
Figura 27- Microestacas de <i>Eucalyptus dunnii</i> aclimatizadas em copos plásticos em substrato composto por vermiculita, Plantmax® e casca de arroz carbonizada. A-Microestaca do genótipo 3. B - Microestaca do genótipo 2. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado da análise de variância para contaminação fúngica (%) e bacteriana (%) em três diferentes explantes de <i>Eucalyptus dunnii</i> submetidos a diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio e, após, 15 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.....	32
Tabela 2 – Média das contaminações fúngicas (%) em função da posição de coleta de explantes de <i>Eucalyptus dunnii</i> , após 15 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo MS Santa Maria-RS/UFSM, 2010.....	33
Tabela 3 – Resultado da análise de variância para a contaminação fúngica (%) e bacteriana (%) em três diferentes explantes de <i>Eucalyptus dunnii</i> submetidos a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, após 15 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio nutritivo MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.....	36
Tabela 4 – Média das contaminações fúngicas (%) em função da posição de coleta na estaca de explantes de <i>Eucalyptus dunnii</i> cultivados em meio nutritivo MS, após 15 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Santa Maria-RS/UFSM, 2010.....	37
Tabela 5 - Resultados da análise de variância para estabelecimento <i>in vitro</i> (%), oxidação fenólica (%) e contaminação geral (%) em segmentos nodais de diferentes genótipos de <i>Eucalyptus dunnii</i> cultivados em meio nutritivo MS, aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Santa Maria-RS/UFSM, 2010.....	47
Tabela 6 - Médias de estabelecimento <i>in vitro</i> (%), oxidação fenólica (%) e contaminação geral (%) de segmentos nodais de diferentes genótipos de <i>Eucalyptus dunnii</i> cultivados em meio nutritivo MS, aos 30 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Santa Maria-RS, UFSM, 2010.....	49
Tabela 7 - Resultados da análise de variância para contaminação geral (%), explantes com hiperhidricidade (%) e número de gemas axilares por explante na multiplicação <i>in vitro</i> de seis genótipos de <i>Eucalyptus dunnii</i> submetidos a diferentes concentrações de BAP, após 30 dias de cultivo em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.....	57
Tabela 8 - Médias de contaminação geral (%) em segmentos nodais de seis diferentes genótipos de <i>Eucalyptus dunnii</i> submetidos a diferentes concentrações de BAP, após 30 dias de cultivo em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS na fase de multiplicação <i>in vitro</i> . Santa Maria-RS/UFSM, 2010	58
Tabela 9 - Resultado da análise de variância para número de brotações alongadas por explante (NB), comprimento médio de brotações (CMB) e porcentagem de formação de calos em segmentos nodais de seis genótipos de <i>Eucalyptus dunnii</i> submetidos a diferentes concentrações de GA ₃ , após 30 dias de cultivo em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.....	67
Tabela 10 – Formação de calos (%) em genótipos de <i>Eucalyptus dunnii</i> aos 30 dias de cultivo em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.....	71
Tabela 11 - Resultados da análise de variância para número de brotações alongadas por explante (NB), comprimento médio de brotações (CMB) e formação de calos (%) no alongamento <i>in vitro</i> de seis genótipos de <i>Eucalyptus dunnii</i> submetidos a diferentes concentrações de ANA, cultivados em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS, aos 30 dias de avaliação. Santa Maria-RS/UFSM, 2010	73

Tabela 12 – Número de brotações alongadas por explante, comprimento médio (mm) das brotações e formação de calos (%) em genótipos de *Eucalyptus dunnii* cultivados em meio nutritivo ½ MS, aos 30 dias de avaliação. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

..... 74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REVISÃO GERAL	18
2.1 <i>Eucalyptus dunnii</i> Maiden.....	18
2.2 Biotecnologia Florestal.....	19
2.2.1 Cultura de tecidos vegetais	20
2.2.1.1 Micropropagação.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS (GERAL).....	23
3.1 Coleta e Preparo do Material Genético	23
4 CAPITULO I	
DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>Eucalyptus dunnii</i> MAIDEN COLETADOS EM TRÊS POSIÇÕES NA ESTACA.....	27
4.1 Resumo	27
4.2 Abstract	28
4.3 Introdução	28
4.4 Material e Métodos.....	29
4.4.1 Coleta e preparo do material vegetal.....	29
4.4.2 Desinfestação e inoculação dos explantes	30
4.4.3 Variáveis- resposta avaliadas.....	31
4.4.4 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	31
4.5 Resultados e discussão.....	32
4.5.1 Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio na desinfestação superficial de explantes de <i>Eucalyptus dunnii</i>	32
4.5.2 Efeito da concentração de hipoclorito de sódio na desinfestação superficial de explantes de <i>Eucalyptus dunnii</i>	35
4.6 Conclusões	40
5 CAPITULO II	
ESTABELECIMENTO <i>in vitro</i> DE SEGMENTOS NODAIS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE <i>Eucalyptus dunnii</i> MAIDEN.....	41
5.1 Resumo	41
5.2 Abstract	41
5.3 Introdução	42
5.4 Materiais e Métodos	44
5.4.1 Desinfestação superficial e inoculação dos explantes.....	44
5.4.2 Condições de cultivo	45
5.4.3 Variáveis-resposta avaliadas.....	46

5.4.4 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	46
5.5 Resultados e discussão.....	46
5.6 Conclusões	50
6 CAPITULO III	
MULTIPLICAÇÃO <i>in vitro</i> DE SEGMENTOS NODAIS DE <i>Eucalyptus dunnii</i>	51
6.1 Resumo	51
6.2 Abstract	52
6.3 Introdução	52
6.4 Material e Métodos.....	54
6.4.1 Variáveis-resposta avaliadas.....	55
6.4.2 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	55
6.5 Resultados e discussão.....	56
6.6 Conclusões	61
7 CAPÍTULO IV	
ALONGAMENTO <i>in vitro</i> DE GEMAS DE <i>Eucalyptus dunnii</i> MAIDEN.....	62
7.1 Resumo	62
7.2 Abstract	63
7.3 Introdução	63
7.4 Material e Métodos.....	64
7.4.1 Efeito de GA ₃ , ANA e BAP no alongamento <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Eucalyptus dunnii</i>	65
7.4.2 Efeito de ANA e BAP no alongamento <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Eucalyptus dunnii</i>	66
7.4.3 Análises estatísticas.....	66
7.5 Resultados e discussão.....	66
7.5.1 Efeito de GA ₃ , ANA e BAP no alongamento <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Eucalyptus dunnii</i>	66
7.5.2 Efeito de ANA e BAP no alongamento <i>in vitro</i> de segmentos nodais de <i>Eucalyptus dunnii</i>	73
7.6 Conclusões	78
8 CAPÍTULO V	
ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO <i>in vitro</i> DE MICROESTACAS DE <i>Eucalyptus dunnii</i> MAIDEN	79
8.1 Resumo	79
8.2 Abstract	80
8. 3 Introdução	80
8.4 Material e métodos	82
8.4.1 Efeito de AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de microestacas de <i>Eucalyptus dunnii</i> em meio nutritivo ½ MS.....	82

8.4.2 Efeito do tratamento pulso com AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>Eucalyptus dunnii</i> em meio nutritivo ½ WPM	84
8.4.3 Análises estatísticas.....	85
8.4.4 Aclimatização das microestacas de <i>Eucalyptus dunnii</i>	86
8.5 Resultados e discussão.....	86
8.5.1 Efeito do AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de brotações alongadas de <i>Eucalyptus dunnii</i> em meio nutritivo ½ MS	86
8.5.2 Efeito do tratamento pulso com AIB no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>Eucalyptus dunnii</i>	86
8.5.3 Aclimatização	89
8.6 Conclusões	89
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1 INTRODUÇÃO GERAL

A silvicultura brasileira ocupa, atualmente, uma posição de destaque no cenário mundial devido às condições ambientais favoráveis ao crescimento das florestas, principalmente do gênero *Eucalyptus*, e aos programas de pesquisa em melhoramento genético e manejo silvicultural, que vêm proporcionando ganhos significativos em produtividade e qualidade da madeira de florestas plantadas.

A indústria de papel e celulose, dentre outros segmentos do setor florestal, é a que mais se destaca nesse panorama, o que coloca o Brasil em posição de maior produtor mundial de celulose de fibra curta de *Eucalyptus* e, ainda, torna este um dos principais produtos de exportação do país (ABRAF, 2010).

O plantio de árvores com objetivo de produção de madeira aliado à preservação ambiental surge como alternativa para minimizar questões econômicas e ambientais em algumas regiões. Dentre as espécies mais plantadas está o eucalipto; entretanto, a falta de opções de espécies deste gênero tolerantes a geadas é uma das limitações para a expansão de seu cultivo na região sul do Brasil. *Eucalyptus dunnii* Maiden se apresenta como alternativa potencial para o empreendedor florestal nestes casos, em função de exibir tolerância a esse tipo de estresse abiótico e também apresentar crescimento rápido e excelente forma, além de possuir boas qualidades tecnológicas da madeira, principalmente para a produção de papel e celulose. Apresenta desempenho similar a *Eucalyptus viminalis*, amplamente testado em locais de ocorrência deste fenômeno climático (LEITE et al., 1973). Outra característica que traz destaque à espécie é seu reduzido potencial invasivo, decorrente da escassa produção de sementes, o que dificulta sua propagação aleatória (BILLARD; LALLANA, 2005). Além disso, essa reduzida produção de sementes dificulta, em muito, a produção de mudas pela via sexual. Alternativamente, devem ser pesquisados métodos de propagação assexuada, dentre os quais vem se sobressaindo, nos últimos anos, a micropropagação.

O mercado globalizado e competitivo tem exigido que as empresas do setor busquem, cada vez mais, ganhos em produtividade e qualidade dos seus produtos, além da redução dos custos de produção. Neste sentido, a busca por espécies/clones que conciliem desenvolvimento florestal com qualidade da madeira e rendimento no processo de conversão à celulose e papel; e a seleção de genótipos resistentes a pragas e doenças, tolerantes a alguns

fenômenos meteorológicos, têm sido constantes nos programas de pesquisa (CARDOSO et al., 2002).

Reflorestamento de alta produtividade com madeira de boa qualidade e a um custo compatível depende diretamente da qualidade das mudas empregadas para esse fim. Nesse sentido, o primeiro passo consiste na produção de mudas que apresentem características tais que propiciem uma boa sobrevivência no campo e garantam um rápido crescimento da floresta. Assim, uma das principais maneiras de se conseguir mudas de qualidade adequada é por meio da propagação vegetativa (FONSECA, 2000).

A propagação clonal ou vegetativa consiste na produção de novos indivíduos a partir de uma única planta doadora, utilizando-se, para isso, partes da planta como ramos, gemas, estacas, folhas, células, raízes e outros (HARTMANN et al., 1997). Cada planta individualmente produzida é, em princípio, geneticamente idêntica à planta-mãe, justificando-se sua adoção em programas de produção de mudas homogêneas das empresas florestais (PAIVA et al., 1996).

As principais razões do uso da clonagem em espécies florestais incluem fixação de genótipos superiores (HARTMANN et al., 1997), maior uniformidade e produtividade dos plantios (ASSIS, 1996), adaptação de clones específicos a determinados sítios (XAVIER; COMÉRIO, 1996), racionalização das atividades operacionais, redução nos custos de exploração e de transporte (FERREIRA, 1992), melhoria da qualidade da madeira e de seus produtos (BERTOLUCCI; PENCHEL, 1991), entre outras.

Apesar dos atributos apresentados por *Eucalyptus dunnii*, esta espécie apresenta dificuldades na produção de mudas por sementes. A propagação vegetativa, pela técnica de micropopulação, pode auxiliar a superar tais dificuldades, ao efetuar-se a multiplicação de genótipos desejados por meio de explantes isolados a partir de brotações dessas árvores. Isso resultará na produção de mudas de boa qualidade e, consequentemente, de indivíduos superiores, além de uma maior produção de madeira.

Entretanto, certos clones de *Eucalyptus dunnii* têm apresentado dificuldade de enraizamento por meio da estaquia, o que tem sido atribuído à maturação do material vegetal, levando à adoção de técnicas de reversão ao estado juvenil, mediante a utilização de ferramentas da biotecnologia, como a micropopulação. Esta técnica revelou-se eficiente no rejuvenescimento de propágulos para constituição de jardins microclonais (HARTMANN et al., 1997). Dentre as principais vantagens da técnica estão o aumento nos índices de enraizamento, a qualidade da muda produzida e a operacionalização (TITON, 2001).

Considerando a importância da propagação clonal de *Eucalyptus* na silvicultura clonal intensiva e a carência de estudos nesta área, torna-se justificável o desenvolvimento de pesquisas que envolvam *Eucalyptus dunnii*. O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar metodologias para a desinfestação superficial, o estabelecimento, a multiplicação, o alongamento e o enraizamento *in vitro* de genótipos selecionados de *Eucalyptus dunnii*.

O trabalho está dividido em cinco capítulos, organizados de acordo com objetivos específicos, a saber:

- no capítulo I, avaliou-se a desinfestação superficial de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* coletados em três posições nos ramos e submetidos a diferentes tempos de imersão e concentrações de hipoclorito de sódio – NaOCl - visando o seu estabelecimento *in vitro*;
- no capítulo II, avaliou-se o estabelecimento *in vitro* de diferentes genótipos de *Eucalyptus dunnii*;
- no capítulo III, foram avaliadas concentrações da citocinina 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de genótipos que obtiveram sucesso na fase de estabelecimento;
- no capítulo IV, realizaram-se dois experimentos relacionados à fase de alongamento *in vitro*, empregando-se concentrações de Ácido Giberélico (GA₃) na presença de ANA e BAP ou apenas de ANA e BAP;
- no capítulo V, dedicado ao enraizamento *in vitro*, foram avaliadas diferentes concentrações de Ácido 3-Indolbutírico (AIB) em meio de cultura MS reduzido à metade da concentração de sais - ½ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e, em outro experimento, foram testados o meio de cultura WPM líquido reduzido à metade da concentração de sais - ½ WPM (LLOYD; McCOWN, 1981) e vermiculita, em tratamentos pulso de AIB. Os resultados da aclimatização das microestacas enraizadas *in vitro* foram incluídos neste capítulo.

2 REVISÃO GERAL

2.1 *Eucalyptus dunnii* Maiden

Eucalyptus dunnii, pertencente à família Myrtaceae, apresenta distribuição natural limitada à região de Coffs Harbour, nordeste de New South Wales e sul de Queensland, na Austrália. Devido à restrita área de ocorrência natural, é classificada como uma espécie rara, porém cada vez mais importante em plantios comerciais (THINLEY et al., 2005).

Na área de ocorrência natural, a precipitação média anual varia de 845 mm a 1.950 mm, com regime de chuvas no verão e um período de dois meses de estação seca. A temperatura média anual oscila de 14 °C a 18 °C, a temperatura máxima do mês mais quente de 24 °C a 29 °C, e a temperatura mínima do mês mais frio de -1 °C a 7 °C. A temperatura mínima absoluta nessa região varia de -5 °C a 10 °C (JOVANOVIC; ARNOLD; BOOTH, 2000).

Eucalyptus dunnii apresenta bom comportamento em áreas mais frias (JOVANOVIC; BOOTH, 2002), sendo o seu plantio indicado em regiões com temperaturas mínimas absolutas de até -5 °C, sob condições de aclimatação prévia por gradual redução de temperatura na estação fria, suportando até 22 geadas anuais (PALUDZYSZYN FILHO et al.; 2006).

A madeira de *Eucalyptus dunnii* é indicada para lenha, carvão, celulose, moirões, postes e madeira serrada. A sua densidade básica, aos oito anos de idade, foi estimada em 0,48 g cm⁻³. A análise da composição química mostrou 7,96% de extractivos totais, 7,07% de holocelulose e 21,34% de lignina, proporcionando, assim, melhor deslignificação de sua madeira, o que torna o processo de fabricação de celulose mais eficiente e econômico (HIGA, 1998). *Eucalyptus dunnii* apresenta valores maiores de densidade básica e rendimento depurado e menor porcentagem de lignina do que *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*, o que comprova a utilidade da madeira para celulose e demais usos (GONZAGA, 1983).

Quanto à tecnologia de produção de mudas da espécie a partir de sementes, foi registrada importante associação com micorrizas, apesar desta espécie produzir poucas sementes. Em relação à propagação vegetativa, a espécie também apresenta certas limitações. *Eucalyptus dunnii*, assim como outras espécies de mesmo gênero, apresenta dificuldades na

propagação vegetativa devido ao baixo índice de enraizamento (PALUDZYSZYN FILHO et al., 2006). Isso está de acordo com o registro de que a maioria das espécies resistentes ao frio apresentam recalcitrância ao enraizamento (ASSIS; MAFIA, 2007), o que pode dificultar ainda mais o processo de clonagem.

Por outro lado, a espécie apresenta alta capacidade de rebrota, com 94,3% de cepas brotadas, o que potencializa o uso dos brotos como fonte de material rejuvenescido para estaquia (GRAÇA; TOTH, 1990). No entanto, o uso de estaquia como método de clonagem de *Eucalyptus dunnii* é dificultado, pois, além da baixa porcentagem de enraizamento, a espécie apresenta alta variabilidade na capacidade rizogênica, entre as procedências e até entre indivíduos da mesma procedência. A fim de acelerar os programas de melhoramento dessa espécie, tem sido recomendada a seleção de matrizes que apresentam alta capacidade de enraizamento (COOPER; GRAÇA, 1987, 1994).

Alguns estudos têm indicado que a propagação vegetativa por miniestaquia pode ser viável para a produção de mudas de *Eucalyptus dunnii*, sendo que esse método vem sendo empregado com sucesso para a produção massal de mudas de espécies de eucaliptos tropicais (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS, 2005).

A produção de mudas por micropropagação ainda é muito escassa, porque além de ser uma técnica mais cara que a miniestaquia, não existe um protocolo eficiente para a produção *in vitro* de mudas de *Eucalyptus dunnii*. A fase de enraizamento, em particular, é considerada a mais difícil para a obtenção de um protocolo eficiente, em função das características recalcitrantes desta espécie (BRONDANI, 2008).

2.2 Biotecnologia Florestal

Com a crescente compreensão da função ecológica das florestas para a sustentabilidade da vida no planeta e as possíveis consequências decorrentes da exploração indiscriminada de povoamentos naturais, os florestamentos e reflorestamentos encontram-se nas agendas de diversas nações (MURALIDHARAN; KALLARACKAL, 2004). Utilizar a biotecnologia para o ganho de produtividade aliado à sustentabilidade pode ser considerado uma das prioridades mundiais, já que a excessiva demanda por produtos oriundos de espécies vegetais, bem como o subsídio à sustentabilidade e à proteção do meio ambiente, necessitam destas técnicas para sua manutenção (WATANABE; RAMAN, 1997).

Nesse contexto, pode-se ressaltar que, de forma geral, os programas de melhoramento de essências florestais são, naturalmente, inibidos pelas dificuldades existentes no controle de processos de polinização e de fecundação; dificuldades na análise de descendentes e na necessidade de grandes áreas para o plantio. Adicionalmente, muitos anos são necessários para que as espécies atinjam sua maturidade reprodutiva e fenotípica, bem como inexistem mapas genéticos em muitas plantas arbóreas, os quais permitiriam a identificação de parentais adequados aos cruzamentos (RESENDE, 2001; TZFIRA et al., 1998). Entretanto, estas dificuldades vêm sendo superadas com o avanço da biotecnologia ligada ao melhoramento genético (MURALIDHARAN; KALLARACKAL, 2004).

A propagação vegetativa está entre os principais métodos de multiplicação de espécies florestais, a qual é extremamente vantajosa quando comparada à reprodução sexuada, pois permite reproduzir o componente genético total e, consequentemente, gerar maiores ganhos em uma mesma geração (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). As técnicas de cultura de tecidos vegetais, em particular, podem viabilizar a rápida multiplicação de linhagens elite em larga escala. Especialmente tratando-se de árvores, essas tecnologias permitem agilizar os processos, considerando os longos períodos de tempo necessários à multiplicação e à maturação das plantas (JAIN, 1997).

2.2.1 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos está ancorada na teoria da totipotência celular, a qual define a capacidade que a célula vegetal já diferenciada possui de voltar ao seu estado meristemático e após redefinir seu padrão de diferenciação (TERMIGNONI, 2005); ou, conforme Taiz; Zeiger (2004), a totipotência é a conservação da capacidade genética total para o desenvolvimento de uma planta completa.

Por meio da cultura de tecidos, fragmentos de tecidos vegetais vivos denominados “explantes” são retirados de plantas de interesse e cultivados em meio nutritivo definido, sob condições assépticas. Tais fragmentos podem ser compostos por células individuais, tecidos ou órgãos (SERAFINI et al., 2001).

Utilizam-se meios nutritivos específicos para que as plantas se desenvolvam no cultivo *in vitro*, com formulações que seguem as necessidades de cada vegetal. De maneira geral, os meios de cultura apresentam em sua composição, basicamente: macronutrientes,

micronutrientes, suplemento de ferro, vitaminas, água, fontes de carboidratos, mio-inositol e, quando necessário, reguladores de crescimento (DODDS; ROBERTS, 1995). Desta forma, aproximam-se as condições *in vitro* àquelas necessárias para que as plantas se desenvolvam no ambiente, tais como energia proveniente da luz, água, elementos minerais, entre outros (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os principais reguladores de crescimento utilizados são pertencentes aos grupos das auxinas, os quais controlam o alongamento celular e a rizogênese, entre outros processos (HINOJOSA, 2000); as citocininas, que são promotoras da divisão celular e da emissão de gemas adventícias (BARRUETO CID, 2000); e as giberelinas, responsáveis, principalmente, pelo alongamento de caules (MATSUMOTO, 2000).

Dentre as várias técnicas de cultura de tecidos de relevada importância, relacionam-se a micropopulação, a cultura de embriões, a polinização *in vitro*, a cultura de protoplastos e a microenxertia. No entanto, na área florestal, a micropopulação tem sido a técnica mais difundida e com aplicações práticas comprovadas (XAVIER, et al., 2009).

2.2.1.1 Micropopulação

Apesar de ser recente na área florestal, a micropopulação, encontra-se fortemente inserida nos programas de melhoramento, que, na maioria das vezes, objetivam a maximização ou a manutenção do valor genético do clone a ser propagado, permitindo, assim, acelerar os métodos convencionais de propagação vegetativa, entre outras finalidades (XAVIER, et al., 2009).

A micropopulação em *Eucalyptus* tem sido usada em três situações: 1) quando a espécie apresenta dificuldades de propagação pela macropropagação (estaquia, por exemplo); 2) quando a árvore selecionada não permite o uso satisfatório de outras técnicas de propagação vegetativa em seu resgate e multiplicação vegetativa; e 3) quando se deseja aumentar a taxa de propagação e abreviar o tempo para seu uso comercial (CHAMPERON, 1987).

A principal importância da micropopulação está na possibilidade de se propagar genótipos desejáveis sem a perda da árvore matriz, obtendo-se alta taxa de multiplicação com o uso da reversão à juvenilidade, reduzindo o tempo para obter-se o genótipo e estabelecendo-se alternativas à estratégia do melhoramento genético (GONÇALVES, 1982).

As principais formas de micropopulação através de cultura de estruturas organizadas são: cultura de meristemas, cultura de ápices caulinares, cultura de segmentos nodais, cultura de embriões e cultura de raízes isoladas. No eucalipto, os procedimentos convencionais de micropopulação se dão pela ativação de gemas axilares em cultura (MULLINS et al., 1997).

A micropopulação tem sido utilizada na área florestal para preservação do germoplasma, produção de indivíduos livres de pragas e doenças, rápida multiplicação em espaço reduzido, rejuvenescimento e produção de mudas selecionadas (XAVIER et al., 2009).

