

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

**Macronutrientes, aspectos nutricionais e bioquímicos no crescimento
de brotações de *Eucalyptus grandis in vitro***

Diva Correia

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Recursos Florestais, com opção em Silvicultura e Manejo
Florestal**

**Piracicaba
2006**

Diva Correia
Biólogo

**Macronutrientes, aspectos nutricionais e bioquímicos no crescimento
de brotações de *Eucalyptus grandis in vitro***

Orientador:
Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Recursos Florestais, com opção em Silvicultura e Manejo
Florestal**

Piracicaba
2006

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Correia, Diva

Macronutrientes, aspectos nutricionais e bioquímicos no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis in vitro* / Diva Correia. - - Piracicaba, 2006.
175 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Carboidratos 2. Cultivo "in vitro" 3. Eucalipto 4. Nutrição mineral 5. Proteínas
I. Título

CDD 634.9734

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

A Deus, ofereço...

Aos meus pais, Domingos (*in memoriam*) e Luíza, dedico como reconhecimento ao amor que sempre dedicaram a seus filhos e aos alicerces da formação que têm orientado nossos caminhos!

Agradecimentos

Ao professor Antônio Natal Gonçalves pela orientação, amizade, confiança e estímulos à elaboração deste trabalho.

Ao professor Carlos Tadeu dos Santos Dias pela forma gentil e sempre solícita com que orientou as análises estatísticas dos dados.

Ao professor Marcílio de Almeida, professora Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez e Dra. Sandra Cristina Capaldi Arruda, integrantes da banca de qualificação, pelas sugestões.

Ao Biólogo Edson Namita Higashi (*in memoriam*) pelas informações, aprendizado, dedicação, convívio com alegria, essenciais à realização desta pesquisa; e, para sempre, amigos!

Aos amigos e excepcionais profissionais, Eng. em Madeira Roger Alonso Moya Roque, Eng. Florestal Carlos David Vera Bravo, Eng. Agr. Milton Ferreira de Moraes e Eng. Agr. José Lavres Júnior pela elaboração e auxílio em diferentes análises, como também, às valiosas sugestões.

Às amigas Maureen Voiglaender e Clotilde Maria Batochio e aos amigos Luís Eduardo Facco e Jefferson Lordello Polizel pelo apoio, dedicação de tempo, auxílio à formatação das diferentes etapas deste trabalho.

Ao Biólogo Vanderlei Stefanuto pelo auxílio nas análises bioquímicas, a Eng. Florestal Cláudia M. Lima pela especial ajuda na avaliação do último experimento e ao técnico José Roberto Romanini pelo apoio logístico durante a realização dos experimentos.

Aos amigos da Embrapa Maria Pinheiro, Antônio Cristiano Almeida Paula, Antônio Teixeira Cavalcanti Júnior, Janice Ribeiro, José Luís Mosca, João Paiva, Newton Fonseca Barroso, Maria Auxiliadora Afonso Alves e Rita de Cássia Costa Cid e, Cleuza Pereira Cabral (CENA/USP) pelos estímulos, apoio logístico tanto em assuntos profissionais quanto particulares.

Aos amigos do curso e/ou laboratório: Shoey Kanashiro, Maria Lúcia Lima, Wirifran Andrade, Juliana de Oliveira Fernandes Viana, Daruska Cardim e Saulo Aidar pelo estímulo, apoio e companheirismo.

À minha família pelo apoio, confiança, carinho e estímulos contínuos na conquista de mais esta etapa profissional e pessoal na minha vida.

A RR Agroflorestal, em especial ao Eng. Florestal Ronaldo Luiz Vaz de Arruda Silveira e professor Ronaldo Ivan Silveira pelo apoio e atenção.

Ao Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais, em especial ao Setor de Sementes, em nome do Biólogo Israel Gomes Vieira, pelo fornecimento das sementes selecionadas.

Ao Departamento de Ciências Florestais ESALQ/USP, em especial aos professores do programa de Pós-graduação em Recursos Florestais e equipe de colaboradores, pelos ensinamentos, apoio constante e amizade.

A Embrapa Agroindústria Tropical pela oportunidade de realizar o Curso de Doutorado.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desta Tese de Doutorado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 DESENVOLVIMENTO.....	12
2.1 Revisão bibliográfica.....	12
2.1.1 <i>Eucalyptus</i> e sua importância no segmento de florestas plantadas.....	12
2.1.2 Cultura <i>in vitro</i> de <i>Eucalyptus grandis</i> e híbridos com esta espécie.....	13
2.1.3 Nutrição mineral <i>in vitro</i>	15
2.1.3.1 Meio de cultura.....	15
2.1.3.2 Absorção mineral e o crescimento <i>in vitro</i>	19
2.1.3.3 Nutrientes minerais e o crescimento <i>in vitro</i>	23
2.1.3.4 Nutrientes minerais e teores nutricionais em <i>Eucalyptus</i> cultivados <i>in vitro</i>	38
2.1.3.5 Nutrientes minerais e aspectos bioquímicos em <i>Eucalyptus</i> cultivados <i>in vitro</i>	42
2.1.4 Interação iônica.....	45
2.1.5 Equilíbrio iônico dos meios de cultura pela técnica de especiação iônica.....	46
2.2 Material e métodos.....	47
2.2.1 Material vegetal.....	47
2.2.2 Desinfestação das sementes.....	47
2.2.3 Obtenção de plântulas <i>in vitro</i>	48
2.2.4 Estabelecimento da cultura <i>in vitro</i>	48
2.2.5 Experimento realizado.....	49
2.2.5.1 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	49
2.2.5.1.1 Definição dos tratamentos.....