Normalmente, na propagação *in vitro* os reguladores de crescimento constituem-se numa primeira etapa a ser abordada, em que o modo de interação entre auxinas e citocininas é frequentemente dependente da espécie, da planta e do tipo de tecido utilizado na cultura (PEREZ; KERBAUY, 2005). A maneira complexa com que os reguladores de crescimento e as células interagem indica que, se o tecido não está em um estádio responsivo, não irá responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações estes reguladores são utilizados.

A utilização da micropopulação para a propagação de espécies e híbridos de *Eucalyptus* de alto valor comercial e de difícil enraizamento, como é o caso do *Eucalyptus dunnii*, foi recomendada por Ratnieks; Assis (1992).

3 MATERIAL E MÉTODOS (GERAL)

3.1 Coleta e Preparo do Material Genético

O material genético utilizado no presente estudo foi coletado em áreas da empresa Stora Enso, localizadas no município de Rosário do Sul - RS, em povoados comerciais (Figura 1) de *Eucalyptus dunnii* de cerca de três anos de idade, originados do plantio de sementes.

Foram escolhidas 10 árvores de altura e diâmetro superiores, apresentando em média 14,5 m de altura e 16,3 cm de DAP, com copas bem formadas e distribuídas no entorno do eixo, desprovidas de sintomas de deficiência nutricional ou hídrica e de ataques de pragas e doenças. As árvores selecionadas foram derrubadas (Figura 2), deixando-se uma cepa com cerca de 50 cm de altura.



Figura 1 – Visão de plantio comercial de *Eucalyptus dunnii*, com aproximadamente três anos de idade, utilizado na seleção de genótipos superiores para a realização dos experimentos. Alegrete-RS, 2009.



,Figura 2 – Genótipo de *Eucalyptus dunnii* selecionado e abatido para indução de brotações e posterior coleta de material vegetal. Alegrete-RS, 2009.

Na sequência, após o início das brotações, foi realizado um esquema de tratamento sanitário preventivo (Figura 3A) com a aplicação intercalada, semanalmente, dos fungicidas Captan® (Dicarboximida), a $2,4 \text{ g L}^{-1}$, e Benomyl® (Benzimidazol), a $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Decorridos 60 dias do abate das árvores foram coletadas as brotações (1 - 1,5 cm de comprimento) das árvores selecionadas (Figura 3B).



Figura 3 – A - Aplicação semanal de fungicida nas brotações das árvores selecionadas para posterior coleta de material vegetal. B - Brotações emitidas após 60 dias do abate das árvores selecionadas para coleta de material vegetal para a realização dos experimentos. Alegrete-RS. 2010.

As brotações foram coletadas nas primeiras horas da manhã, utilizando-se geralmente, o 3º e o 4º par de folhas do ápice em direção à base (Figura 4) posição geralmente utilizada para formar microestacas de *Eucalyptus*. Para a realização dos experimentos de desinfestação apresentados no capítulo I, utilizou-se três posições de coleta no ramo, conforme metodologia descrita no referido capítulo.

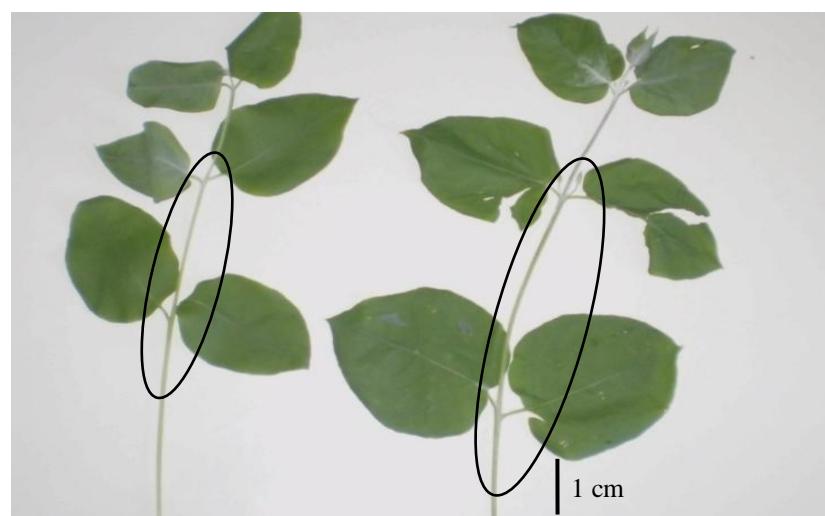


Figura 4 – Brotações de *Eucalyptus dunnii* utilizadas para a retirada de estacas e, posteriormente, para o isolamento de explantes. Posição de coleta correspondente ao 3º e o 4º par de folhas do ápice em direção à base. Alegrete - RS. 2010.

As estacas foram previamente excisadas a campo ficando com, aproximadamente, 1,5 – 2,0 cm de comprimento (Figura 5). A excisão foi efetuada com o auxilio de bisturi e, a seguir, as estacas foram acondicionadas em frascos de vidro contendo água estéril acrescida de ácido ascórbico a 1% (p/v) para minimizar o efeito da oxidação fenólica.

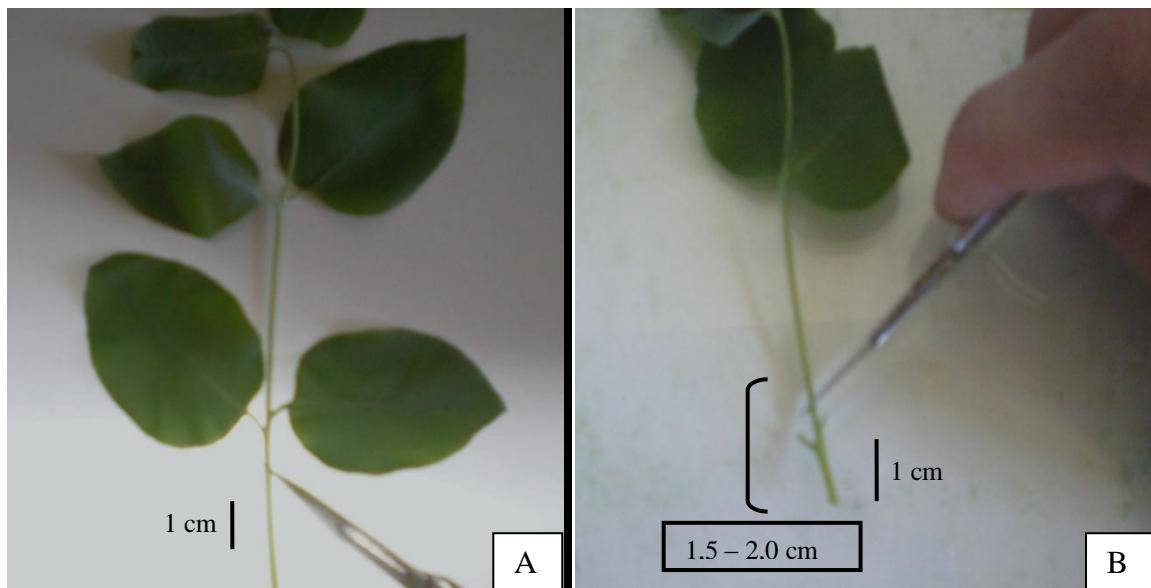


Figura 5 – Excisão das estacas de *Eucalyptus dunnii* (A) com o auxilio de bisturi, ficando com tamanho aproximado de 1,5 – 2,0 cm de comprimento (B) para posterior transporte até o Laboratório. Alegrete - RS. 2010.

Os frascos contendo as estacas foram colocados em caixa de isopor contendo gelo e transportados até o Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, localizado no Departamento de Fitotecnia, Prédio 77, Centro de Ciências Rurais, da Universidade Federal de Santa Maria. O tempo de transporte até o laboratório foi de aproximadamente 3 horas.

4 CAPITULO I

DESINFESTAÇÃO SUPERFICIAL DE SEGMENTOS NODAIS DE *Eucalyptus dunnii* MAIDEN COLETADOS EM TRÊS POSIÇÕES NA ESTACA

4.1 Resumo

A desinfestação de segmentos nodais em espécies lenhosas é a primeira etapa a ser considerada para a realização de um adequado estabelecimento *in vitro*. Os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo. O presente estudo objetivou avaliar o efeito de diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) e o efeito de diferentes concentrações deste agente na desinfestação superficial de explantes de *Eucalyptus dunnii* coletados em três posições nas estacas. As estacas foram coletadas de matrizes em campo, acondicionadas em frascos e transportadas até o Laboratório para a aplicação dos tratamentos. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se um esquema bifatorial 3 x 5. Quinze dias após a inoculação dos explantes foram avaliadas a contaminação fúngica e a bacteriana. No que diz respeito ao tempo de imersão em hipoclorito de sódio a 1,5%, o tempo de 15 minutos foi eficiente no controle de fungos independentemente da posição de coleta dos explantes nas estacas. Já em relação à contaminação bacteriana, a imersão em hipoclorito de sódio a 1,5% somente foi eficiente no controle desses micro-organismos em segmentos caulinares apicais. O aumento na concentração de hipoclorito de sódio provocou redução na contaminação fúngica, que atingiu em torno de 5,0% na presença de 2,0% do desinfestante. Explantes coletados na porção intermediária da estaca apresentaram a menor contaminação fúngica (15,94%). Quanto à contaminação bacteriana, o emprego de hipoclorito de sódio a 0,5% foi eficiente no controle nos explantes coletados na posição apical da estaca. Já em segmentos caulinares intermediários e basais, o uso de hipoclorito de sódio, mesmo na máxima concentração testada (2,0%), não foi eficiente no controle das contaminações bacterianas. A utilização de hipoclorito de sódio é de extrema importância no processo de desinfestação superficial de explantes oriundos de plantas matrizes de *Eucalyptus dunnii* cultivadas a campo. A contaminação fúngica é eficientemente controlada pela desinfestação mediante imersão dos segmentos caulinares de *Eucalyptus dunnii* em hipoclorito de sódio a 1,5% durante 15 minutos. A contaminação bacteriana é controlada de maneira eficiente em segmentos caulinares apicais de *Eucalyptus dunnii* pela imersão em hipoclorito de sódio a 1,5% durante 10 minutos. Em segmentos caulinares intermediários e basais, o controle da contaminação por bactérias pela imersão em hipoclorito de sódio, mesmo na máxima concentração testada (2,0%), não é eficiente.

Palavras-chave: assepsia, hipoclorito de sódio, contaminação microbiana.

4.2 Abstract

The desinfestation of nodal segments in woody species is the first step to being considered for the realization of a suitable in vitro establishment. Contamination levels tend to be higher when the plants are used as explant sources are from the field. This study aimed to evaluate the effect of different immersion times in sodium hypochlorite (NaOCl) and different concentrations of this agent in the surface desinfestation of explants of *Eucalyptus dunnii* collected at three positions in the cuttings. Cuttings were harvested from plants in the field, packed in flasks and transported to the Laboratory for treatment application. The experiments were conducted in a randomized design, using a 3 x 5 factorial scheme. Fifteen days after inoculation of the explants on nutritive medium it were evaluated bacterial and fungal contamination. In relation to the time of immersion in 1.5% sodium hypochlorite, time of 15 minutes was efficient in controlling fungus regardless of the position of collection of explants on the cuttings. In relation to bacterial contamination, immersion in 1.5% sodium hypochlorite was only efficient in controlling these microorganisms in apical shoot segments. The increase in the concentration of sodium hypochlorite caused a reduction in fungal contamination, which reached around 5.0% in the presence of 2.0% of this agent. Explants collected in the intermediate portion of the cuttings showed less fungal contamination (15.94%). In relation to bacterial contamination, the use of 0.5% sodium hypochlorite was effective in controlling the apical shoot segments collected at cuttings. Already in intermediate and basal shoot segments, the use of sodium hypochlorite, even at maximum concentration tested (2.0%) was not efficient in controlling bacterial contamination. The use of sodium hypochlorite is of extreme importance in the surface desinfestation of explants derived from plants of *Eucalyptus dunnii* cultivated in the field. Fungal contamination is efficiently controlled by desinfestation by immersion of the shoot segments of *Eucalyptus dunnii* in 1.5% sodium hypochlorite for 15 minutes. Bacterial contamination is controlled efficiently in apical shoot segments of *Eucalyptus dunnii* by immersion in sodium hypochlorite 1.5% for 10 minutes. In intermediate and basal shoot segments, control of bacterial contamination by immersion in sodium hypochlorite, even at maximum concentration tested (2.0%) is inefficient.

Keywords: asepsis, sodium hypochlorite, microbial contamination.

4.3 Introdução

A desinfestação de segmentos nodais em espécies lenhosas é a primeira etapa a ser considerada para a realização de um ótimo estabelecimento *in vitro* (PIERIK, 1990). Nesta fase, o objetivo principal é a desinfestação superficial do explante, buscando eliminar os contaminantes que possam interferir ou mesmo impedir o sucesso na propagação *in vitro* (XAVIER et al., 2009). Os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo. No entanto, mesmo as

plantas submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação são fontes potenciais de micro-organismos, os quais podem se tornar limitantes aos procedimentos de cultivo *in vitro* (MEDEIROS, 1999).

Na micropopulação, a alta taxa de multiplicação acelera os programas de propagação clonal e possibilita a clonagem de híbridos de *Eucalyptus* de alto valor e difícil enraizamento, sendo que um dos fatores mais críticos dessa técnica refere-se ao sucesso na fase de desinfestação dos explantes. A dificuldade maior nessa etapa reside em se obter tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte quando isolado. Neste sentido, pré-tratamentos aplicados à planta-matriz são determinantes para o sucesso do empreendimento. Várias substâncias com ação germicida são utilizadas para efetuar a desinfestação superficial dos explantes, destacando-se o etanol e os compostos à base de cloro (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Entretanto, para cada espécie e tipo de explante, o nível de contaminação, juntamente com a sensibilidade dos tecidos, determinará a melhor estratégia de ação e de produtos a serem utilizados para se obter sucesso (XAVIER et al., 2009).

Em brotos epicórmicos de 5 cm de comprimentos de plantas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* propagadas por estaca, foi obtido sucesso na desinfestação utilizando-se solução de detergente comercial a 3% (v/v) durante 15 minutos e, após, os explantes foram lavados em solução de Benlate® (1 g L^{-1}) durante 30 minutos. A seguir, em câmara de fluxo laminar, os brotos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) com acréscimo de Tween 20 a 0,01% (v/v) durante 15 minutos e lavados quatro vezes em água estéril (CORREIA et al., 1995).

Através do presente trabalho, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes tempos de imersão e diferentes concentrações de hipoclorito de sódio – NaOCl - na desinfestação superficial de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* coletados em três posições nas estacas, visando o seu estabelecimento *in vitro*.

4.4 Material e Métodos

4.4.1 Coleta e preparo do material vegetal

Os explantes utilizados para os dois experimentos de desinfestação superficial foram retirados de uma única árvore que possuía abundância de brotações, esta árvore passou pelo mesmo processo descrito anteriormente no capítulo 3.

Cada broto coletado em segmentos diferentes na estaca originou três explantes (cada um com 1 -1,5 cm de comprimento): segmento caulinar isolado da base do broto (segmento caulinar basal); segmento caulinar retirado do ápice do broto (segmento caulinar apical); e segmento caulinar intermediário, contendo o 3º e o 4º par de folhas do ápice em direção à base, posição geralmente utilizada para formar microestacas de *Eucalyptus*.

As brotações foram coletadas, acondicionadas em frascos de vidro contendo água estéril acrescida de ácido ascórbico a 1% (p/v) para minimizar o efeito da oxidação fenólica. Os frascos contendo as brotações foram colocados em caixa de isopor contendo gelo e transportados até o Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento, localizado no Departamento de Fitotecnia, Prédio 77, Centro de Ciências Rurais, da Universidade Federal de Santa Maria.

4.4.2 Desinfestação e inoculação dos explantes

No Laboratório, as estacas foram lavadas em água corrente, por cerca de 30 minutos, para promover-se a lixiviação de substâncias fenólicas e a redução de contaminantes superficiais. Após esta limpeza inicial, as estacas foram submersas em detergente neutro (1 ml L^{-1}), por 1 – 2 minutos, e, a seguir, enxaguadas com água estéril por vezes. Em seguida, foram excisadas as extremidades da estaca, cuidadosamente lavadas com água estéril; sendo desinfestados, de acordo com o tratamento descrito na sequência, os três tipos de explante, que apresentaram 1,0 – 1,5 cm de comprimento continham, pelo menos, um par de gemas axilares.

A desinfestação foi efetuada em capela de fluxo laminar, sendo os explantes imersos em solução de etanol a 70% (v/v), por 30 segundos, enxaguados com água estéril e, após, imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1,5% (v/v) em cinco tempos diferentes (0, 5, 10, 15 e 20 minutos) de imersão. Para a avaliação de concentração de hipoclorito de sódio foram utilizados cinco diferentes tratamentos (0; 0,5 ; 1; 1,5; e 2%) durante 10 minutos de imersão. Após a aplicação dos tratamentos de desinfestação, os segmentos nodais, intermediários e apicais foram lavados três vezes com água estéril e, imediatamente após, inoculados, na

posição vertical, em frascos com capacidade para 150 ml, contendo 30 ml do meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Ao meio nutritivo MS, foram adicionados 6 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose e o pH foi ajustado para 5,8. Na sequência, os frascos contendo o meio nutritivo foram autoclavados à temperatura de 121 °C (1,5 kgf cm⁻²) durante 20 minutos. O meio de cultura foi suplementado com 0,1 mg L⁻¹ (0,44 µM) de 6-Benzilaminopurina (BAP) e 0,01 mg L⁻¹ (0,05 µM) de Ácido alfa-Naftaleno Acético (ANA), recomendado por Alfenas et al. (2004). Adicionaram-se, ainda, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol e 250 mg L⁻¹ de Polivinilpirrolidona (PVP), com a finalidade de reduzir a oxidação fenólica.

4.4.3 Variáveis- resposta avaliadas

Quinze dias após a inoculação dos explantes foram avaliadas a porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana, determinadas mediante avaliação visual da presença de fungos e/ou bactérias no meio de cultura e/ou no explante.

4.4. 4 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os dois experimentos de desinfestação superficial foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 3 x 5, em que os níveis do fator “A” referiram-se às três posições de coleta dos explantes (basal, intermediária e apical). Na avaliação do tempo de imersão em hipoclorito de sódio, os níveis do fator “B” foram os seguintes: 0; 5; 10; 15; e 20 minutos de imersão neste agente desinfestante a 1,5% (v/v). Já na avaliação da concentração de hipoclorito de sódio, os níveis do fator “B” foram as concentrações 0; 0,5; 1;1,5; e 2%.

Após testar a normalidade dos dados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias, foram realizadas transformações pela função $\sqrt{x+0,5}$ e os dados foram submetidos à análise de variância. Quando o valor de “F” foi significativo, dados de tratamentos qualitativos tiveram as médias comparadas por meio do teste de Scott-Knott ao

nível de 5% de probabilidade de erro. Dados de tratamentos quantitativos foram submetidos à análise de regressão polinomial. A precisão do experimento foi medida por meio do coeficiente de variação (CV%). Os resultados apresentados são as médias originais obtidas. O programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000) foi utilizado para a análise estatística dos dados.

4.5 Resultados e discussão

4.5.1 Efeito do tempo de imersão em hipoclorito de sódio na desinfestação superficial de explantes de *Eucalyptus dunnii*

Em relação à contaminação fúngica houve efeito significativo para o tempo de imersão em hipoclorito de sódio e, também, para a posição de coleta dos explantes (Tabela 1). Já para a contaminação bacteriana, foi observada interação significativa entre os dois fatores principais.

Tabela 1 – Resultado da análise de variância para contaminação fúngica (%) e bacteriana (%) em três diferentes explantes de *Eucalyptus dunnii* submetidos a diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio e, após, 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

FV	GL	Contaminação Fúngica		Contaminação Bacteriana	
		QM	QM	QM	QM
Tempo de imersão (T)	4	3.018,53*		1.186,92*	
Posição de coleta (P)	2	546,60*		17.531,45*	
(T)*(P)	8	177,64 ^{ns}		619,52*	
Resíduo	0	170,20		230,05	
Média Cont.	-	14,21		35,55	
CV (%)	-	66,07		28,85	

^{ns} F não-significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro; * F significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Os explantes coletados nas posições intermediária e basal apresentaram maior contaminação fúngica, diferindo significativamente dos segmentos caulinares apicais, que registraram o menor valor entre as três posições estudadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Média das contaminações fúngicas (%) em função da posição de coleta de explantes de *Eucalyptus dunnii*, após 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

Posição de coleta	Contaminação Fúngica (%)
Apical	9,32 a*
Intermediária	14,65 b
Basal	18,64 b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

As menores contaminações médias por fungos foram observadas nos tempos de 15 e 20 minutos de imersão em hipoclorito de sódio a 1,5%, havendo o ajuste a uma equação linear (Figura 6). Pode-se, assim, considerar 15 minutos como o tempo suficiente para promover uma assepsia adequada dos segmentos caulinares de *Eucalyptus dunnii* no que diz respeito à contaminação fúngica.

A imersão em hipoclorito de sódio mesmo em tempos mais reduzidos foi responsável por um considerável controle de contaminantes fúngicos, reforçando a necessidade da realização de desinfestação superficial, principalmente quando se utilizam explantes oriundos de plantas cultivadas a campo, ratificando a afirmação de Alfenas (2004). Outros autores recomendaram a imersão em etanol a 70%, por 1 minuto, e em hipoclorito de sódio a 2%, durante 5 minutos, para a desinfestação de ápices caulinares de *Eucalyptus benthamii* (HANSEL et al., 2005).

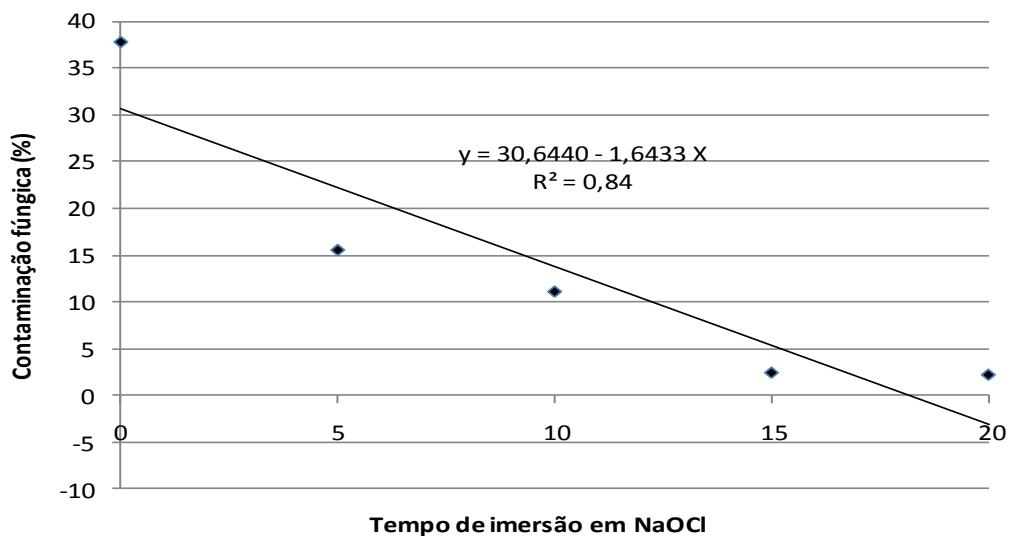


Figura 6 – Contaminação fúngica (%) em segmentos caulinares de *Eucalyptus dunnii* após a desinfestação superficial em cinco tempos diferentes de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1,5%, após 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

Em relação à contaminação bacteriana não foi possível o ajuste de uma equação para os segmentos caulinares apicais. Contudo, pode-se verificar que, a partir de 10 minutos de imersão, houve um efetivo controle de bactérias (Figura 7). Para segmentos caulinares intermediários e basais observou-se um comportamento linear decrescente, em que, mesmo na presença das maiores concentrações de hipoclorito de sódio testadas, a desinfestação superficial não foi eficiente, registrando-se elevadas porcentagens de contaminação por bactérias.

O emprego de concentrações mais altas do desinfestante, associado ou não à adição de bactericida no meio nutritivo, deve ser, adicionalmente, testado visando um controle efetivo da contaminação bacteriana nestes dois tipos de explantes.

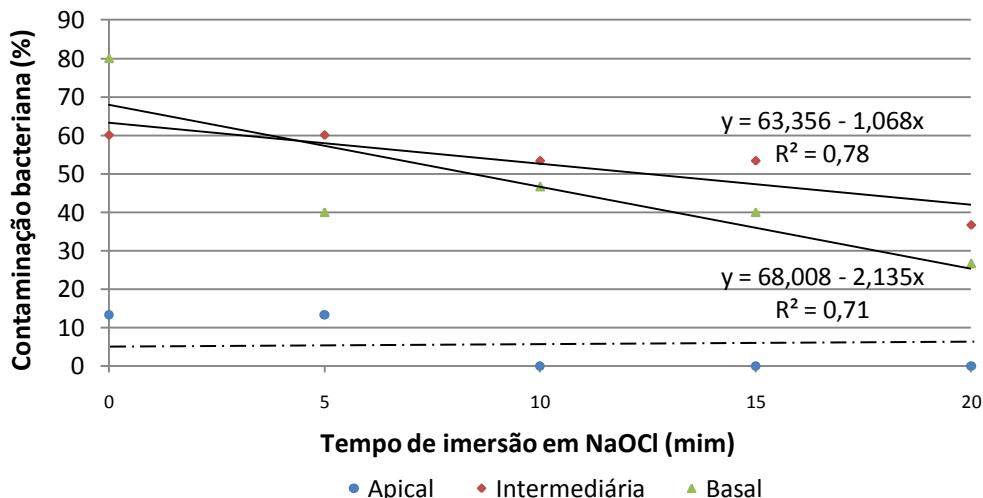


Figura 7 – Contaminação bacteriana (%) em segmentos caulinares apicais, basais e intermediários de *Eucalyptus dunnii* submetidos a diferentes tempos de imersão em hipoclorito de sódio, após 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

Percentuais de contaminação bacteriana inferiores aos registrados neste trabalho foram relatados por Almeida et al. (2008), os quais observaram em torno de 10% de associação com esses micro-organismos no estabelecimento *in vitro* de explantes da posição intermediária de *Eucalyptus dunnii* após a utilização de imersão em 1,5% de hipoclorito de sódio durante 10 minutos. A condição sanitária das matrizes doadoras dos explantes poderia, talvez, explicar essas diferenças observadas.

4.5.2 Efeito da concentração de hipoclorito de sódio na desinfestação superficial de explantes de *Eucalyptus dunnii*

Em relação à contaminação fúngica houve efeito significativo para os fatores principais posição de coleta na estaca e concentração de hipoclorito de sódio (Tabela 3). Já para a contaminação bacteriana foi observada interação significativa entre os dois fatores principais.

Tabela 3 – Resultado da análise de variância para a contaminação fúngica (%) e bacteriana (%) em três diferentes explantes de *Eucalyptus dunnii* submetidos a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, após 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

FV	GL	Contaminação Fúngica		Contaminação Bacteriana	
		QM	QM	QM	QM
Posição de coleta (P)	2	845,02*		21.137,20*	
Concentração hipoclorito de sódio (C)	4	1.733,37*		1.315,12*	
(P)*(C)	8	83,89 ^{ns}		929,15*	
Resíduo	60	250,90		192,43	
Média	-	19,97		34,19	
CV (%)	-	62,6		26,4	

^{ns} F não-significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro; * F significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Diferindo do que foi observado no experimento anterior, os explantes coletados na porção intermediária do ramo apresentaram a menor contaminação fúngica (15,94%), enquanto aqueles retirados da base e do ápice dos brotos não diferiram entre si e foram os mais contaminados por fungos (Tabela 4).

Considerando-se que não houve interação significativa entre os fatores principais, pode-se afirmar que a desinfestação dos segmentos caulinares apicais necessita de uma concentração maior de hipoclorito e um tempo de imersão também maior para ser mais eficiente, como ocorreu no experimento anterior.

Tabela 4 – Média das contaminações fúngicas (%) em função da posição de coleta na estaca de explantes de *Eucalyptus dunnii* cultivados em meio nutritivo MS, após 15 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

Posição de coleta	Contaminação Fúngica (%)
Apical	17,98 b*
Intermediária	15,94 a
Basal	26,64 b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Em relação à concentração de hipoclorito de sódio, houve um ajuste linear negativo (Figura 8): quanto maior a concentração de hipoclorito de sódio, menor a contaminação fúngica. A ausência de hipoclorito de sódio resultou em elevada contaminação fúngica, em níveis superiores a 35,0%. Com a utilização deste agente desinfestante a contaminação diminuiu, atingindo um valor próximo a 5,0% na presença de hipoclorito de sódio a 2,0% .

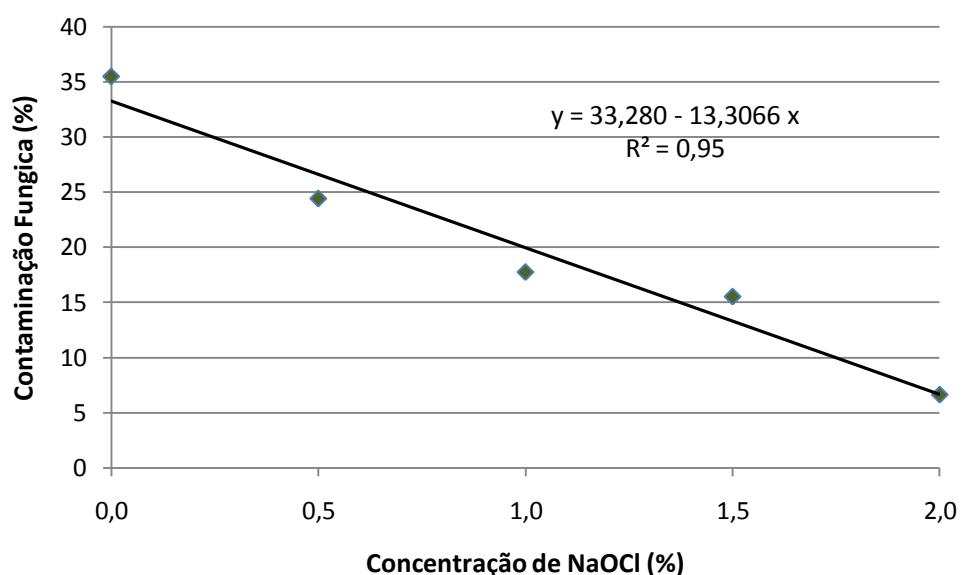


Figura 8 – Contaminação fúngica (%) em segmentos caulinares de *Eucalyptus dunnii* após a desinfestação superficial em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio durante 10 minutos, após 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

Percentuais de contaminação por fungos mais elevados que os verificados neste trabalho foram relatados por Brondani (2008), que observou 41,3% de contaminação fúngica no estabelecimento *in vitro* de explantes oriundos do 2º - 4º par de brotos do ápice para a base (posição intermediária) de *Eucalyptus dunnii x Eucalyptus benthamii* após a imersão em hipoclorito de sódio a 1% durante 15 minutos. O referido autor considerou que a contaminação fúngica foi o fator que causou a maior perda de material nesta fase da micropropagação.

Na contaminação bacteriana não foi possível o ajuste da equação para os segmentos caulinares apicais. Nas posições intermediária e basal observou-se um comportamento linear decrescente (Figura 9). A posição apical de coleta dos explantes apresentou a menor ocorrência de bactérias, não verificando-se a ocorrência destes micro-organismos na presença de hipoclorito de sódio.

A reduzida ou até ausência de contaminação em explantes da posição apical é provavelmente decorrente da presença de tecidos mais jovens, com menor tempo de exposição aos micro-organismos no meio natural, nos explantes coletados nos ápices das estacas. Na ausência de hipoclorito de sódio houve 13,32% de contaminação por bactérias. Mesmo a menor concentração testada (0,5%) foi suficiente para o controle bacteriano em explantes coletados na posição apical. É importante ressaltar que explantes provenientes dessa região da estaca são vulneráveis à oxidação fenólica e que a utilização de concentrações altas de hipoclorito de sódio pode incrementar tal fenômeno. Por conseguinte, a utilização de 0,5% poderá, simultaneamente, minimizar o efeito oxidativo e controlar a infestação por bactérias. Entretanto, há que se considerar, também, os efeitos negativos que uma redução na concentração de hipoclorito de sódio irá acarretar no controle da contaminação fúngica.

A contaminação bacteriana com a utilização de explantes coletados na região intermediária dos ramos foi elevada na ausência de hipoclorito de sódio, e diminuiu com a utilização deste agente desinfestante. Com a máxima concentração de hipoclorito de sódio testada (2%) observou-se uma redução considerável na contaminação por esses micro-organismos (19,98%). A presença de bactérias tende a diminuir com o aumento na concentração de hipoclorito de sódio, sendo bastante elevada sem a utilização deste desinfestante.

Os explantes da região basal do ramo demonstraram comportamento semelhante àqueles da posição intermediária, diminuindo o percentual de contaminação bacteriana com o aumento da concentração de hipoclorito de sódio. Entretanto, na ausência de hipoclorito de

sódio estes explantes apresentaram valores menores de contaminação em comparação aos segmentos da região intermediária.

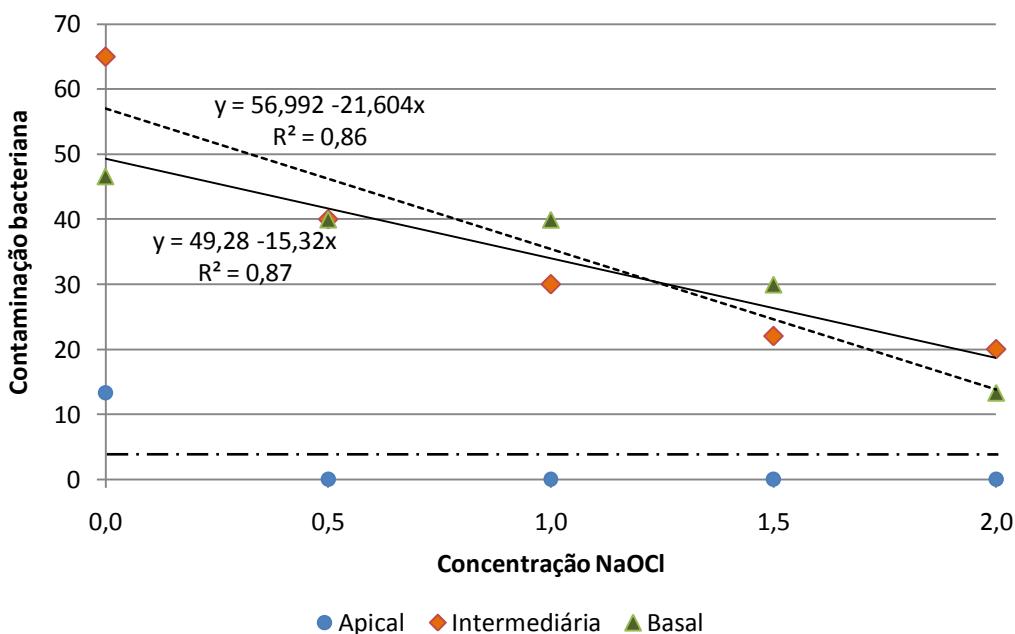


Figura 9 – Contaminação bacteriana (%) em explantes de *Eucalyptus dunnii* coletados em três posições da estaca submetidos a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, durante 10 minutos, após 15 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

A concentração e o tempo de exposição aos desinfetantes dependem do material vegetal, e diferentes partes da planta apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos. Uma desinfestação eficiente pode eliminar os micro-organismos sem causar danos ou morte aos tecidos (GEORGE, 1993).

A condição fitossanitária da planta determina a eficiência no processo de desinfestação dos explantes (LEIFERT et al., 1991). A utilização de fungicidas de contato permite a eliminação ou a redução da presença de fungos exógenos. Nesse sentido, os agentes sistêmicos são os mais indicados por apresentarem amplo espectro de ação, possibilitando o controle de fungos de natureza endógena, os quais não são expostos aos agentes utilizados na desinfestação superficial dos explantes (HALDEMAN et al., 1987).

Embora tenha sido obtida redução na contaminação dos explantes de *Eucalyptus dunnii* em condições *in vitro*, através do aumento na concentração de hipoclorito de sódio e no tempo de imersão, as percentagens de contaminação mantiveram-se altas, principalmente em explantes das regiões basal e intermediária. O tratamento ainda no campo com antibióticos poderia, talvez, auxiliar na diminuição dos níveis de contaminação bacteriana (LEIFERT et al., 1991).

4.6 Conclusões

A utilização de hipoclorito de sódio é de extrema importância no processo de desinfestação superficial de explantes oriundos de plantas matrizes de *Eucalyptus dunnii* cultivadas a campo.

A contaminação fúngica é eficientemente controlada pela desinfestação mediante imersão dos segmentos caulinares de *Eucalyptus dunnii* em hipoclorito de sódio a 1,5% durante 15 minutos.

A contaminação bacteriana é controlada de maneira eficiente em segmentos caulinares apicais de *Eucalyptus dunnii* pela imersão em hipoclorito de sódio a 1,5% durante 10 minutos.

Em segmentos caulinares intermediários e basais, o controle da contaminação por bactérias pela imersão em hipoclorito de sódio, mesmo na máxima concentração testada (2,0%), não é eficiente.

5 CAPITULO II

ESTABELECIMENTO *in vitro* DE SEGMENTOS NODAIS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE *Eucalyptus dunnii* MAIDEN

5.1 Resumo

Eucalyptus dunnii apresenta grande potencialidade para a produção de produtos madeiráveis e, principalmente, para a produção de celulose e papel nas regiões mais frias do Brasil. A micropopulação é uma técnica promissora para viabilizar a produção de mudas uniformes e de elevada qualidade genética, fisiológica e sanitária dessa espécie. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o estabelecimento *in vitro* de diferentes genótipos de *Eucalyptus dunnii*. Os explantes foram oriundos de matrizes cultivadas a campo, selecionadas em função de características superiores. Essas árvores foram abatidas e suas cepas produziram brotações que, após coletadas, foram acondicionadas em frascos e transportadas até o laboratório para a realização da desinfestação superficial, isolamento e estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de 1-1,5 cm de comprimento contendo 1 a 2 gemas axilares, coletados em 10 genótipos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, cada uma constituída de três explantes por frasco. Os genótipos de números 3, 6 e 7 apresentaram estabelecimento *in vitro* superior a 70%. Os demais genótipos apresentaram estabelecimento entre 40 e 6,6%. Os genótipos que apresentaram o maior estabelecimento foram aqueles que, simultaneamente, tiveram as menores oxidação fenólica e contaminação microbiana. Os genótipos de *Eucalyptus dunnii* apresentam comportamento diferenciado em relação ao estabelecimento *in vitro*. A contaminação microbiana e a oxidação fenólica são fatores que comprometem o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de genótipos de *Eucalyptus dunnii*.

Palavras-chave: cultura de tecidos, contaminação microbiana, oxidação fenólica.

5.2 Abstract

Eucalyptus dunnii presents great potential for the production of timber and mainly for the production of pulp and paper in the colder regions of Brazil. Micropopagation is a promising technique to enable the production of seedlings uniform, high quality genetic,

physiological and sanitary of this species. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* establishment of different genotypes of *Eucalyptus dunnii*. The explants were cultured from breeders in the field, selected on the basis of superior characteristics. These trees were felled and their strains produced shoots, which, after collected were packed in flasks and transported to the laboratory for the realization of surface disinfection, isolation and *in vitro* establishment of nodal segments of 1-1.5 cm long containing 1 to 2 axillary buds collected from 10 genotypes. The experiment was conducted in a randomized design with five replicates, each consisting of three explants per flask. The genotypes 3, 6 and 7 showed *in vitro* establishment of more than 70%. In other genotypes the *in vitro* establishment was between 40 and 6.6%. The genotypes that presented the largest establishment were those that simultaneously had the lowest phenolic oxidation and microbial contamination. The genotypes of *Eucalyptus dunnii* present differently in relation to the *in vitro* establishment. Microbial contamination and phenolic oxidation are factors that compromise the *in vitro* establishment of nodal segments of genotypes of *Eucalyptus dunnii*.

Keywords: tissue culture, microbial contamination, phenolic oxidation.

5.3 Introdução

O *Eucalyptus*, pelo seu elevado ritmo de crescimento e adaptabilidade a variadas condições de solo e clima, passou há várias décadas a ser considerado um dos mais importantes gêneros utilizados em reflorestamento de rápido crescimento no mundo (SEVERO; TOMASELLI, 2000).

A silvicultura clonal com *Eucalyptus* constitui uma das mais evoluídas e bem estabelecidas, sendo uma realidade na maioria das empresas florestais brasileiras. Permite, dentre outras vantagens, a uniformização dos plantios, a maximização dos ganhos em produtividade e qualidade da madeira e a melhor adaptação dos clones à área a ser plantada, além do aproveitamento de combinações híbridas específicas, aliadas à racionalização das atividades operacionais e custos competitivos (ALFENAS et al., 2004; ASSIS et al., 2004).

A micropropagação apresenta-se como técnica promissora para viabilizar a clonagem massal de *Eucalyptus*, a qual apresenta dificuldades de enraizamento pela propagação por estaquia, principalmente no que envolve material adulto (ALFENAS et al., 2004; ASSIS et

al., 2004). *Eucalyptus dunnii* é reconhecidamente recalcitrante ao enraizamento de estacas, especialmente em relação ao material adulto, dificultando o aproveitamento dos benefícios da clonagem (ALFENAS et al., 2004; ASSIS; MAFIA, 2007). Desta forma, técnicas alternativas como a propagação *in vitro*, visando o rejuvenescimento de clones com material vegetativo em fase adulta, podem ser promissoras para viabilizar a propagação vegetativa da espécie e seus híbridos.

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

A micropropagação pela proliferação de gemas axilares compreende as fases de estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro*, e enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*, além de aclimatação *ex vitro* (GEORGE; DEBERGH, 2008; XAVIER et al., 2007). O estabelecimento *in vitro* inicia-se com o manejo das plantas matrizes e a seleção dos explantes mais adequados para a micropropagação e termina com a obtenção de uma cultura livre de contaminantes e suficientemente adaptada às condições *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Nesta fase, a oxidação fenólica (SHARMA; RAMAMURTHY, 2000), a contaminação por fungos e bactérias e a recalcitrância de alguns materiais genéticos têm sido os principais problemas encontrados (GEORGE, 2008).

Uma série de fatores influencia o sucesso da micropropagação, como o genótipo, o estado fisiológico da planta-matriz, a seleção, a coleta e o tipo de explante, a assepsia utilizada, o meio de cultura (nutrientes, vitaminas, carboidratos, dentre outros), as concentrações e tipos de reguladores de crescimento, as condições de incubação (fotoperíodo, luminosidade e temperatura) e a habilidade do operador (HARTMANN et al., 2002; GEORGE; DEBERGH, 2008).

O estado fisiológico da planta matriz tem grande influência no posterior comportamento das culturas *in vitro*. Plantas bem nutridas, sem sintomas de deficiência nutricional ou hídrica geralmente fornecem explantes melhores. Outro aspecto refere-se à condição fitossanitária das plantas matrizes, pois irá determinar a facilidade em descontaminar o explante durante o isolamento, principalmente quanto à contaminação endógena (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Considerando-se a importância que *Eucalyptus dunnii* representa, atualmente, para o setor florestal, em especial na produção de celulose e papel, e também a carência de estudos

quanto à propagação clonal desta espécie, o estudo da resposta ao estabelecimento *in vitro* de genótipos selecionados com vistas ao rejuvenescimento clonal fundamenta a sua pertinência.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a desinfestação superficial e o estabelecimento *in vitro* de diferentes genótipos de *Eucalyptus dunnii*.

5.4 Materiais e Métodos

5.4.1 Desinfestação superficial e inoculação dos explantes

As estacas, utilizadas como fonte de explantes, foram coletadas de diferentes árvores a campo, representando dez diferentes genótipos, numerados de 1 a 10.

No Laboratório, as estacas foram lavadas em água corrente, por cerca de 30 minutos, para promover-se a lixiviação de substâncias fenólicas e a redução de contaminantes superficiais. Após essa limpeza inicial, as estacas foram submersas em detergente neutro (1 ml L^{-1}), por 1 – 2 minutos, e, a seguir, enxaguadas várias vezes com água estéril. Após essa etapa, foram excisados segmentos nodais com 1,0 – 1,5 cm de comprimento e que continham, pelo menos, um par de gemas axilares, os quais foram cuidadosamente lavados com água estéril.

A desinfestação superficial foi efetuada em capela de fluxo laminar, sendo os explantes imersos em solução de etanol a 70% (v/v), por 30 segundos, enxaguados com água estéril e, após, imersos em solução de hipoclorito de sódio - NaOCl (1,5%; v/v), durante 10 minutos. Após, os segmentos nodais e apicais foram lavados três vezes com água estéril e, imediatamente após, inoculados na posição vertical (Figura 10), em frascos com capacidade para 150 ml, contendo 30 ml do meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). previamente autoclavado

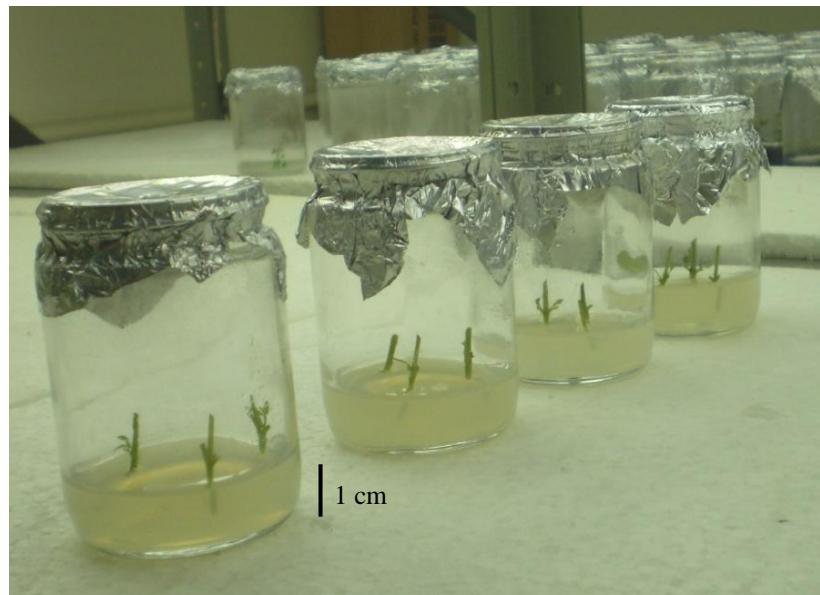


Figura 10 – Segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* inoculados em meio nutritivo MS, objetivando-se o estabelecimento *in vitro*. Santa Maria, RS. 2010.

Ao meio nutritivo MS, foram adicionados 6 g L^{-1} de ágar, 30 g L^{-1} de sacarose e o pH foi ajustado para 5,8. Na sequência, os frascos contendo os meios nutritivos foram autoclavados à temperatura de 121°C ($1,5 \text{ kgf cm}^{-2}$) durante 20 minutos. O meio de cultura foi suplementado com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,4 \mu\text{M}$) de 6-Benzilaminopurina (BAP) e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,05 \mu\text{M}$) de Ácido alfa-Naftaleno Acético (ANA), conforme recomendado por Alfenas et al. (2004). Adicionaram-se, ainda, 100 mg L^{-1} de mio-inositol e 250 mg L^{-1} de polivinilpirrolidona (PVP), com a finalidade de reduzir a oxidação fenólica.

5.4.2 Condições de cultivo

Após a inoculação dos explantes, os frascos foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia durante todo o experimento.

5.4.3 Variáveis-resposta avaliadas

Trinta dias após a inoculação dos explantes foi realizada a avaliação do estabelecimento *in vitro* (aparecimento de brotações) da oxidação fenólica (escurecimento dos explantes) e da contaminação geral (fúngica + bacteriana) sendo que foram verificadas contaminação bacteriana (presença de colônias bacterianas junto aos explantes) e contaminação fúngica (contaminações compostas por micélios fúngicos junto aos explantes), as quais foram registradas através de porcentagem.

5.4.4 Delineamento experimental e análises estatísticas

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, unifatorial, sendo considerado como fator os 10 genótipos, com cinco repetições, cada uma constituída por três segmentos nodais por frasco.

Após testar a normalidade dos dados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias, foram realizadas transformações pela função $\sqrt{x+0,5}$ e os dados foram submetidos à análise de variância. Quando o valor de “F” foi significativo, as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A precisão do experimento foi medida através da acurácia seletiva (AS%), calculada por $\sqrt{1 - 1/F_{cal}}$. Os resultados apresentados são as médias originais obtidas. O programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000) foi utilizado para a análise estatística dos dados.

5.5 Resultados e discussão

Os genótipos avaliados diferiram em relação ao estabelecimento *in vitro*, à oxidação fenólica e à contaminação geral. A acurácia seletiva (AS) foi elevada para o estabelecimento e oxidação fenólica, e moderada para a contaminação geral, conforme classificação de Resende; Duarte (2007). Para o estabelecimento *in vitro* e oxidação fenólica, os valores obtidos de

acurácia seletiva indicam alta correlação entre as características genotípicas e fenotípicas, o que permite depositar uma alta confiança na avaliação efetuada.

Tabela 5 - Resultados da análise de variância para estabelecimento *in vitro* (%), oxidação fenólica (%) e contaminação geral (%) em segmentos nodais de diferentes genótipos de *Eucalyptus dunnii* cultivados em meio nutritivo MS, aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

FV	GL	Estabelecimento (%)	Oxidação	Contaminação
			Fenólica (%)	(%)
Genótipo	9	3.980,9*	2.321,7*	2.431,0*
Resíduo	40	500,0	766,2	1.299,70
Média	-	37,96	48,63	29,98
AS	-	0,87	0,70	0,46

^{ns} F não-significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro; * F significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro; AS = acurácia seletiva, faixas: ≤ 0,5 (Baixa); 0,5 < AS 0,7 (Moderada); 0,7 < AS 0,9 (Alta); > 0,9 (Muito Alta).

Os genótipos 3, 6 e 7 apresentaram estabelecimento superior a 70% (Tabela 2), valor considerado satisfatório por se tratar de material proveniente de campo, em que a possibilidade de contaminação por micro-organismos é elevada. Além disso, deve-se considerar que o tempo relativamente elevado de transporte do campo até o Laboratório, aproximadamente 3 horas, facilita a oxidação fenólica dos explantes. Os demais genótipos apresentaram estabelecimento entre 40 e 6,6%, não diferindo estatisticamente entre si. Os genótipos 1, 5, 8 e 9 foram descartados da sequência do cultivo *in vitro* (multiplicação) em razão do reduzido número de explantes estabelecidos.

Os genótipos que apresentaram o maior estabelecimento foram aqueles que, simultaneamente, tiveram as menores taxas de oxidação fenólica e contaminação microbiana, o que explica, parcialmente, o seu sucesso. Além do efeito genotípico, a oxidação fenólica e a contaminação microbiana são responsáveis pelo maior ou menor estabelecimento *in vitro* dos explantes (TEIXEIRA, 2005; BASSAN, 2006).

Os resultados obtidos durante todo o processo de micropropagação, principalmente no estabelecimento das culturas, são diretamente influenciados pelo genótipo, sendo este um dos fatores mais limitantes no sucesso da propagação *in vitro*. Isto se deve à especificidade das espécies e clones, quanto ao meio nutritivo e às condições ambientais, controladas por fatores genéticos. Desta forma, ao se trabalhar com novos genótipos é necessário avaliar a resposta desses materiais ao cultivo *in vitro* e, posteriormente, fazer os ajustes necessários para otimizar o processo de micropropagação (GAHAN; GEORGE, 2008).

O estabelecimento *in vitro*, além da influência da contaminação e da oxidação fenólica é também influenciado pelo estado fisiológico da planta matriz, o qual apresenta grande influência no posterior comportamento das culturas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Esse fator pode ter influenciado na resposta dos genótipos quanto aos efeitos da contaminação microbiana, pois os explantes foram provenientes de cepas a campo, nos quais o estabelecimento *in vitro* é problemático em função de altas taxas de contaminação dos tecidos pelos micro-organismos presentes (ALFENAS et al., 2004).

Os genótipos que apresentaram menor oxidação fenólica (Tabela 6) foram aqueles que concentraram a maior porcentagem de estabelecimento e vice-versa. Os genótipos 7, 6 e 3 apresentaram as menores médias, obtendo valores inferiores a 30% de oxidação fenólica. Estes três genótipos diferiram dos demais genótipos testados.

A grande variação observada na oxidação, provavelmente, deve-se às diferenças existentes entre os genótipos, uma vez que as matrizes selecionadas para a obtenção dos explantes são originárias do plantio de mudas produzidas por sementes. Uma vez que a oxidação fenólica é altamente dependente do genótipo e do tipo de explante utilizado, explantes jovens, em geral, oxidam menos do que os mais velhos (TEIXEIRA, 2005). Características como o estado fitossanitário, o estresse hídrico e a deficiência nutricional podem, adicionalmente, contribuir para a formação e liberação de compostos fenólicos.

A oxidação fenólica é um fator comum no cultivo de espécies lenhosas, sendo estes compostos fenólicos, muitas vezes, produzidos em áreas injuriadas dos explantes (ANDRADE et al., 2000). Xavier et al. (2009) relataram que os compostos fenólicos são, de forma geral, precursores da síntese de lignina. Para Ledo et al. (2002), além de ferimentos e outros fatores inerentes ao explante, a oxidação pode ser provocada pelos compostos do meio nutritivo. Além disso, a atividade da fenilalanina amoniliase (PAL), enzima que atua no metabolismo de compostos fenólicos, é aumentada pela exposição de tecidos a injúrias (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Substâncias antioxidantes (como o ácido ascórbico) podem ser adicionadas à solução de armazenamento do material vegetal no momento de coleta e transporte. Igualmente podem ser adicionadas ao meio nutritivo, visando à redução deste evento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Ainda neste sentido, a forma de inoculação dos explantes e o nível de injúria provocado em seu preparo para a inoculação podem ser um fator de extrema importância no que se refere ao desenvolvimento das culturas e à oxidação. Contudo, poucos trabalhos relatam pesquisas referentes à forma de inoculação de explantes no cultivo *in vitro* de espécies florestais.

Tabela 6 - Médias de estabelecimento *in vitro* (%), oxidação fenólica (%) e contaminação geral (%) de segmentos nodais de diferentes genótipos de *Eucalyptus dunnii* cultivados em meio nutritivo MS, aos 30 dias de cultivo *in vitro*. Santa Maria-RS, UFSM, 2010.

Genótipo	Estabelecimento	Oxidação Fenólica (%)	Contaminação
7	80,0 a*	19,98 a	6,67 a
6	73,6 a	13,32 a	6,67 a
3	73,4 a	26,64 a	13,32 a
4	40,0 b	46,62 b	26,66 a
2	33,2 b	53,28 b	26,66 a
10	33,2 b	55,66 b	6,67 a
1	13,2 b	66,64 b	53,32 b
9	13,2 b	73,28 b	39,98 b
5	13,2 b	66,64 b	60,00 b
8	6,6 b	66,64 b	59,96 b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se à resposta desejada no cultivo *in vitro*.

Em relação à contaminação geral também foi observada diferença significativa, os genótipos 1, 9, 5 e 8 apresentaram altas taxas de contaminação, superior a 50%. A elevada contaminação destes genótipos pode explicar o baixo estabelecimentos obtidos por esses quatro genótipos.

Oxidação e contaminação elevadas contribuíram para o reduzido estabelecimento *in vitro* de alguns genótipos, como foi o caso dos genótipos 1, 9, 5 e 8, os quais foram descartados do processo de cultivo *in vitro* em razão do baixo índice de estabelecimento.

Explantes isolados de árvores elite de *Eucalyptus tereticornis* com quatro anos de idade também apresentaram grandes variações na contaminação por fungos e bactérias, na oxidação fenólica e na produção de brotos nos genótipos estudados em relação ao estabelecimento *in vitro* (SHARMA; RAMAMURTHY, 2000).

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

5.6 Conclusões

Os genótipos de *Eucalyptus dunnii* apresentam comportamento diferenciado em relação ao estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais.

A contaminação microbiana e a oxidação fenólica são fatores que comprometem o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de genótipos de *Eucalyptus dunnii*.

Os genótipos 7, 6 e 3 apresentam maiores taxas de estabelecimento *in vitro*, enquanto os genótipos 1, 9, 5 e 8 têm reduzido estabelecimento.

6 CAPITULO III

MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE SEGMENTOS NODAIS DE *Eucalyptus dunnii*

6.1 Resumo

A obtenção de uma alta taxa de multiplicação, de explantes livres de contaminantes, de gemas reativas e que produzam partes aéreas com qualidade suficiente para a fase seguinte é o que se deseja na multiplicação *in vitro*. Objetivou-se, com o presente trabalho, avaliar o efeito de diferentes concentrações da citocinina BAP associadas à auxina ANA na multiplicação *in vitro* de genótipos superiores de *Eucalyptus dunnii* que foram bem sucedidos no estabelecimento. Para a iniciação da fase de multiplicação, segmentos nodais contendo uma a duas gemas axilares, foram inoculados em meio nutritivo MS cuja concentração de sais foi reduzida à metade (1/2 MS), suplementado com BAP, conforme o tratamento, e 0,01 mg L⁻¹ (0,05 µM) de ANA. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 6 x 5, em que os níveis do fator “A” referiram-se aos diferentes genótipos e os níveis do fator “B”, às concentrações de BAP (0; 0,25; 0,50; 0,75; e 1,0 mg L⁻¹ –0; 1,11; 2,22; 3,33 e 4,44 µM). Foram utilizadas cinco repetições, cada uma contendo três explantes por frasco. Trinta dias após a inoculação dos explantes foram efetuadas as avaliações. A contaminação geral não foi afetada pelas concentrações de BAP, contudo sofreu influência dos genótipos. O genótipo 2 foi o que apresentou a maior contaminação (14,66%), diferindo significativamente dos demais, os quais apresentaram contaminação bastante reduzida, ou até mesmo nula. Na ausência de BAP não ocorreu a formação de estruturas com aspecto vítreo. A hiperhidridicidade começou a se manifestar a partir de 0,50 mg L⁻¹ (2,22 µM) de BAP, ajustando-se a uma função quadrática positiva conforme o aumento na concentração da citocinina. Constatou-se um comportamento polinomial quadrático na multiplicação de gemas dos seis genótipos estudados. A presença de BAP no meio de cultura resultou em efeito positivo na produção de gemas axilares em todos os genótipos avaliados, cuja as maiores médias foram observadas na presença dessa citocinina. Para os seis genótipos testados a faixa 0,25 – 0,75 mg L⁻¹ (1,11 – 3,33 µM) de BAP foi a que resultou em maior número de gemas axilares. Obteve-se um valor de acurácia seletiva muito alto para o número de gemas, alto para a hiperhidridicidade e moderado para o estabelecimento *in vitro* e contaminação microbiana. A contaminação geral dos segmentos nodais é influenciada pelos genótipos de *Eucalyptus dunnii*. A hiperhidridicidade dos segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* é afetada pela presença da citocinina BAP no meio nutritivo. A multiplicação de gemas axilares de *Eucalyptus dunnii* é afetada de maneira diferenciada nos genótipos pelas concentrações de BAP.

Palavras-chave: 6-Benzilaminopurina, formação de gemas axilares, contaminação microbiana, hiperhidridicidade.

6.2 Abstract

In the *in vitro* multiplication the objectives are achieving a high rate of propagation of explants free of contaminants, and produce reactive buds to get aerial parts of sufficient quality for the next phase of the culture. The objective of this study was to evaluate the effect of different BAP concentrations associated with NAA in the *in vitro* multiplication of superior genotypes of *Eucalyptus dunnii* that have been successful in the establishment. For the initiation phase of multiplication, nodal segments containing one or two axillary buds were inoculated on MS nutrient medium whose concentration of leaves was reduced by half (1/2 MS) supplemented with BAP, according to treatment, and 0.01 mg L⁻¹ (0.05 µM) NAA. We used a randomized design in a factorial scheme 5 x 6, where the levels of factor "A" referred to the different genotypes and the levels of factor B, the concentrations of BAP (0; 0.25; 0.50; 0.75 and 1.0 mg L⁻¹ – 0; 1.11; 2.22; 3.33 and 4.44 µM). We used five replicates, each containing three explants per vial. Thirty days after inoculation of explants were performed evaluations. The overall infection was not affected by concentrations of BAP, but was influenced by genotypes. Genotype 2 was the one with the highest contamination rate (14.66%), differing significantly from the others, which showed very low contamination, or even nil. In the absence of BAP did not occur with the formation of glassy structures. The hyperhydricity began to manifest from 0.5 mg L⁻¹ (2.22 µM) of BAP, adjusting to a positive quadratic function as the increase in the concentration of cytokinin. It found a quadratic behavior in the bud multiplication of the six genotypes. The absence of BAP in the culture medium resulted in no positive effect on the production of axillary buds in all genotypes, in contrast, the highest means were observed in the presence of cytokinin. For the six genotypes tested a range from 0.25 to 0.75 mg L⁻¹ (1.11 to 3.33 µM) of BAP was the one that resulted in a greater number of axillary buds. We obtained a value too high for selective accuracy the number of buds, high to moderate hyperhydricity and to establish *in vitro* and microbial contamination. Overall contamination of the nodal segments is influenced by the genotypes of *Eucalyptus dunnii*. The nodal segments hyperhydricity *Eucalyptus dunnii* is affected by the presence of BAP in the nutrient medium. The multiplication of axillary buds of *Eucalyptus dunnii* is affected differently in genotypes by concentrations of BAP.

Keywords: 6-Benzylaminopurin, formation of axillary buds, microbial contamination, hyperhydricity.

6.3 Introdução

Os objetivos principais da multiplicação na micropropagação são a obtenção de uma alta taxa de multiplicação com o mínimo de variação entre explantes, de explantes livres de contaminantes que prejudiquem a micropropagação, de gemas reativas e que produzam partes aéreas com qualidade suficiente para a fase seguinte. Assim, devem ser observadas as

questões de qualidade e quantidade de gemas que atendam aos objetivos a serem alcançados com o processo da micropopragação (XAVIER et al, 2009).

De modo geral, o sucesso desta fase é dependente da fase anterior (estabelecimento). Em espécies lenhosas, a seleção do explante mais adequado à cultura *in vitro* é de vital importância no sucesso da micropopragação, tendo em vista os efeitos do gradiente de maturidade (XAVIER et al, 2009).

O estado fisiológico da planta matriz tem grande influência no posterior comportamento das culturas *in vitro*. A morfogênese, o crescimento e as taxas de multiplicação *in vitro* podem ser melhoradas com um adequado pré-tratamento ambiental das plantas matrizes, particularmente quanto à nutrição e ao controle fitossanitário. Da mesma forma, o tipo de explante e a época de coleta podem ser determinantes na resposta *in vitro* (GEORGE; DEBERGH, 2008; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; HARTMANN, 2002).

A resposta de explantes em um sistema de cultivo *in vitro* também depende do genótipo do material colocado em cultura (GEORGE; DEBERGH, 2008; SOBROSA; CORDER, 2003). Normalmente, observa-se variabilidade clonal no comportamento *in vitro*: se, por um lado, ocorrem genótipos que se adaptam facilmente à condição *in vitro*, respondendo bem a vários meios de cultura; por outro, é frequente a necessidade de se otimizar meios de cultura com concentrações e hormônios para cada clone ou grupos de clones (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

As citocininas são indispensáveis para a quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares, sendo o tipo de citocinina e sua concentração os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. Na literatura, as concentrações de citocininas para multiplicação de *Eucalyptus* geralmente variam de 0,1 a 5,0 mg L⁻¹, e as concentrações de auxina são frequentemente baixas, se comparadas às citocininas, tendo em vista a manutenção do balanço auxina/citocinina menor que 1 (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Entretanto, devido a diferenças no comportamento das espécies, essas concentrações de reguladores de crescimento são variáveis.

De maneira geral, a cada subcultivo o explante passa por uma fase de crescimento e multiplicação exponencial, em que é observado o aumento da massa vegetal. Na etapa final, o explante inicia um processo de senescência, em função de diversos estresses como deficiência nutricional, falta de água no meio nutritivo, acúmulo de etileno e outros gases no frasco, além de barreiras físicas ao crescimento. Para cada genótipo em micropopragação, deve-se observar

seu crescimento para se determinar o período mais adequado de cada subcultivo, a fim de se obter a resposta desejada com a propagação *in vitro* (XAVIER et al, 2009).

Durante a micropropagação há vários fatores que podem causar problemas no cultivo *in vitro*. Assim, em todas as fases da micropropagação, a contaminação microbiana e a oxidação fenólica são problemas comumente enfrentados. Durante a fase de multiplicação e alongamento a hiperhidricidade é um evento comum, processo este que é identificado pelo aspecto vítreo da massa de calo e partes da planta em função do elevado teor de água em suas células e tecidos. Essas anormalidades fisiológicas e morfológicas afetam os processos de fotossíntese e trocas gasosas da planta, reduzindo a qualidade e o vigor dos explantes (ZIV, 1991).

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito de diferentes concentrações da citocinina BAP associada à auxina ANA na multiplicação *in vitro* de genótipos superiores de *Eucalyptus dunnii* que obtiveram o melhor resultado durante a fase de estabelecimento *in vitro*.

6.4 Material e Métodos

Para a iniciação da fase de multiplicação, foram utilizados segmentos nodais contendo uma a duas gemas axilares, provenientes dos genótipos 2, 3, 4, 6, 7 e 10 estabelecidos previamente *in vitro* foram inoculados, sob condições assépticas, em frascos com capacidade para 150 mL, contendo 30 mL de meio nutritivo MS reduzido à metade da concentração de sais ($\frac{1}{2}$ MS), suplementado com BAP, conforme o tratamento, e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,05 \mu\text{M}$) de ANA.

Ao meio nutritivo MS foram adicionados 6 g L^{-1} de ágar, 30 g L^{-1} de sacarose e 50 mg L^{-1} de mio-inositol. O meio nutritivo foi preparado utilizando-se água deionizada e o pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem e da adição do ágar. Na sequência, os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados a 121°C ($1,5 \text{ kgf cm}^{-2}$) por 20 minutos.

Os frascos contendo os explantes inoculados em meio nutritivo foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia durante todo o experimento.

6.4.1 Variáveis-resposta avaliadas

Trinta dias após a inoculação dos explantes foram avaliadas as seguintes variáveis: contaminação geral e explantes com hiperhidridicidade, expressas em percentagem; e número de gemas axilares formadas por explante. A contaminação geral foi determinada mediante avaliação visual da presença de fungos e bactérias no meio nutritivo e/ou no explante. A hiperhidridicidade foi analisada tendo como base o aspecto translúcido observado na massa de calos e partes de plantas, que apresentaram aspecto vítreo devido ao elevado teor de água em suas células e tecidos (Figura 11).



Figura 11 - Aspecto de brotações de *Eucalyptus dunnii* com hiperhidridicidade. As setas indicam brotações com hiperhidridicidade. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

6.4.2 Delineamento experimental e análises estatísticas

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se um esquema bifatorial 6×5 , em que os níveis do fator “A” referiram-se aos diferentes genótipos e os níveis do fator “B”, às concentrações de BAP ($0; 0,25; 0,50; 0,75$; e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ – $0; 1,11; 2,22; 3,33$ e $4,44 \mu\text{M}$). Foram utilizadas cinco repetições, cada uma contendo três

explantes por frasco, totalizando 150 unidades experimentais e 450 segmentos nodais introduzidos *in vitro*.

Após avaliar a normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias por meio do teste de Bartlett, os dados foram transformados pela função $\sqrt{x+0,5}$ e submetidos, após, à análise de variância. Quando o valor de “F” foi significativo, médias de tratamentos qualitativos foram submetidas à comparação de médias por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Médias de tratamentos quantitativos foram submetidas à análise de regressão polinomial, Os resultados apresentados são as médias originais obtidas. O programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000) foi utilizado para a análise estatística dos dados.

A precisão dos experimentos foi medida através da acurácia seletiva (AS%) calculada por $\sqrt{1-1/F_{cal}}$. Essa estatística, corresponde à correlação linear entre os valores genotípicos e fenotípicos, é estimada por $AS=(1-1/F)^{1/2}$, em que F é o valor do teste F para genótipo. A estatística AS não depende apenas da magnitude do erro experimental e do número de repetições, mas também da proporção entre as variações de natureza genética e residual associadas ao caráter em avaliação. Para valores de F menor do que um não existe AS e o experimento não tem utilidade. Para valores de F muito grande (tendendo ao infinito) os valores de AS tendem à unidade, casos em que existem diferenças significativas entre os genótipos (STORCK et al., 2010). Quanto maior a acurácia, maior a confiança na avaliação e nos valores genotípicos preditos com fins de seleção.

6.5 Resultados e discussão

Para a contaminação geral foi obtido efeito significativo apenas para o genótipo (Tabela 7). Comportamento contrário foi observado em relação à hiperhidridicidade, em que ocorreu influência apenas de BAP. O número de gemas axilares apresentou interação significativa entre o genótipo e BAP, ou seja, os genótipos apresentaram comportamento diferente quando se alterou a concentração de BAP no meio nutritivo.

Obteve-se um valor de acurácia seletiva muito alto para a variável número de gemas, alto para a contaminação microbiana e moderado para a hiperhidridicidade. Considerando-se que quanto maior a acurácia, maior é a confiança que se pode depositar na avaliação e nos

valores genotípicos preditos para fins de seleção, as variáveis avaliadas possuem valor diferenciado no que diz respeito à seleção de genótipos de *Eucalyptus dunnii* na multiplicação *in vitro*, em que se destacam o número de gemas e a contaminação geral como características passíveis de obtenção de ganho genético por seleção.

Tabela 7 - Resultados da análise de variância para contaminação geral (%), explantes com hiperhidricidade (%) e número de gemas axilares por explante na multiplicação *in vitro* de seis genótipos de *Eucalyptus dunnii* submetidos a diferentes concentrações de BAP, após 30 dias de cultivo em meio nutritivo ½ MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

FV	GL	Contaminação (%)	Hiperhidricidade (%)	Nº de gemas
Genótipo (G)	5	758,55*	319,93 ns	4,81*
BAP	4	285,15 ns	1951,46*	37,83*
(G)*BAP	20	191,83 ns	138,49 ns	1,85*
Resíduo	120	207,39	196,25	0,79
Média	-	3,55	5,33	2,71
AS	-	0,85	0,62	0,91

ns F não-significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro; * F significativo ao nível de 5% de probabilidade.

AS = acurácia seletiva, faixas: ≤ 0,5 (Baixa); 0,5 < AS 0,7 (Moderada); 0,7 < AS 0,9 (Alta); > 0,9 (Muito Alta).

A contaminação geral não foi afetada pelas concentrações de BAP, contudo sofreu influência dos genótipos. Conforme se pode observar na Tabela 8, o genótipo 2 foi o que apresentou a maior contaminação (14,66%), diferindo significativamente dos demais, os quais apresentaram contaminação bastante reduzida, ou até mesmo nula. Essa diferença entre genótipos quanto à contaminação *in vitro* provavelmente está relacionada à sanidade das plantas doadoras em campo ou ao próprio estado fisiológico destas árvores, sendo que esta característica influencia na susceptibilidade a pragas e doenças, e desta forma a posterior contaminação *in vitro*. Para Grattapaglia; Machado (1998), o estado fisiológico da planta de

onde são retirados os explantes apresenta grande influência no posterior comportamento das culturas *in vitro*.

Tabela 8 - Médias de contaminação geral (%) em segmentos nodais de seis diferentes genótipos de *Eucalyptus dunnii* submetidos a diferentes concentrações de BAP, após 30 dias de cultivo em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS na fase de multiplicação *in vitro*. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

Genótipo	Contaminação (%)
7	0,00 a*
4	1,33 a
6	1,33 a
3	1,33 a
10	2,66 a
2	14,66 b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Na ausência de BAP não ocorreu a formação de estruturas com aspecto hiperhídrico. A hiperhidricidade começou a se manifestar a partir de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,22 \mu\text{M}$) de BAP, ajustando-se a uma função quadrática positiva conforme o aumento na concentração da citocinina. Em torno de 20% dos explantes apresentaram aspecto vítreo na presença de 1 mg L^{-1} ($4,44 \mu\text{M}$) dessa citocinina (Figura 12).

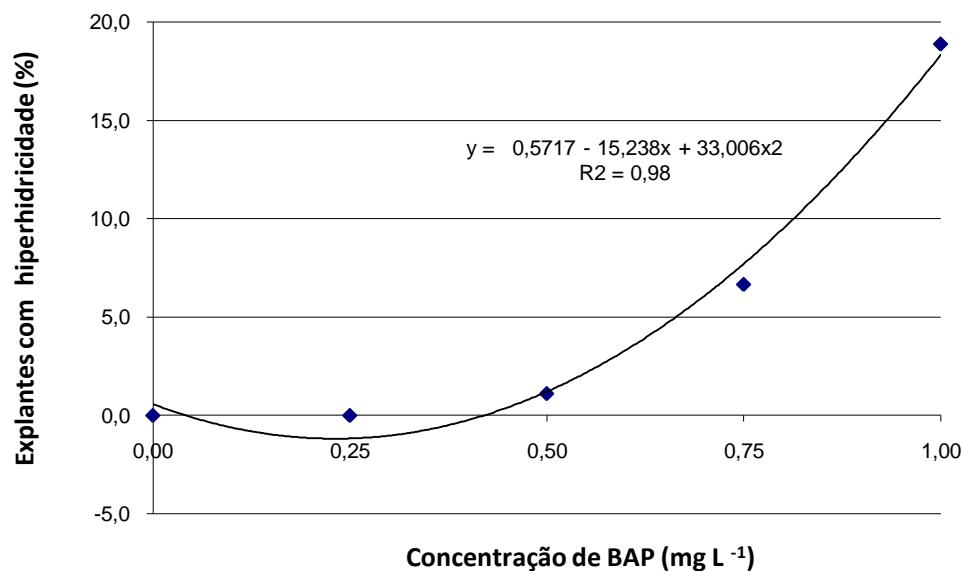


Figura 12 - Segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* apresentando hiperhidricidade (%) após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ½ MS acrescido de diferentes concentrações de BAP. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

Sintomas de hiperhidricidade em brotos do híbrido *Eucalyptus dunnii* x *Eucalyptus benthamii* na fase de multiplicação foram igualmente observados por Brondani et al. (2009) com o emprego de 1 mg L⁻¹ (4,44 µM) de BAP.

Para Paek et al. (1991), a hiperhidricidade nas brotações de plantas cultivadas *in vitro* pode ser influenciada por muitos fatores, dentre os quais a adição de citocinina ao meio de cultura, o que está de acordo com os resultados observados no presente trabalho. A hiperhidricidade pode ser consequência também da exposição a baixas irradiâncias luminosas e/ou altas temperaturas, ligada à concentração de ágar no meio de cultura e à razão nitrato: amônio no meio (HAN, et al., 1991). O controle da umidade relativa do ar no frasco também é importante na obtenção de plantas sem sintomas de hiperhidricidade (GRIBBLE, 1999).

Aos 30 dias após a inoculação dos explantes nos frascos, constatou-se um comportamento polinomial quadrático na multiplicação de gemas dos seis genótipos estudados (Figura 13). O genótipo 7 formou o maior número de gemas por explante; na concentração 0,25 mg L⁻¹ (1,11 µM) de BAP observaram-se 5,33 gemas. Com o acréscimo na concentração de BAP observou-se uma diminuição no número de gemas emitidas por explante.

A máxima eficiência técnica (MET) para o genótipo 7 seria obtida com a concentração 0,53 mg L⁻¹ (2,36 µM) de BAP, atingindo 5 gemas por explante. Para o genótipo 3, o maior número de gemas (4,26) foi obtido com 0,75 mg L⁻¹ (3,33 µM) de BAP. A MET para o genótipo 3 seria obtida com a concentração 0,56 mg L⁻¹ (2,49 µM) de BAP, obtendo-se 4,21 gemas por explante. Acima de 0,75 mg L⁻¹ houve grande diminuição no número de gemas para os dois genótipos.

Comportamento semelhante foi verificado no genótipo 6. Este apresentou o maior número de gemas (4,33) na concentração 0,25 mg L⁻¹ (1,11 µM) de BAP, seguindo-se uma redução no número de gemas com o aumento na concentração de BAP no meio de cultura.

Dentre os seis genótipos estudados, os de número 2 e 10 foram os que apresentaram as menores médias: 2,45 e 2,41 gemas por explante, respectivamente. O genótipo 2 apresentou baixo número de gemas na ausência de BAP, e na presença de ≥ 0,75 mg L⁻¹ (3,33 µM) de BAP. A utilização de 0,25 mg L⁻¹ (1,11 µM) de BAP promoveu a maior formação de gemas para este genótipo. Resultado semelhante foi observado para o genótipo 10, entretanto o aumento na concentração de BAP não foi tão prejudicial na formação de gemas quanto para o genótipo 2.

O genótipo 4 apresentou o melhor resultado (3,93) com a utilização de 0,75 mg L⁻¹ (3,33 µM) de BAP, ocorrendo redução com a concentração de 1 mg L⁻¹ (4,44 µM) de BAP. Semelhante aos outros genótipos, o número de gemas tendeu a diminuir com o aumento de BAP para 1 mg L⁻¹ (4,44 µM).

A ausência de BAP no meio de cultura não resultou em efeito positivo na produção de gemas em todos os genótipos avaliados, ao contrário, as maiores médias foram observadas na presença desta citocinina. Isso está de acordo com o que afirmaram Grattapaglia; Machado (1998): as citocininas são indispensáveis para a quebra de dormência apical e para a indução e proliferação de gemas axilares. Para estes autores, o tipo e concentração de citocinina são os fatores que mais influenciam no sucesso da multiplicação *in vitro*.

Das citocininas utilizadas na cultura de tecidos de *Eucalyptus*, BAP tem sido muito eficiente em promover a multiplicação de partes aéreas e a indução de gemas adventícias, além de ser a mais barata de todas. Graça et al. (2001), ao compararem o efeito de BAP e Thidiazuron (TDZ) na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii*, relataram que BAP apresentou efeito superior quanto à produção de brotações, além de induzir reduzida formação de calo.

Genótipo 7: $y = 1,5511 + 13,207x - 12,503x^2$ - $R^2 = 0,77$	Genótipo 2: $y = 1,1357 + 10,574x - 10,594x^2$ - $R^2 = 0,88$
Genótipo 3: $y = 1,2311 + 10,535x - 9,3029x^2$ - $R^2 = 0,85$	Genótipo 4: $y = 1,3254 + 7,4566x - 6,5486x^2$ - $R^2 = 0,73$
Genótipo 6: $y = 1,2351 + 10,159x - 9,6229x^2$ - $R^2 = 0,70$	Genótipo 10: $y = 1,586 + 5,3154x - 4,8914x^2$ - $R^2 = 0,69$

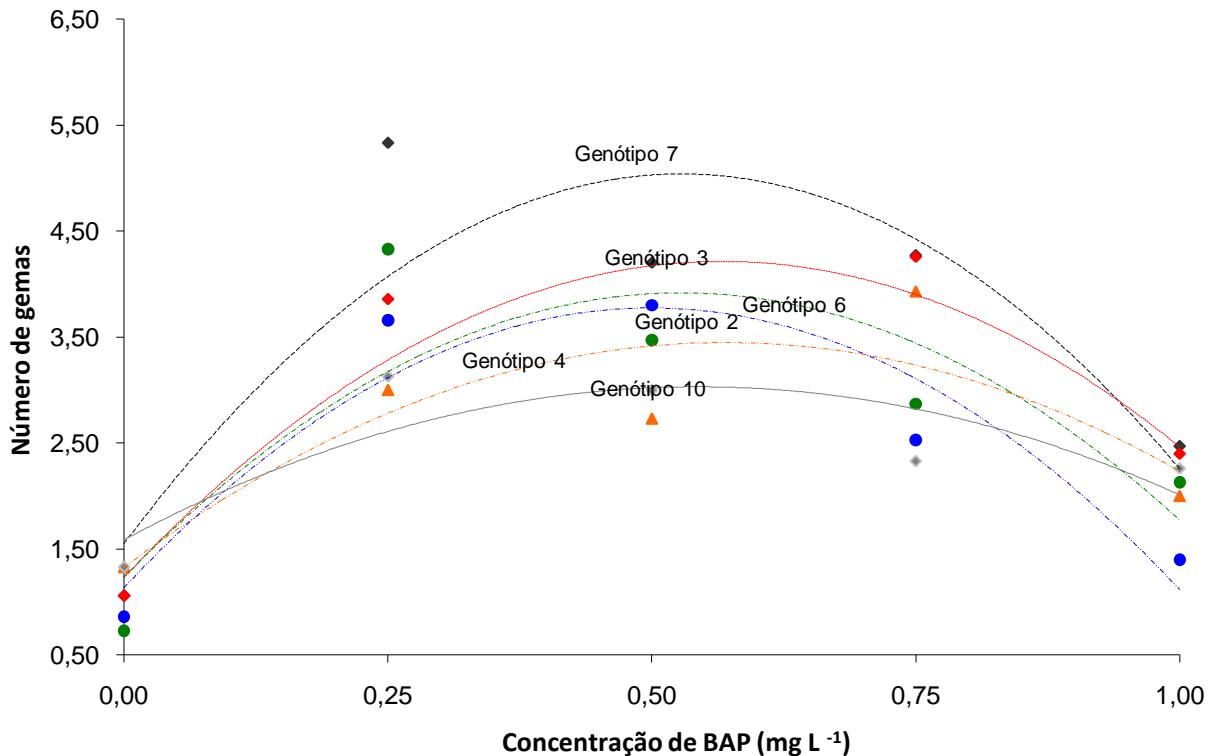


Figura 13 - Número de gemas por explante em seis genótipos de *Eucalyptus dunnii*, após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ½ MS acrescido de diferentes concentrações de BAP. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

6.6 Conclusões

A contaminação geral dos segmentos nodais tem influência dos genótipos de *Eucalyptus dunnii*.

A hiperhidridicidade dos segmentos nodais de *Eucalyptus dunni* é afetada pela presença da citocinina BAP no meio nutritivo.

A multiplicação de gemas axilares de *Eucalyptus dunnii* é afetada de maneira diferenciada nos genótipos pelas concentrações de BAP.

7 CAPÍTULO IV

ALONGAMENTO *in vitro* DE GEMAS DE *Eucalyptus dunnii* MAIDEN

7.1 Resumo

As brotações multiplicadas que apresentam pequeno comprimento poderão apresentar baixo percentual de enraizamento se forem diretamente cultivadas em meios de enraizamento, ou dar origem a mudas de baixa qualidade para a fase de aclimatização. Com o presente trabalho, objetivou-se avaliar o alongamento *in vitro* de brotações multiplicadas, as quais foram preparadas e inoculadas, sob condições assépticas, em meio nutritivo MS reduzido à metade da concentração de sais. Realizaram-se dois experimentos, um empregando-se concentrações variáveis de Ácido Giberélico (GA₃), e presença fixa de ANA e BAP e outro utilizando-se concentrações variáveis de ANA e fixa de BAP. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com cinco repetições, cada uma composta por um frasco contendo três explantes. Trinta dias após a inoculação dos explantes foram efetuadas as avaliações. Para a maioria dos genótipos, a ausência de GA₃ resultou no maior número de brotações alongadas por explante e maior comprimento de gemas alongadas. Em geral, os genótipos que apresentaram maior número de brotações também apresentaram maior tamanho de brotações. A não adição de GA₃ ao meio de cultura não promoveu a formação de calos; os quais atingiram mais de 50% na presença da maior concentração de GA₃ testada (0,80 mg L⁻¹ – 2,30 µM). A formação de calos foi diferenciada nos genótipos estudados. Testando-se diferentes concentrações de ANA, obteve-se o melhor resultado com 0,5 mg L⁻¹ (2,69 µM). Concentrações superiores a 0,5 mg L⁻¹ (2,69 µM) de ANA promoveram aumento de calos e redução no número e comprimento das brotações. Os genótipos testados apresentam comportamento diferenciado em relação ao comportamento *in vitro*, o qual é passível de seleção, sendo que o genótipo 3 foi o que apresentou os melhores resultados no alongamento *in vitro*, com o maior número de brotações alongadas por explante e, também, o maior comprimento das brotações. Para o alongamento *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* pode-se recomendar somente o balanço entre auxina (ANA) e citocinina (BAP), dispensando-se a giberelina (GA₃).

Palavras-chave: ácido giberélico, brotações alongadas, calosidade.

7.2 Abstract

Shoots multiplied that have short lengths may present low percentage of survival if they are directly grown on rooting media, or give rise to low quality seedlings for the acclimatization phase. The objective of this study was to evaluate the elongation of shoots multiplied *in vitro*. Shoots were prepared and inoculated under aseptic conditions on MS nutrient medium with half of the salt concentration. There were two experiments, using gibberellic acid (GA₃) in the presence of NAA and BAP or NAA and BAP only. The experiments were conducted in a randomized design in factorial with five replications, each consisting of a vial containing three explants. Thirty days after inoculation of explants were performed evaluations. For most genotypes, the absence of GA₃ produced the highest number of elongated shoots each explant and a longer length of elongated shoots. In general, genotypes with the highest number of shoots also had larger shoots. The non-addition of GA₃ to the culture medium did not promote callus formation, reaching over 50% in the use of higher concentration of GA₃ tested (0.80 mg L⁻¹ to 2.30 µM), the callus formation was in different genotypes. In the experiment with different concentrations of NAA, we obtained the best result using 0.5 mg L⁻¹ (2.69 µM). Higher concentrations of 0.5 mg L⁻¹ (2.69 µM) of NAA increased callus and reduce the number and length of shoots. Genotype 3 was that it presented the best results in elongation *in vitro* showing the greatest number of elongated shoots per explant, and also had the highest shoot length. For the *in vitro* elongation of *Eucalyptus dunnii* can recommend only the balance between auxin (NAA) and cytokinin (BAP), eliminating the gibberellin (GA₃).

Keywords: gibberellic acid, elongated shoots, callus.

7.3 Introdução

Poucos estudos foram realizados sobre a fase de alongamento *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. Entretanto, esta etapa tem sido considerada necessária para o sucesso do cultivo *in vitro* na maioria das espécies de *Eucalyptus* (CORREIA et al., 1995).

Um dos fatores que afetam o alongamento de brotações está relacionado ao efeito residual do BAP utilizado durante a fase de multiplicação de gemas em subculturas sucessivas (GRATTAPAGLIA et al., 1987).

As brotações multiplicadas que apresentam pequeno comprimento poderão apresentar baixo percentual de enraizamento se forem diretamente cultivadas em meios de enraizamento, ou dar origem a mudas de baixa qualidade para a fase de aclimatização (SILVA, 2004).

Uma das formas de estimular o crescimento das brotações é por meio da adição do ácido giberélico (GA_3) ao meio nutritivo, o qual promove o aumento do comprimento das brotações, devido ao estímulo da divisão e alongamento das células (MÉTRAUX, 1987).

Calderon-Baltierra (1994) testou a influência de diferentes concentrações de cálcio e de ácido giberélico no alongamento de brotações de *Eucalyptus glubulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em meio de cultura MS. Brotações沿adas foram obtidas com a adição de $0,1\text{ mg L}^{-1}$ ($0,3\text{ }\mu\text{M}$) de GA_3 . Esta concentração de GA_3 resultou em melhorias na produtividade, na altura dos brotos e na taxa de enraizamento.

O objetivou-se do presente trabalho foi avaliar o alongamento *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii* provenientes da fase de multiplicação.

7.4 Material e Métodos

Para a iniciação da fase de alongamento, as brotações multiplicadas *in vitro* foram preparadas e inoculadas, sob condições assépticas, em frascos com capacidade para 150 ml, contendo 30 ml de meio de cultura $\frac{1}{2}\text{MS}$ (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Ao meio nutritivo MS foram adicionados 6 g L^{-1} de ágar, 30 g L^{-1} de sacarose e 50 mg L^{-1} de mio-inositol. O meio de cultura foi preparado utilizando-se água deionizada e o pH foi ajustado para 5,8 com a adição de hidróxido de sódio - NaOH (0,1 M) ou Ácido Clorídrico - HCl (0,1 M), antes da autoclavagem e da adição do ágar. Na sequência, os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados a 121°C ($1,5\text{ kgf cm}^{-2}$) por 20 minutos.

Os frascos contendo os explantes inoculados foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $20\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia durante todo o experimento.

Para esta fase realizaram-se dois experimentos utilizando os fitorreguladores GA_3 , BAP e ANA e, em outro, somente BAP e ANA.

7.4.1 Efeito de GA_3 , ANA e BAP no alongamento *in vitro* de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii*

Utilizaram-se concentrações fixas de ANA ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ – $2,7 \mu\text{M}$) e de BAP ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$ – $0,44 \mu\text{M}$) variando-se GA_3 . O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se um esquema bifatorial 6×4 , em que os níveis do fator “A” referiram-se aos diferentes genótipos e os níveis do fator “B”, às concentrações de GA_3 avaliadas ($0; 0,2; 0,4$; e $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ – $0; 0,57; 1,15$ e $2,30 \mu\text{M}$). Foram usadas cinco repetições, cada uma composta por um frasco contendo três explantes, totalizando 120 unidades experimentais e 360 segmentos nodais introduzidos *in vitro*.

Trinta dias após a inoculação dos explantes foram avaliadas as seguintes variáveis: número de gemas alongadas, comprimento das gemas alongadas (mm) e porcentagem de formação de calos (formação de calo em qualquer parte do explante segundo setas da Figura 14).

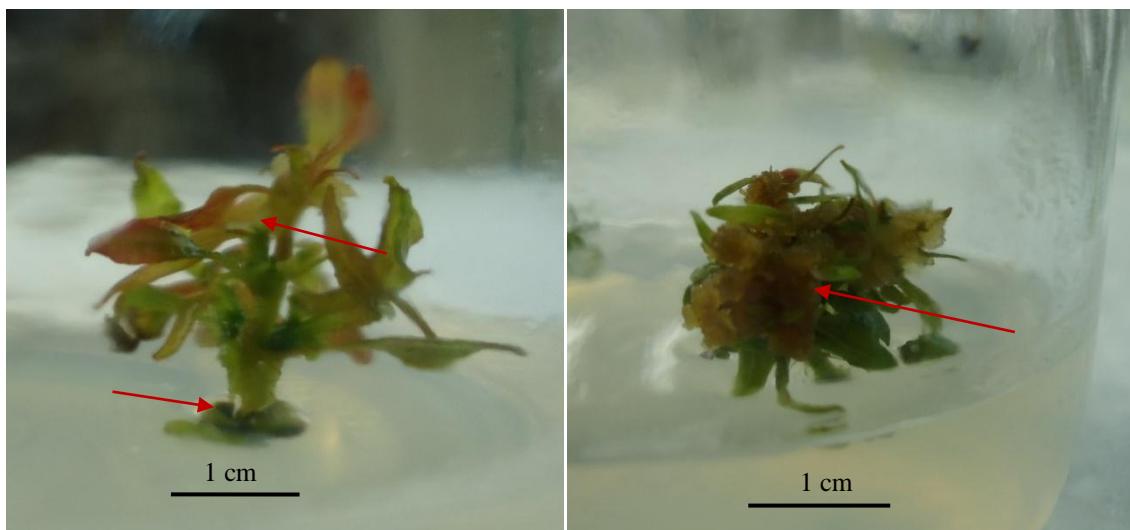


Figura 14 – Culturas de *Eucalyptus dunnii* com presença de calos na base, caule e folhas (setas) durante a fase de alongamento *in vitro* em meio de cultura $\frac{1}{2}\text{MS}$ com adição de $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,30 \mu\text{M}$) de GA_3 após 30 dias de cultivo. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

7.4.2 Efeito de ANA e BAP no alongamento *in vitro* de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii*

Foi utilizada uma concentração fixa de BAP ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$ – $0,44 \mu\text{M}$), variando-se a concentração de ANA conforme o tratamento. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 6 x 5, em que os níveis do fator “A” referiram-se aos diferentes genótipos e os níveis do fator “B”, às concentrações de ANA (0; 0,25; 0,5; 0,75; e 1 mg L^{-1} – 0; 1,34; 2,69; 4,03 e $5,37 \mu\text{M}$). O experimento foi realizado com cinco repetições, cada uma composta por um frasco contendo três explantes, totalizando 150 unidades experimentais e 450 segmentos nodais introduzidos *in vitro*.

7.4.3 Análises estatísticas

Após avaliar a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias por meio do teste de Bartlett, os dados foram transformados pela função $\sqrt{x + 0,5}$ submetidos, após, à análise de variância. Quando o valor de “F” foi significativo, dados de tratamentos qualitativos tiveram suas médias comparadas por meio do teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados de tratamentos quantitativos foram submetidos à análise de regressão polinomial. A precisão do experimento foi medida através da acurácia seletiva (AS%) calculada por $\sqrt{1 - 1/F_{cal}}$. Os resultados apresentados são as médias originais obtidas. O programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000) foi utilizado para a análise estatística dos dados.

7.5 Resultados e discussão

7.5.1 Efeito de GA_3 , ANA e BAP no alongamento *in vitro* de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii*

Houve interação ($p<0,01$) entre os fatores testados para número de brotações alongadas por explante e comprimento médio de brotações (Tabela 9). Para a formação de calos houve efeito significativo para os fatores principais genótipo e GA_3 . A acurácia seletiva (AS) foi elevada para as três variáveis avaliadas, de acordo com a classificação de Resende; Duarte (2007), demonstrando alta confiança na avaliação e nos valores genotípicos preditos com fins de seleção.

Tabela 9 - Resultado da análise de variância para número de brotações alongadas por explante (NB), comprimento médio de brotações (CMB) e porcentagem de formação de calos em segmentos nodais de seis genótipos de *Eucalyptus dunnii* submetidos a diferentes concentrações de GA_3 , após 30 dias de cultivo em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	Quadrados médios (significância)		
		NB	CMB	Formação de calos (%)
GENÓTIPO (G)	5	8,830*	41,701*	4.177,96*
GA_3	3	9,570*	88,700*	16.827,60*
(G)* GA_3	15	2,416*	3,750*	701,25 ^{ns}
RESÍDUO	96	0,9461	1,877	601,87
MÉDIA	-	2,73	6,48	31,66
AS		0,94	0,97	0,92

^{ns} F não-significativo ao nível de 5% de probabilidade erro; * F significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro; AS = acurácia seletiva, faixas: $\leq 0,5$ (Baixa); $0,5 < AS \leq 0,7$ (Moderada); $0,7 < AS \leq 0,9$ (Alta); $> 0,9$ (Muito Alta).

Para o número de brotações alongadas houve ajuste polinomial quadrático para todas as curvas, observando-se interação entre genótipos e concentrações de GA_3 . Por conseguinte, o comportamento entre os genótipos é diferente quando se varia a concentração de GA_3 , o qual pode ser visualizado na Figura 15.

Genótipo 3: $y = 3,90301 - 2,2965x + 2,62272x^2$ - $R^2 = 0,92$	Genótipo 2: $y = 3,8609 - 8,72036x + 7,5818x^2$ - $R^2 = 0,86$
Genótipo 7: $y = 4,61225 - 9,67133x + 9,6681x^2$ - $R^2 = 0,87$	Genótipo 10: $y = 4,0416 - 11,9671 + 11,0159x^2$ - $R^2 = 0,99$
Genótipo 6: $y = 2,9614 + 1,765409x - 2,99204x^2$ - $R^2 = 0,97$	Genótipo 4: $y = 1,7095 + 0,96304x - 0,460227x^2$ - $R^2 = 0,84$

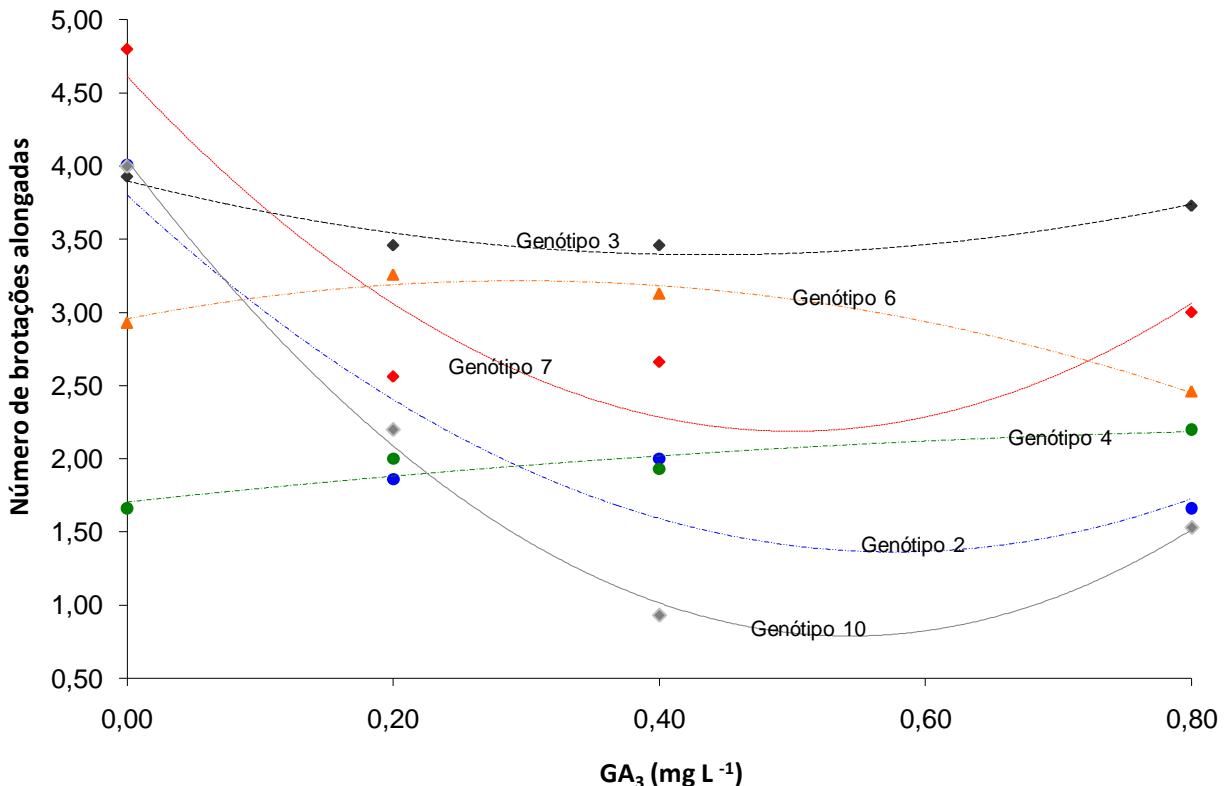


Figura 15 - Número de brotações alongadas por explante em genótipos de *Eucalyptus dunnii*, aos 30 dias após a inoculação, em função dos tratamentos de GA₃. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

Para a maioria dos genótipos, a ausência de GA₃ resultou no maior número de brotações alongadas por explante. Os genótipos 7, 2 e 10 apresentaram grande redução no número de brotações quando foi adicionada a giberelina, mesmo na menor concentração testada (0,20 mg L⁻¹ – 0,57 µM). Segundo Grattapaglia; Machado (1998) o uso de GA₃, em algumas situações, pode inibir a proliferação de partes aéreas, além de resultar em alongamento excessivo e folhas deformadas.

Os genótipos 3 e 4 não apresentaram grande variação no número de brotações com a adição de GA₃, sendo que o genótipo 4 apresentou um leve aumento nas brotações alongadas com o aumento da concentração de GA₃. O genótipo 3 apresentou o maior número de brotações alongadas na ausência de GA₃ e na maior concentração testada (0,80 mg L⁻¹ – 2,30 µM), entretanto na presença de 0,80 mg L⁻¹ (2,30 µM) de GA₃ houve formação de calos na base dos explantes.

Pôde-se observar certa recalcitrância para o alongamento dos genótipos 2 e 10 quando da adição de GA₃ e, para o genótipo 4, em todos os tratamentos avaliados. Em média, o genótipo 3 apresentou o maior número de brotações alongadas (3,65), seguido do genótipo 7 que apresentou média de 3,26 brotações alongadas por explante. Os genótipos que apresentaram as menores médias de brotações alongadas foram os genótipos 10 e 4, obtendo, respectivamente, 2,17 e 1,95 brotos alongados.

Os resultados obtidos no presente trabalho foram discordantes daqueles de Brondani (2008) que, avaliando o alongamento de clones de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, observou maior alongamento das brotações adicionando 0,10 ou 0,20 mg L⁻¹ (0,29 ou 0,57) de GA₃ combinadas com 0,10 mg L⁻¹ de BAP (0,44 µM) e 0,5 mg L⁻¹ (2,69 µM) de ANA.

Para o comprimento das brotações alongadas houve um ajuste polinomial quadrático em todas as curvas, observando-se interação entre genótipo e GA₃ (Figura 16).

$$\begin{array}{ll} \text{Genótipo 3: } y = 311,5803 - 19,9368x + 18,3793x^2 \quad R^2 = 0,84 & \text{Genótipo 7: } y = 7,5326 - 7,62063x + 5,04321x^2 \quad R^2 = 0,86 \\ \text{Genótipo 2: } y = 10,7848 - 19,9160x + 17,1704x^2 \quad R^2 = 0,90 & \text{Genótipo 6: } y = 6,8631 - 7,91868x + 8,3784x^2 \quad R^2 = 0,89 \\ \text{Genótipo 4: } y = 10,042 - 22,2143x - 22,21136x^2 \quad R^2 = 0,90 & \text{Genótipo 10: } y = 5,9258 - 10,78668 + 10,2784x^2 \quad R^2 = 0,99 \end{array}$$

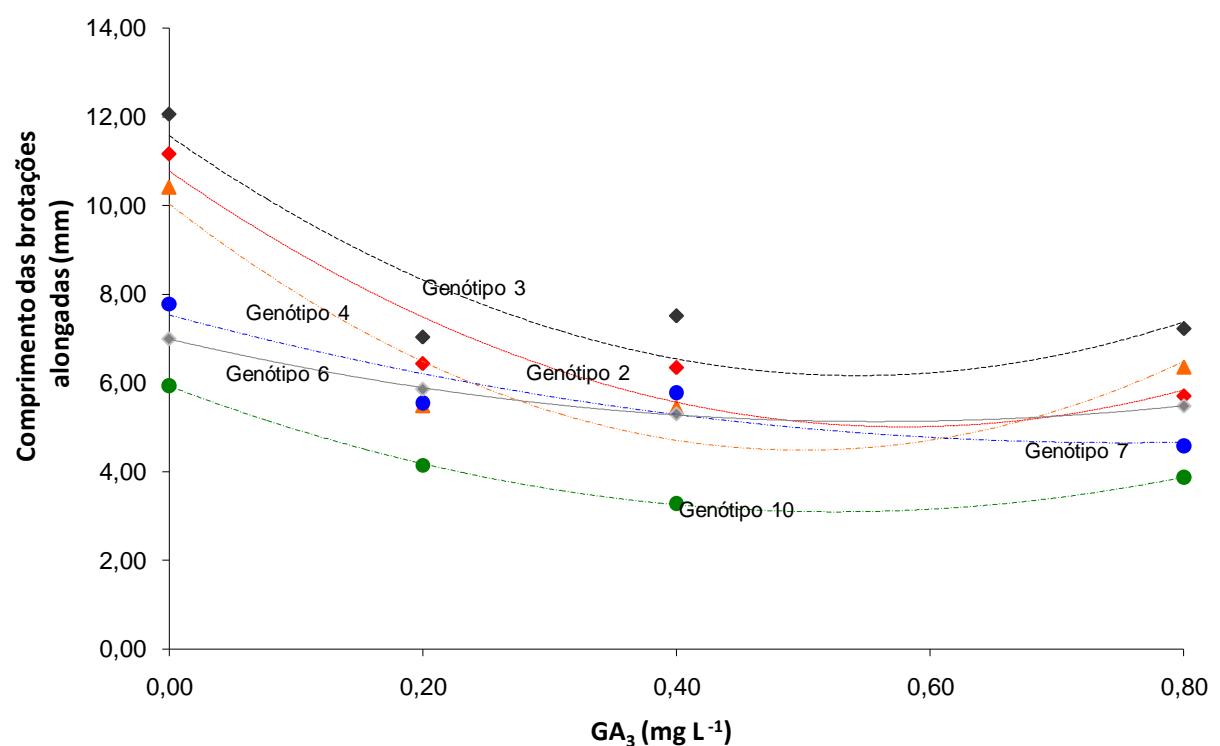


Figura 16 – Comprimento médio das brotações alongadas (mm) de genótipos de *Eucalyptus dunnii*, aos 30 dias após a inoculação, em função dos tratamentos de GA₃. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

Quanto ao comprimento das brotações alongadas obteve-se comportamento semelhante à variável número de brotações alongadas, a qual, na ausência de GA₃ apresentou os melhores resultados. Em geral, os genótipos que apresentaram maior número de brotações também apresentaram maior tamanho de brotações. O genótipo 4, constituiu-se uma exceção, obtendo a menor média de brotações alongadas e, simultaneamente, um dos maiores comprimentos médios de brotações entre os seis genótipos avaliados, principalmente na ausência de GA₃.

Todos os genótipos apresentaram brotações mais compridas na ausência de GA₃, havendo grande diminuição no comprimento das brotações com o acréscimo da concentração desta giberelina, o que indica que a combinação ANA e BAP é suficiente para promover o alongamento *in vitro* de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii*.

O genótipo 3 apresentou a maior média de comprimento de brotações alongadas (12,0 mm), seguido do genótipo 2 (11,2 mm), ambos na ausência de GA₃. O genótipo 10, por outro lado, apresentou a menor média (3,3 mm) na presença de 0,4 mg L⁻¹ (1,11 µM) de GA₃.

Em trabalho com multiplicação seguida de alongamento das brotações de árvores de 30 anos de idade de *Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus grandis* em meio MS, Joshi et al. (2003) observaram um comprimento médio das brotações de 25 a 30 mm, 15 dias após a inoculação dos explantes. A melhor resposta ao alongamento foi obtida com a utilização de 1 mg L⁻¹ (4,44 µM) de BAP e 0,4 mg L⁻¹ (1,11 µM) de GA₃, resultado diferente do observado no presente trabalho, em que a ausência de GA₃ proporcionou os melhores resultados no alongamento *in vitro*. Provavelmente esta diferença deve-se à utilização de diferentes espécies, a localização das pesquisas e à idade das árvores estudadas.

Huang et al. (2010), em estudo com *Eucalyptus urophylla*, obtiveram comprimento médio das brotações alongadas de 25 mm após 40 dias de inoculação, utilizando 0,1 mg L⁻¹ (0,44 µM) de Benziladenina (BA), 0,1 mg L⁻¹ (0,54 µM) de ANA e 0,1 mg L⁻¹ (0,29 µM) de GA₃.

Quanto à formação de calos, os genótipos 7, 2, 3 e 10 apresentaram as menores médias, diferenciando-se dos genótipos 6 e 4 (Tabela 10). O genótipo 4 foi o que apresentou a maior média de formação calogênica, obtendo 56,66%.

A elevada formação de calos no genótipo 4 pode, portanto, explicar o reduzido número de brotações alongadas. A formação destas estruturas prejudica o cultivo *in vitro* quando o objetivo é a propagação direta. Segundo Grattapaglia; Machado (1998), a formação de calos na base do explante pode comprometer a proliferação de gemas axilares e o alongamento de brotações, afetando o desenvolvimento *in vitro*.

Tabela 10 – Formação de calos (%) em genótipos de *Eucalyptus dunnii* aos 30 dias de cultivo em meio nutritivo ½ MS. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

Genótipo	Formação de calos (%)
7	15,0 a
2	23,33 a
3	26,6 a
10	30,0 a
6	38,3 b
4	56,66 c

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Em relação à concentração de GA₃ no meio nutritivo, a formação de calos (%) ajustou-se a uma função quadrática positiva; com o aumento da concentração de GA₃ observou-se cerca de 55% de explantes com estruturas calogênicas a 0,8 mg L⁻¹ (2,30 µM). (Figura 17). Apenas em ausência de GA₃ no meio nutritivo testado para o alongamento *in vitro* não foram formados calos nas brotações.

De uma maneira geral, a adição de GA₃ no meio nutritivo não foi benéfica para o alongamento. Ao contrário, a presença de GA₃ promoveu um baixo percentual de alongamento de brotações e um menor tamanho (Figura 18B) em comparação à ausência de GA₃ (Figura 18A). Adicionalmente, na presença dessa giberelina ocorreu formação de estruturas calogênicas.

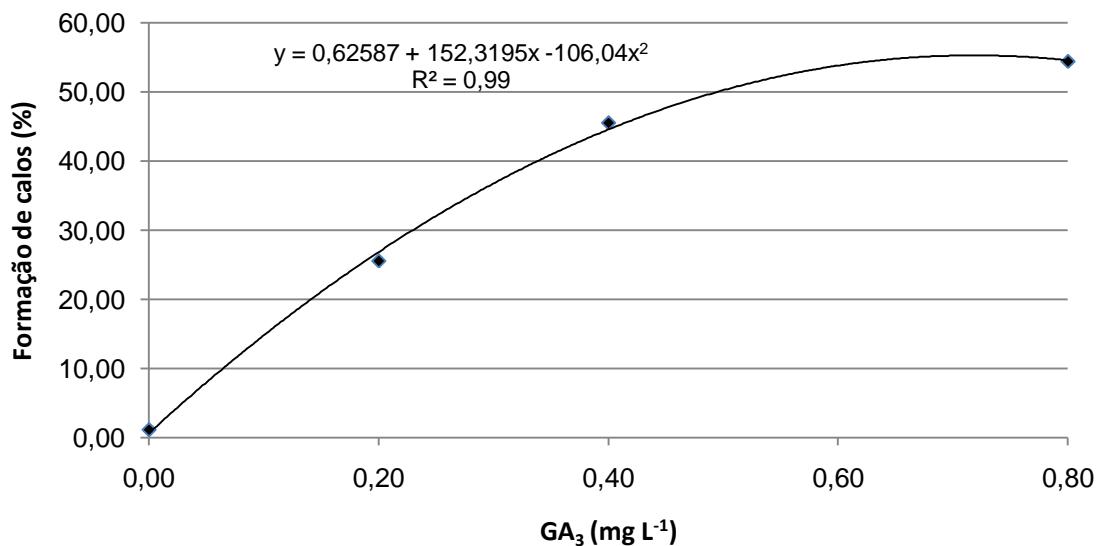


Figura 17 - Brotações de *Eucalyptus dunnii* apresentando formação de calos (%) após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ½ MS acrescido de diferentes concentrações de GA₃. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

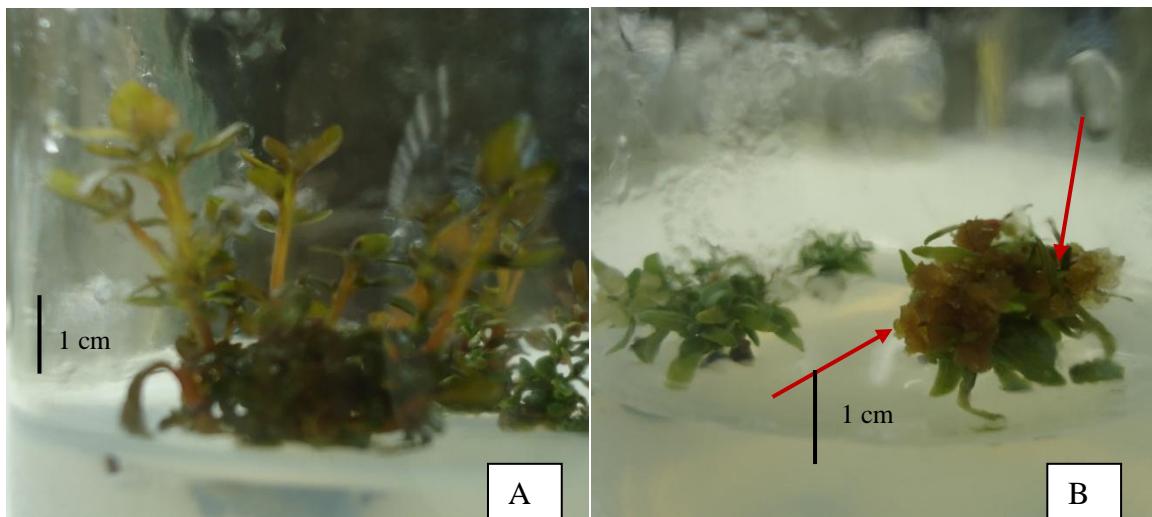


Figura 18 – A: Brotações alongadas de *Eucalyptus dunnii* cultivadas em meio nutritivo ½ MS na ausência de GA₃. B: Culturas com presença de calos (setas) e ausência de brotações沿adas cultivadas no meio de nutritivo ½ MS na presença de GA₃, durante 30 dias de cultivo *in vitro* na fase de alongamento. Santa Maria/RS, UFSM, 2010

7.5.2 Efeito de ANA e BAP no alongamento *in vitro* de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii*

Houve efeito significativo para genótipo e ANA (Tabela 11) para todas as variáveis estudadas. A acurácia seletiva (AS) foi elevada para todas as variáveis, conforme classificação de Resende; Duarte (2007), por conseguinte, é alta a confiança que se pode ter na avaliação e nos valores genotípicos preditos para fins de seleção.

Tabela 11 - Resultados da análise de variância para número de brotações alongadas por explante (NB), comprimento médio de brotações (CMB) e formação de calos (%) no alongamento *in vitro* de seis genótipos de *Eucalyptus dunnii* submetidos a diferentes concentrações de ANA, cultivados em meio nutritivo ½ MS, aos 30 dias de avaliação. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	Quadrados médios		
		NB	CMB (mm)	Formação de calos (%)
GENÓTIPO (G)	5	8,104*	278,182*	1.376,16*
ANA	3	14,733*	43,463*	2.426,13*
(G)* ANA	15	0,563 ^{ns}	16,4158 ^{ns}	372,59 ^{ns}
RESÍDUO	96	0,9461	10,4967	333,34
MÉDIA	-	2,60	10,44	7,78%
AS		0,95	0,98	0,91

^{ns} F não-significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro; * F significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro; AS = acurácia seletiva, faixas: ≤ 0,5 (Baixa); 0,5 < AS 0,7 (Moderada); 0,7 < AS 0,9 (Alta); > 0,9 (Muito Alta).

Os genótipos 6, 3 e 7 apresentaram o maior número de brotação alongadas por explante, diferenciando-se dos demais genótipos (Tabela 12). O genótipo 10 apresentou o menor número de brotações alongadas, não diferindo do genótipo 4.

Quanto ao comprimento médio das brotações, o maior comprimento de brotações alongadas foi obtido pelo genótipo 6 (15,68 mm), que diferiu dos demais. O menor

comprimento médio foi obtido pelos genótipos 10 e 4, obtendo valores próximos a 7 mm Os genótipos 3, 7 e 2 foram intermediários em relação ao comprimento das brotações.

Quanto à formação de calos, observou-se uma relação inversa com o alongamento; os genótipos que mais alongaram foram aqueles com menor formação de calos. A formação de estruturas calogênicas prejudica o desenvolvimento das brotações *in vitro*, consequentemente diminui o alongamento das brotações. O genótipo 10 apresentou a maior frequência de calogênese, em mais de 20% dos explantes. Já os demais genótipos formaram um reduzido percentual de calos, ou não formaram, e, em geral, apresentaram um maior desenvolvimento da parte aérea.

Esta diferença na resposta de explantes em um sistema de cultura de tecidos depende do genótipo do material colocado em cultura. Vários estudos têm demonstrado que a resposta de um tecido a um determinado sistema de cultura de células é dependente do genótipo (HANDLEY et al., 1995).

Tabela 12 – Número de brotações alongadas por explante, comprimento médio (mm) das brotações e formação de calos (%) em genótipos de *Eucalyptus dunnii* cultivados em meio nutritivo ½ MS, aos 30 dias de avaliação. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

Genótipo	Número de brotações alongadas	Comprimento médio das brotações (mm)	Formação de calos (%)
6	3,17 a*	15,68 a	6,67 a
3	3,09 a	11,78 b	2,67 a
7	2,97 a	11,20 b	6,67 a
2	2,48 b	10,30 b	0,0 a
4	2,09 c	7,00 c	9,33 a
10	1,80 c	6,70 c	21,33 b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. A letra “a” refere-se à melhor resposta *in vitro*.

Pode-se verificar certa recalcitrância do genótipo 4 e, principalmente, do genótipo 10 quanto ao alongamento *in vitro*. Ambos os genótipos apresentaram reduzidos números de brotações alongadas e, também, médias de comprimento inferiores aos demais genótipos. A permanência desses genótipos no cultivo *in vitro*, especialmente do genótipo 10, foi, além disso, afetada pela elevada formação de calos. A formação de calos é muito comum em espécies lenhosas, sendo considerada indesejável na micropropagação. Quantidades excessivas de sacarose e auxina estão entre os principais fatores a influenciar a calogênese, mas alterações no comportamento hormonal também podem ser responsabilizadas. (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998)

Em relação ao número de brotos por explante, a curva obtida ajustou-se a uma função quadrática (Figura 19), constatando-se um aumento na formação de brotos à medida que aumentou a concentração de ANA até $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,69 \mu\text{M}$). A partir desse ponto, houve uma diminuição no número de brotos com o aumento na concentração desta auxina. A $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,69 \mu\text{M}$) de ANA ocorreu a maior média, atingindo valor superior a 3,5 brotos por explante. À exceção do tratamento sem a adição de ANA, os demais ($0,25, 0,75$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ – $1,34, 4,03$ e $5,37 \mu\text{M}$) apresentaram em torno de 2,5 brotos por explante.

Comportamento semelhante ao exposto foi encontrado por Brondani et al. (2009), trabalhando com o híbrido *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. A melhor resposta quanto ao número de explantes alongados foi com concentrações entre $0,25$ e $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ ($1,34$ e $4,03 \mu\text{M}$) de ANA e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,22 \mu\text{M}$) de BAP. A média de brotações alongadas foi de 3,8 brotos por explante.

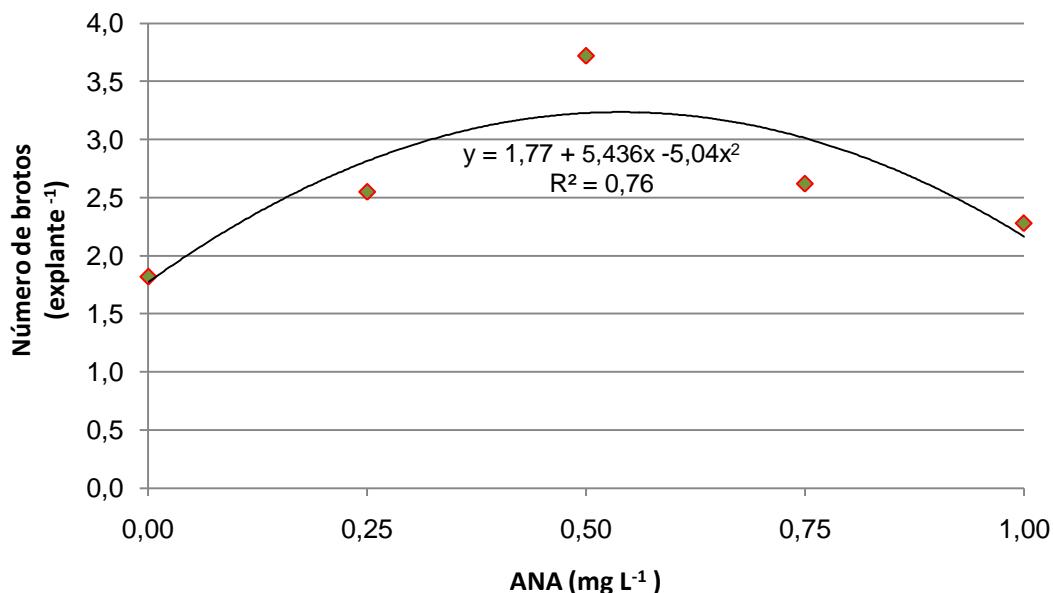


Figura 19 - Número de brotações emitidas por explante em *Eucalyptus dunnii* após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio nutritivo ½ MS acrescido de diferentes concentrações de ANA. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

O comprimento das brotações alongadas por explante teve comportamento semelhante ao número de brotações alongadas (Figura 20). Em geral, quanto maior o número de brotações, maior também foi o seu comprimento. A concentração 0,50 mg L⁻¹ (2,69 µM) de ANA apresentou o maior comprimento médio por brotação (12,1 mm), diminuindo conforme o aumento da concentração de ANA no meio nutritivo.

Trabalhando com *Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus calmadulensis*, Bisht et al. (1999) observaram multiplicação seguida de alongamento após um período de 120 dias de cultivo em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com BAP e ANA. No geral, os brotos atingiram, em média, 20 a 35 mm de comprimento, resultado superior ao encontrado no presente estudo. Para os autores, a multiplicação e o alongamento ocorreram sem a necessidade de uma fase específica de alongamento das brotações multiplicadas.

Em estudo com *Eucalyptus grandis*, Carvalho (1988) trabalhando com meio de cultura sólido suplementado com 0,05 mg L⁻¹ (2,22 µM) de BAP e 0,01 mg L⁻¹ (0,05 µM) de ANA, obteve brotações com altura média de 10 mm aos 30 dias de alongamento *in vitro*, valores próximos aos encontrados no presente trabalho.

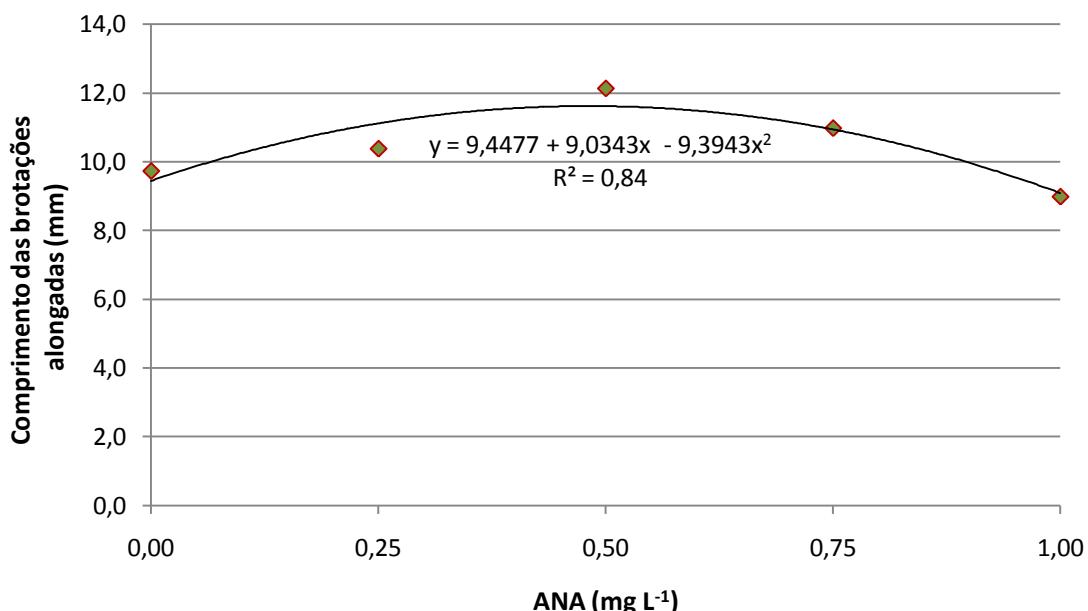


Figura 20 - Comprimento médio das brotações alongadas por explante em *Eucalyptus dunnii* após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura ½ MS acrescido de diferentes concentrações de ANA. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

A formação de calos ajustou-se a uma função quadrática positiva com o aumento na concentração da auxina, alcançando quase 25% de explantes com estruturas calogênicas na presença de 1,0 mg L⁻¹ (5,37 µM) de ANA (Figura 21). A utilização de ANA em concentrações inferiores a 0,75 mg L⁻¹ (4,03 µM) não pode ser considerada determinante no sucesso do alongamento, pois afetou em torno de 5% das brotações, quando da utilização de 0,50 e 0,75 mg L⁻¹ (2,69 e 4,03 µM) de ANA, e menos de 2% na presença de 0,25 mg L⁻¹ da auxina.

Concentrações elevadas de ANA podem prejudicar o cultivo *in vitro*. Grattapaglia; Machado (1998) afirmaram que altas concentrações de auxina no meio de enraizamento podem promover a formação de calos na base dos explantes, comprometendo o crescimento da parte aérea, confirmando os resultados observados nesta pesquisa. Comportamento similar foi verificado por Brondani et al. (2009), em que o emprego de 1,0 mg L⁻¹ (5,37 µM) de ANA resultou na indução de calos, convertendo-se em efeito negativo no alongamento das brotações do híbrido *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*.

Além da alta formação de calos, a utilização de 1,0 mg L⁻¹ (5,37 µM) de ANA também promoveu o aparecimento de estruturas hiperhídricas (dados não apresentados).

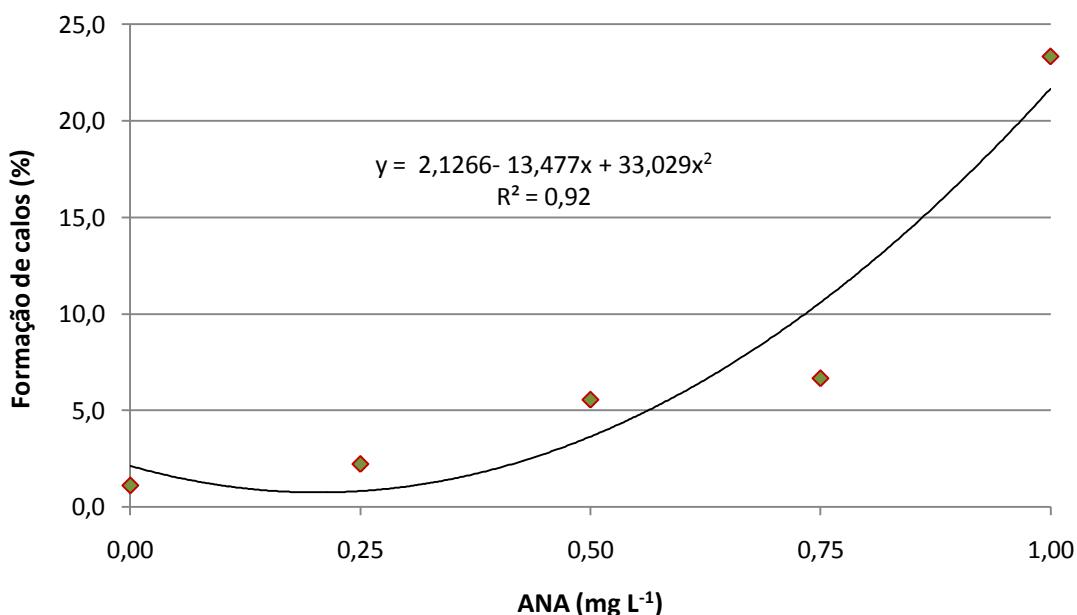


Figura 21 – Explantes de *Eucalyptus dunnii* em fase de alongamento apresentando estruturas calogênicas (%) após 30 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS acrescido de diferentes concentrações de ANA. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

7.6 Conclusões

Ácido giberélico (GA_3) não apresenta efeito no alongamento *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. Na presença de GA_3 os genótipos reduzem o número de brotações alongadas e o comprimento das brotações, aumentando a formação de calos. A adição de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,69 \mu\text{M}$) de ANA estimula a formação de brotações, além de promover um maior comprimento de brotações. Concentrações superiores a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ($2,69 \mu\text{M}$) de ANA apresentam efeito detratinal: aumento na formação de calos e diminuição no número e comprimento das brotações alongadas.

Os genótipos testados apresentam comportamento diferenciado em relação ao comportamento *in vitro*, o qual é passível de seleção.

8 CAPÍTULO V

ENRAIZAMENTO E ACLIMATIZAÇÃO *in vitro* DE MICROESTACAS DE *Eucalyptus dunnii* MAIDEN

8.1 Resumo

A espécie *Eucalyptus dunnii* é reconhecidamente de difícil enraizamento *in vitro*. Neste sentido, objetivou-se com o presente estudo avaliar o enraizamento *in vitro* de microestacas alongadas. Para a iniciação da fase de enraizamento, as brotações foram submetidas a três subcultivos de maneira que se obtivesse material em quantidade necessária e de tamanho aproximado de 2,0 – 3,0 cm. Dois experimentos foram efetuados, um deles utilizando-se diferentes concentrações de Ácido indol-3-butírico (AIB) em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Este experimento foi realizado utilizando-se diferentes genótipos e cinco concentrações de AIB (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ – 0; 2,46; 4,92; 9,84 e 19,70 µM). O outro experimento foi realizado utilizando-se meio de cultura $\frac{1}{2}$ WPM (LLOYD; McCOWN, 1981) líquido e vermiculita, em tratamentos pulso de AIB. O experimento foi efetuado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se diferentes genótipos e cinco concentrações de AIB (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ – 0; 2,46; 4,92; 9,84 e 19,70 µM). Também foi realizada a aclimatização das microestacas enraizadas. Não foi observada formação de raízes em nenhuma estaca no experimento utilizando AIB adicionado ao meio de cultura. Ainda em outro experimento de enraizamento utilizando-se como substrato vermiculita e meio de cultura líquido observou-se formação de raiz somente em algumas estacas. O emprego de vermiculita associado a meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM líquido, após tratamento pulso com solução de AIB, apresenta potencialidade como substrato para o enraizamento de microestacas de *Eucalyptus dunnii*. A diminuição no tempo de cultivo *in vitro*, além da seleção dos genótipos com maior capacidade de enraizamento, também, podem ajudar a aumentar a formação de raiz. Depois de enraizadas, as estacas atingem um satisfatório desenvolvimento na aclimatização.

Palavras-chave: ácido 3-indol butírico, vermiculita, meio nutritivo líquido.

8.2 Abstract

Eucalyptus dunnii is admittedly difficult to root *in vitro*. The objective of this study to evaluate the *in vitro* rooting of elongated microcutting. For initiation of rooting, the shoots were subjected to three subcultures so that if material obtained in sufficient quantity and approximate size of 2.0 to 3.0 cm. We carried out two experiments, using different concentrations of indole-3-butyric acid (IBA) on $\frac{1}{2}$ MS medium (MURASHIGE; SKOOG, 1962). The experiment was conducted in a randomized design, using a 4 x 5 factorial scheme, where the levels of factor "A" refer to different genotypes and the levels of factor "B", at five concentrations of IBA evaluated (0; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg L⁻¹ - 0; 2.46; 4.92; 9.84 and 19.70 µM). Another experiment using $\frac{1}{2}$ WPM medium (LLOYD, MCCOWN, 1981) liquid and vermiculite in pulse treatments of IBA. The experiment was conducted in a randomized design, using a 3 x 5 factorial scheme, where the levels of factor "A" refer to different genotypes and the levels of factor "B", at five concentrations of IBA evaluated (0; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg L⁻¹ - 0, 2.46, 4.92, 9.84 and 19.70 µM). We also made the acclimatization of the rooted microcuttings. Was not observed formation of roots in an experiment using no stake in AIB added to the culture medium. In another experiment rooting using vermiculite as substrate and liquid medium, we observed formation of only a few root cuttings. The use of vermiculite associated with nutrient medium $\frac{1}{2}$ WPM liquid, after treatment with pulse solution of IBA, has potential as a substrate for the rooting of *Eucalyptus dunnii*. The reduction of length of *in vitro* culture can also help increase the formation of root, beyond the selection of genotypes with greater rooting capacity. Once rooted the cuttings reach good development in the acclimatization.

Keywords: indole-3-butyric acid, vermiculite, liquid nutritive medium.

8.3 Introdução

Eucalyptus dunnii é reconhecidamente de difícil enraizamento *in vitro*. Em geral, as espécies resistentes ao frio apresentam maior recalcitrância ao enraizamento se comparadas a outras espécies como *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus urophylla*, entre outras. (ALFENAS, 2004; ASSIS; MAFIA, 2007; DE KLERK et al., 1995). O uso de

reguladores de crescimento, especialmente auxinas, e a utilização de meios nutritivos adequados podem contribuir com a formação de raízes nesta espécie.

A rizogênese pode ser dividida em três fases: indução, iniciação e alongamento das raízes. As duas primeiras dependem da adição de auxina no meio nutritivo, enquanto que a terceira prescinde dessa classe de fitoreguladores que, geralmente, inibe o alongamento das raízes (GEORGE, 1996).

As auxinas mais utilizadas em meios nutritivos para formação de raízes são Ácido Indol-3-Butírico (AIB) e Ácido alfa-Naftaleno Acético - ANA (BERTAZZA et al., 1995; GEORGE, 1996). AIB tem sido bastante utilizado por não causar fitotoxicidade aos explantes e ser eficiente no enraizamento de muitas espécies, principalmente nas do gênero *Eucalyptus* (HARTMANN et al., 2002). As concentrações mais frequentes de emprego desta auxina estão entre 0,1 e 1,0 mg L⁻¹ (0,49 a 4,92 µM) (GEORGE, 1996).

As auxinas promovem o enraizamento, mas nem sempre a porcentagem de enraizamento e o número de raízes formadas podem ser maximizados com o aumento na concentração de auxina. A utilização de elevadas concentrações no meio nutritivo pode induzir à formação de calo na base dos explantes (ROGALSKI et al., 2003), o que é indesejável, pois a qualidade do sistema radicial pode ser afetada, principalmente no que se refere à conexão vascular com o explante, de modo a comprometer o sucesso da aclimatização das brotações (FACHINELLO et al., 1995). Consequentemente, às vezes, recomenda-se a utilização de dois meios nutritivos para promover o enraizamento. Primeiramente, as partes aéreas permanecem em meio com auxina, favorecendo a indução e, após, são transferidas para um meio sem auxina, estimulando-se, assim, a rizogênese e o crescimento das raízes. Esse processo tem sido adotado não somente em espécies de *Eucalyptus*, mas também, na maioria das espécies lenhosas, coníferas e frutíferas (FETT-NETO et al., 1992).

Diluições à $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$ e $\frac{1}{4}$ da composição original dos sais do meio nutritivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) são frequentemente utilizadas, assim como também o emprego do meio WPM (LLOYD; McCOWN, 1981). Este meio de cultura é utilizado para a indução de raízes por apresentar concentrações reduzidas de sais, tendo sido eficiente no enraizamento de várias espécies lenhosas (CHALUPA, 1987).

Pretendeu-se com o presente estudo avaliar o enraizamento *in vitro* de microestacas沿adas e a aclimatização das estacas enraizadas *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii*.

8.4 Material e métodos

Para a iniciação da fase de enraizamento, as brotações foram submetidas a três subcultivos, utilizando-se meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, de maneira a obter-se material em quantidade necessária e tamanho aproximado de 2,0 – 3,0 cm (Figura 22).

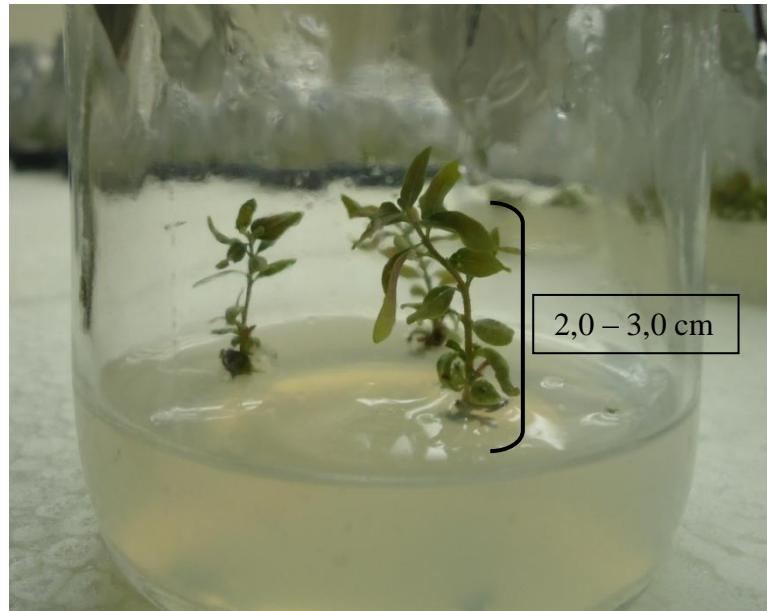


Figura 22 – Microestacas de *Eucalyptus dunnii* alongadas e prontas para a indução ao enraizamento *in vitro*.
Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

8.4.1 Efeito de AIB no enraizamento *in vitro* de microestacas de *Eucalyptus dunnii* em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS

As microestacas沿adas *in vitro* foram preparadas e inoculadas, sob condições assépticas, em frascos com capacidade para 150 ml, contendo 30 ml de meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Ao meio nutritivo MS foram adicionados 6 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, 50 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1 g L⁻¹ de carvão ativado e AIB, conforme o tratamento. O meio nutritivo foi preparado utilizando-se água deionizada e o pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem e da adição do ágar. Na sequência, os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados a 121°C (1,5 kgf cm⁻²) por 20 minutos.

Os frascos contendo os explantes inoculados (Figura 23) foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25°C ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 20 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia durante todo o experimento.

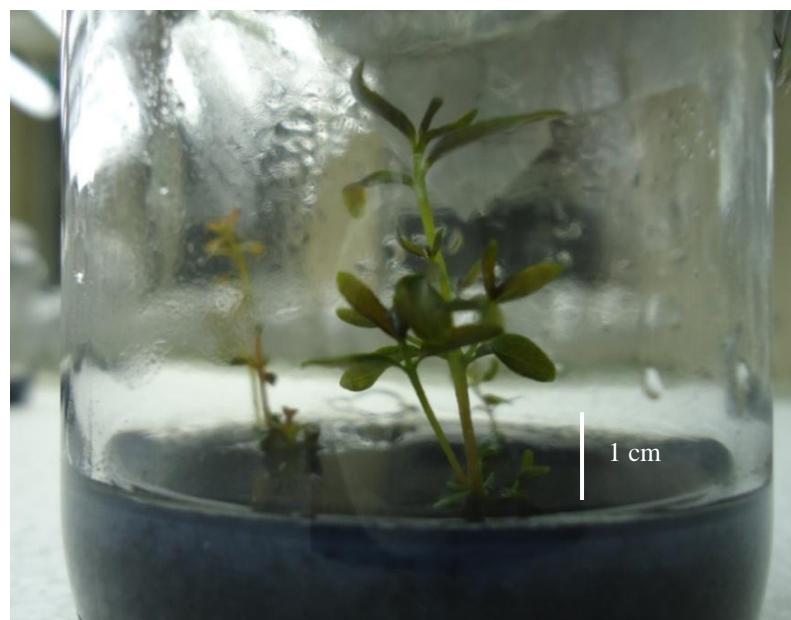


Figura 23 – Microestacas alongadas de *Eucalyptus dunnii* em processo de indução ao enraizamento em meio nutritivo ½ MS suplementado com carvão ativado e diferentes concentrações de AIB.
Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se um esquema bifatorial 4 x 5, em que os níveis do fator “A” referiram-se aos diferentes genótipos e os níveis do fator “B”, às concentrações de AIB avaliadas (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ – 0; 2,46; 4,92; 9,84 e 19,70 µM). Foram usadas cinco repetições, cada uma composta

por um frasco contendo três explantes, totalizando 100 unidades experimentais e 300 microestacas introduzidos *in vitro*.

Trinta dias após a inoculação dos explantes no meio nutritivo, foram avaliados a porcentagem de microestacas com raízes e o comprimento (mm) das raízes.

8.4.2 Efeito do tratamento pulso com AIB no enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* em meio nutritivo ½ WPM

As microestacas de maior tamanho, alongadas *in vitro*, foram selecionadas e sua extremidade basal, cortada em bisel duplo. As brotações foram submetidas ao tratamento de imersão lenta da base (0,5 cm) em soluções de AIB, conforme o tratamento, e dissolvidas com solução de Hidróxido de Sódio - NaOH 0,1N, conforme o tratamento, por 24 horas.

Após a imersão em AIB, as microestacas foram inoculadas, sob condições assépticas, em frascos com capacidade para 150 ml, contendo 30 ml de vermiculita e 20 ml de meio nutritivo ½ WPM (LLOYD; McCOWN, 1981) líquido.

Ao meio nutritivo ½ WPM (LLOYD; McCOWN, 1981) foram adicionados 20 g L⁻¹ de sacarose, 50 mg L⁻¹ de mio-inositol. O meio nutritivo foi preparado utilizando-se água deionizada e o pH foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem e da adição do ágar. Na sequência, os frascos foram vedados com papel alumínio e autoclavados a 121°C (1,5 kgf cm⁻²) durante 20 minutos.

Os frascos contendo os explantes inoculados (Figura 24) em meio nutritivo foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de 25°C ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 20 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia durante todo o experimento.

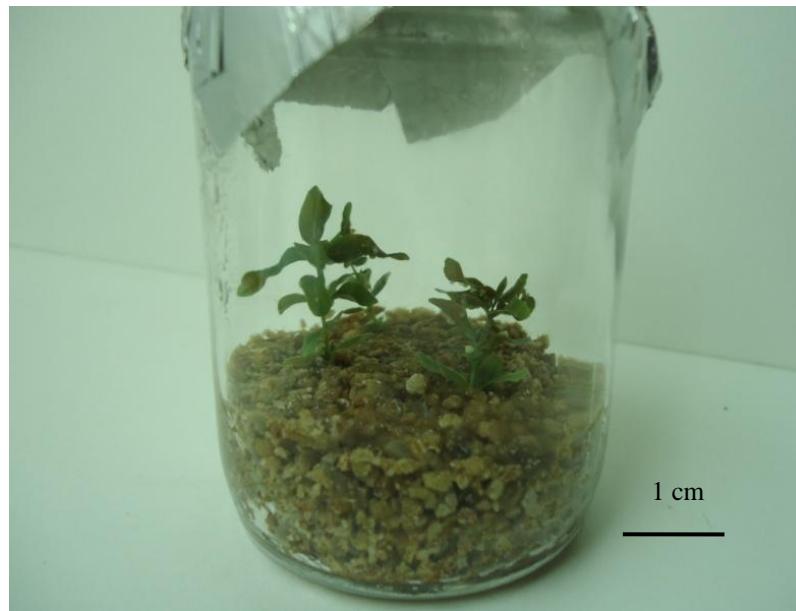


Figura 24 – Microestacas de *Eucalyptus dunnii* em processo de indução ao enraizamento em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM e vermiculita, após tratamento pulso na presença de diferentes concentrações de AIB. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se um esquema bifatorial 3 x 5, em que os níveis do fator “A” referiram-se aos diferentes genótipos e os níveis do fator “B”, às concentrações de AIB avaliadas (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ – 0; 2,46; 4,92; 9,84 e 19,70 µM). Foram usadas cinco repetições, cada uma composta por um frasco contendo dois explantes, totalizando 75 unidades experimentais e 150 microestacas introduzidas *in vitro*.

Trinta dias após a inoculação dos explantes foram avaliados a porcentagem de explantes com raízes e o comprimento (mm) das raízes.

8.4.3 Análises estatísticas

Em decorrência do número reduzido de explantes que responderam à indução ao enraizamento *in vitro*, não foram efetuadas análises estatísticas, sendo apenas descritos os resultados observados.

8.4.4 Aclimatização das microestacas de *Eucalyptus dunnii*

Após a avaliação do enraizamento, as microestacas enraizadas foram submetidas à aclimatização em copos plásticos contendo vermiculita, substrato Plantmax® e casca de arroz carbonizada, em iguais proporções. Os copos plásticos foram fechados com filme plástico e perfurados, na base, para a drenagem da água excedente. Os copos plásticos permaneceram em sala de cultivo com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas frias tipo luz do dia durante todo o experimento. A cada dois dias, os copos foram abertos e realizou-se a irrigação somente com água corrente.

Quinze dias após o início da aclimatização, procedeu-se a avaliação da sobrevivência das microestacas enraizadas.

8.5 Resultados e discussão

8.5.1 Efeito do AIB no enraizamento *in vitro* de brotações alongadas de *Eucalyptus dunnii* em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS

Não houve formação de raízes em nenhum dos tratamentos avaliados.

8.5.2 Efeito do tratamento pulso com AIB no enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*

A utilização de tratamento pulso com AIB e subsequente inoculação das microestacas em frascos contendo meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM (LLOYD; McCOWN, 1981) líquido e vermiculita não apresentou expressivo enraizamento. Somente três microestacas, de um total de 150, formaram raiz, sendo duas pertencentes ao genótipo 2 e, a outra, ao genótipo 3. As microestacas do genótipo 2 que formaram raiz foram cultivadas na presença de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ($9,84 \mu\text{M}$) de AIB durante 24 horas. O comprimento das raízes formadas nestas duas microestacas foi de, aproximadamente, 5 cm (Figura 25).



Figura 25 - Microestacas de *Eucalyptus dunnii* (genótipo 2) enraizadas em meio nutritivo $\frac{1}{2}\text{WPM}$ líquido e vermiculita, após tratamento pulso com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ($9,84 \mu\text{M}$) de AIB durante 24 horas. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

A terceira microestaca enraizada, do genótipo 3, apresentou comprimento de 5,5 cm (Figura 26) e foi cultivada na presença de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ ($19,70 \mu\text{M}$) de AIB durante 24 horas.



Figura 26 - Microestacas de *Eucalyptus dunnii* (genótipo 3) enraizadas em meio nutritivo $\frac{1}{2}$ WPM líquido e vermiculita, após tratamento pulso com $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ ($19,70 \mu\text{M}$) de AIB durante 24 horas. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

Esses resultados confirmam a recalcitrância desta espécie quanto ao enraizamento, conforme citam Alfenas (2004), Assis; Mafia (2007) e Paludzyszyn Filho et al. (2006). Outro fator que pode ter causado o baixo enraizamento é o potencial reativo dos explantes, ocasionado pelo elevado tempo de cultivo *in vitro*.

Considerando-se a reduzida resposta ao enraizamento, devem ser efetuados estudos adicionais para avaliar melhor o uso de vermiculita associado ao meio nutritivo, visto que este substrato apresenta potencialidade em comparação ao uso de meio nutritivo solidificado com ágar. A vermiculita propicia maior aeração das raízes, podendo promover maior rizogênese e um aumento no comprimento, aumentando o sucesso na fase posterior de aclimatização.

Os resultados observados estão de acordo com o que postula Malavasi (1994), que recomendou que os substratos devem ser suficientemente porosos para possibilitar uma boa aeração da estaca, pois o oxigênio é indispensável à respiração resultante dos processos de emissão de raízes; e, ao mesmo tempo, devem armazenar quantidade de água suficiente para o desenvolvimento da planta. Em espécies com dificuldade de enraizamento o meio utilizado para este fim tem influência direta sobre a capacidade de emissão de raízes (PAIVA; GOMES, 1995).

8.5.3 Aclimatização

Duas das três microestacas enraizadas e submetidas à aclimatização sobreviveram. A microestaca do genótipo 3 (Figura 27A) destacou-se pelo excelente desenvolvimento apresentado. A microestaca do genótipo 2 apresentou um desenvolvimento relativamente inferior àquele da microestaca do genótipo 3 (Figura 27B).

Considerando-se a sobrevivência e o desenvolvimento das microestacas é possível afirmar que a fase de enraizamento constituiu-se no maior problema da micropopulação do *Eucalyptus dunnii*, uma vez que, após enraizadas, as microestacas atingem desenvolvimento adequando e em curto espaço de tempo.

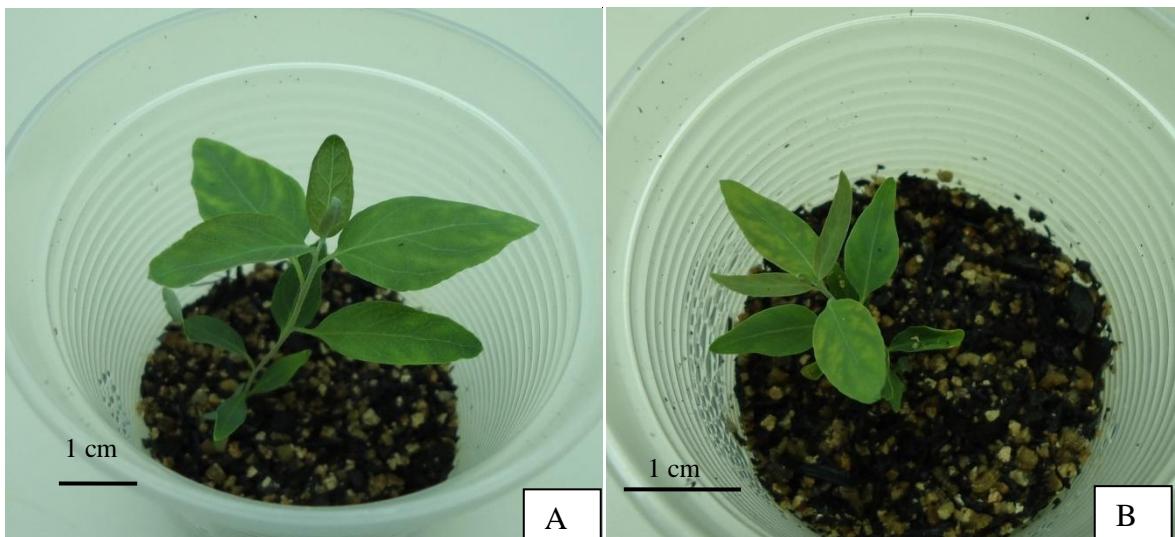


Figura 27- Microestacas de *Eucalyptus dunnii* aclimatizadas em copos plásticos em substrato composto por vermiculita, Plantmax® e casca de arroz carbonizada. A- Microestaca do genótipo 3. B - Microestaca do genótipo 2. Santa Maria-RS/UFSM, 2010.

8.6 Conclusões

No meio nutritivo $\frac{1}{2}$ MS, a adição de AIB não tem efeito no enraizamento *in vitro* de microestacas de *Eucalyptus dunnii*.

O emprego de vermiculita associada ao meio nutritivo ½WPM (LLOYD; McCOWN, 1981) líquido, após tratamento pulso com solução de AIB, apresenta potencialidade como substrato para o enraizamento de microestacas de *Eucalyptus dunnii*.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho forneceu fundamentação científica para a propagação *in vitro*, e auxiliará o desenvolvimento de metodologias de base biotecnológica e de protocolos de propagação vegetativa por micropopragação para *Eucalyptus dunnii*.

Apesar da elevada contaminação microbiana e oxidação fenólica dos explantes retirados das estacas coletadas a campo, foi possível o estabelecimento *in vitro* de genótipos superiores selecionados em plantio comercial. Em todas as fases da micropopragação houve diferenças genotípicas. Muitos genótipos apresentaram comportamento distinto em cada fase, podendo multiplicar-se muito bem, mas não apresentar um adequado alongamento.

Para o controle da contaminação fúngica e bacteriana em segmentos caulinares apicais de *Eucalyptus dunnii* recomenda-se a imersão em hipoclorito de sódio a 1,5% durante 15 minutos. Devem ser estudadas alternativas para minimizar o efeito negativo desta concentração na oxidação fenólica dos explantes. O controle da contaminação bacteriana em segmentos caulinares intermediários e basais deve ser melhor estudado.

O protocolo de micropopragação para as fases de multiplicação e alongamento *in vitro* de alguns genótipos de *Eucalyptus dunnii*, principalmente dos genótipos 7 e 3, desenvolvido no presente trabalho, pode ser considerado expressivo. Contudo, ajustes aos demais genótipos avaliados e, principalmente, no estabelecimento *in vitro* destes e de outros, adicionais; serão necessários para que se desenvolva um protocolo eficiente para o cultivo *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*.

A fase de enraizamento é uma das mais importantes em espécies florestais, especialmente nas espécies como *Eucalyptus dunnii*, que apresentam grande recalcitrância ao enraizamento, a exemplo de outras espécies de *Eucalyptus* que apresentam maior resistência ao frio.

Apesar da reduzida formação de raiz, a utilização de vermiculita associada ao meio nutritivo parece ser a forma mais adequada para promover o enraizamento *in vitro* em *Eucalyptus dunnii*. A diminuição do tempo de cultivo *in vitro* também poderá contribuir com o aumento da rizogênese, visto que as microestacas avaliadas já estavam há mais de 10 meses em cultivo *in vitro*, sendo possível observar a diminuição da sua responsividade. Outro fator que, talvez, contribua para aumentar o enraizamento, é a seleção de genótipos com maior capacidade rizogênica. No presente trabalho somente dois genótipos enraizaram, a utilização

de material destes genótipos para futuros estudos tem potencialidade para gerar resultados promissores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 442p.

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.

ANDRADE, M.W. et al. Micropropagação de aroeira (*Myracrodrun urundeuva* Fr. Allemao). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174 - 180, jan./mar. 2000.

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

ASSIS, T. F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, v. 18, n. 185, p. 32-51, 1996.

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. (Eds.). **Plantation forest biotechnology for the 21th century.** Kerala, India: Research Signposts, 2004. p. 303-333.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF:** ano base 2009. Brasília: ABRAF, 2010.

BARRUETO CID, L.P. Citocininas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais.** Brasília: Embrapa/Cenargen, 2000. p. 55 - 81.

BASSAN, J. S. **Comportamento *in vitro* de canafístula [(*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert)].** 2006. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2006.

BERTAZZA, G.; BARALDI, R.; PREDIERI, S. Light effects on in vitro rooting of pear cultivars of different rhizogenic ability. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 41, p. 139-143, jan., 1995.

BERTOLUCCI, F. L. G., PENCHEL, R. M. Clonagem de eucalipto: efeitos sobre a produtividade e qualidade da madeira. **Ciência Hoje**, v. 16, n. 91, p. 16-21, 1991.

BILLARD, C. E.; LALLANA, V.H. Multiplicación in vitro de *Eucalyptus dunnii*. **Ciencia, Docència y Tecnologia**, n. 30, Ano XVI, mayo 2005.

BISHT, P. et al. Micropropagation of newly produced F₁ hybrid of *Eucalyptus* (*E. tereticornis* Sm. x *E. camaldulensis* Dehn. Southern Form). **Silvae Genetica**, v.48, n.2, p.104-108, 1999.

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** [online]. vol.33, n.1, p. 11-19. 2009.

BRONDANI, G.E. **Miniestaquia e micropopragação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage X *Eucalyptus dunnii* Maiden.** 2008. 129 P. Dissertação (Mestrado Engenharia Florestal) Universidade Federal do Paraná, 2008.

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.

CARDOSO, G. V.; FRIZZO, S. M. B.; ROSA, C. A. B.; FOELKEL, C. E. B.; ASSIS, T. F.; OLIVEIRA, P. Variação na densidade básica da madeira de *Eucalyptus globulus* no sentido longitudinal da árvore. In: CONGRESSO E EXPOSIÇÃO ANUAL DE CELULOSE E PAPEL, 35, 2002, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ABTCP, 2002. p. 1-4.

CARVALHO, D. de. **Micropopragação de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden , através da cultura in vitro de segmentos nodais.** 1988. 79 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Lavras, MG, 1988.

CHALUPA, V. European hardwoods. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 224-246.

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

COOPER, M. A.; GRAÇA, M. E. C. **Enraizamento de estacas de *Eucalyptus dunnii* Maiden.** Colombo, PR: EMBRAPA/CNPQ, 1994. 15 p. (Circular Técnica, 22).

COOPER, M. A.; GRAÇA, M. E. C. **Perspectivas para a maximização de enraizamento de estacas de *Eucalyptus dunnii* Maiden.** Curitiba, PR: EMBRAPA/CNPQ, 1987. 9 p. (Circular Técnica, 12).

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

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

DE KLERK, G.J.; TERZI, M.; CELLA, R.; FALAVIGNA, A. Hormone requirements during the successive phases of rooting of *Malus* microcuttings. **Current tissues in plant molecular and cellular biology**, p.111-116, 1995.

DODDS, J.H.; ROBERTS, L.W. **Experiment in plant tissue culture.** 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 1995. 256 p.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN,E.; FORTES, G. R. L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado.** 2. ed. Pelotas: UFPEL, 1995. 178 p.

FERREIRA, D.F. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0.** In...45^a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria. UFSCar, São Carlos, SP, Julho de 2000. p.255-258.

FERREIRA, M. Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal. **IPEF**, v.45, p.22-30, 1992.

FETT NETO,A.G.; TEIXEIRA, S.L.; SILVA, E.A.M.; SANTNNA, R. Biochemical and morphological changes during *in vitro* rhizogenesis in cuttings of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 140, p. 720-728, 1992.

FONSECA, E. P. **Padrão de qualidade de mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume., *Cedrela fissilis* Vell. e *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. produzidas sob diferentes períodos de sombreamento.** Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2000. 113 p. Tese (Doutorado) _ Universidade Estadual Paulista, 2000.

GAHAN, P. B.; GEORGE, E. F. Adventitious regeneration. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht, The Netherlands: Springer , p. 355-402. v. 1. 2008.

GEORGE, E. F. Plant grow regulators: Plant propagation by tissue culture. **Exegetics**, Edington. XI, p. 420-479. 1996.

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

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure: background. In: GEORGE, E. V.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. Springer, Dordrecht, The Netherlands. p. 1-28. v. 1. 2008.

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

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

GONZAGA, J.V. **Qualidade da madeira e da celulose Kraft de treze espécies de Eucalyptus**. Viçosa: UFV. 1983. 119 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais. Universidade Federal de Viçosa, 1983.

GRAÇA, M. E. C. et al. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron na multiplicação “in vitro” de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.43, p.107-112, 2001.

GRAÇA, M. E. C.; TOTH, V. B. dos R. Rebrota de *Eucalyptus dunnii*: a influência da altura, diâmetro e procedência no vigor das brotações. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 20, p. 49-57, 1990.

GRATTAPAGLIA, D.; ASSIS, T.F.; CALDAS, L.S. Efeito residual de BAP (6-benzilaminopurina) e NAA (ácido naftalenoacético) na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2, 1987, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1987. p. 8.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p.183-260.

GRIBBLE, K. The influence of relative humidity on vitrification, growth and morphology of *Gypsophila paniculata* L. **Plant Growth Regulation**, v.27, p.179-88, 1999.

HALDEMANN, J. H., THOMAS, R. L., McKAMY, D. L. Use of benomyl and rifampicin for in vitro shoot tip culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. **Scientia Horticult.**, v. 22, p.306-307, 1987.

HAN, B.H.; PAEK, K.Y.; CHOI, J.K. Micropopagation of *Gypsophila paniculata* through shooty tip culture in vitro. **Journal of Korean for Society for Horticultural Science**, v.32, n.4 p. 394-400, 1991.

HANDLEY, L.W.; BECWAR, M.R. et al. Research and development of commercial tissue culture systems in loblolly pine. **Tappi Journal**, Atlanta, v.78, n.5, p. 169-175, 1995.

HANSEL, F.A.; DUTRA, L. F.; WENDLING, I. **Ápices caulinares como alternativa para o resgate de matrizes adultas de *Eucalyptus benthamii* diretamente do campo: resultados preliminares**. Colombo: Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 153). 2005.

HARTMANN, H. T., KESTER, D. E., DAVIES JUNIOR, F. T., GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770p.

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

HIGA, R.C.V. **Avaliação e recuperação de *Eucalyptus dunnii* atingidos por geadas em campo Tenente, Paraná**. 1998. 100f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

HINOJOSA, G.F. Auxinas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa/Cenargen, 2000. p. 15 - 53.

HUANG, Z.C.; F.-H. ZENG,; X.-Y. LU. Efficient regeneration of *Eucalyptus urophylla* from seedling-derived hypocotyls. **Biologia plantarum** v.54 (1): p.131-134, 2010.

JAIN, S. M. Biotechnology of industrially important tree species in developing countries. In: WATANABE, K. N.; PEHU, E. **Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity.** Austin, Texas, U.S.A.: Academic Press, 1997. p. 227 - 238.

JOSHI, I. et al. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F₁ hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. X *E. grandis* Hill ex Maiden). **Silvae Genetica**, v.52, n.3-4, p.110-113, 2003.

JOVANOVIC, T.; ARNOLD, R.; BOOTH, T. Determining the climatic suitability of *Eucalyptus dunnii* for plantations in Australia, China and Central and South America. **New Forests**, v. 19, n. 3, p. 215-226, 2000.

JOVANOVIC, T.; BOOTH, T. H. **Improved species climatic profiles.** Australia: Union Offset Printing: Joint Venture Agroforestry Program, Rural Industries Research and Development Corporation, 2002. 68 p.

LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, A.K. Explantes de cupuaçuzeiro submetidos a diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 604 - 607, dez. 2002.

LEIFERT, C., RITCHIE, J. Y., WAITES, W. M. Contaminants of plant tissue and cell cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 452-469, 1991.

LEITE, N.B.; FERREIRA, M.; RAMOS, P. G. D. **Efeito de geadas sobre diversas espécies e procedências de *Eucalyptus spp* introduzidas na região de Lages - Santa Catarina.** Piracicaba: IPEF, 1973. p. 123. (IPEF. Circular Técnica, 7).

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountains laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Washington, v. 30, p. 327 - 421, 1981.

MALAVASI, U. C. Macropropagação vegetativa de coníferas: perspectivas biológicas e operacionais. **Floresta e ambiente**, v. 1, n.1, p.1331 – 135, 1994.

MATSUMOTO, K. Giberelinas. In: BARRUETO CID, L.P. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais.** Brasília: Embrapa/Cenargen, 2000. p. 83 - 105.

MEDEIROS, C.P.C. **Indução *in vitro* de respostas morfogenéticas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.).** 1999. 79f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MÉTRAUX, J. P. Gibberellins and plant cell elongation. In: DAVIES, P. J. (Ed). **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, p. 296-317, 1987.

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

MURALIDHARAN, E.M.; KALLARACKAL, J. Current trends in Forest tree biotechnology. In: SRIVASTAVA, P.S.; NARULA, A.; SRIVASTAVA, S. (Eds.).**Plant Biotechnology and Molecular Markers**. New Delhi: Anamaya publishers, 2004. p. 169 - 182.

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

PAEK, K.Y.; HAN, B.H.; CHOI, J.K. Physiological biochemical and morphological characteristics of vitrification shoot regenerated *in vitro*. **Korean Journal of Plant Tissue Culture**, v.18, n.3, p.151-162, 1991.

PAIVA, H.N., GOMES, J. M., COUTO, L., SILVA, A. R. Propagação vegetativa de eucalipto por estacaia. **Informe Agropecuário**, v. 18, n. 185, p. 23-27, 1996.

PAIVA, H.N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa: UFV, 1995. 40 p. (UFV. Boletim, 322).

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. **Considerações sobre o plantio de *Eucalyptus dunnii* no estado do Paraná**. Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2005. 7 p. (Comunicado Técnico, 141).

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

PEREZ, L.E.P.; KERBAUY, G.B. Citocininas. In: KERBAUY, G.B. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 250-278.

PIERIK, R.L.M. Vegetative propagation. In: ***In vitro* culture of higher plants**. [S.I.]: International Association for Plant Tissue Culture, 1990. p.183-230.

RATNIEKS, E., ASSIS, T.F. **Análise tecnológica de madeiras potenciais para celulose na Riocell.** Guaíba: Riocell, 14 p. 1992. (Relatório Técnico, 519).

RESENDE, M.D.V. de; DUARTE, J.B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, p.182-194, 2007.

RESENDE, M.D.V. Melhoramento de espécies perenes. In: NASS, L.L. et al. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas.** Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 356 - 421.

ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A.; FELISBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. Enraizamento in vitro de porta-enxertos de *Prunus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n.2, p. 293-296, ago., 2003.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Biotecnologia: princípios e aplicações. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria.** Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 25 - 74.

SEVERO, E. T. D.; TOMASELLI, I. Efeito da vaporização em madeira de *Eucalyptus dunnii* sobre algumas propriedades mecânicas. **Ciência Floresta**, v. 10, n. 2, p.123-133, 2000.

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

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

STORCK, L., CARGNELUTTI FILHO, A.; LÚCIO, A. D.; MISSIO, E. L.; RUBIN, S.A.L. Avaliação da precisão experimental em ensaios de competição de cultivares de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 572-578, maio/jun., 2010.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas.** Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2005.

TERMIGNONI, R.R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2005. 182 p.

THINLEY, C. et al. Spiral and interlocking grain in *Eucalyptus dunnii*. **Holz als Roh – und Werkstoff**, v. 63, n. 5, p. 372-379, 2005.

TITON, M. **Propagação clonal de Eucalyptus grandis por miniestaqueia e microestaqueia**. 2001. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

TZFIRA, T.; ZUKER, A.; ALTMAN, A. Forest-tree biotechnology: genetic transformation and its applications to future forests. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 16, n. 10, p. 439 - 446, October 1998.

WATANABE, K. N.; RAMAN, K.V. Plant biotechnology and plant genetic resources: a global perspective. In: WATANABE, K. N.; PEHU, E. **Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity**. Austin, Texas, U.S.A. Academic Press, 1997. p. 1 - 13.

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

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

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

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds.) **Micropropagation: technology and application**. London: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.45-69.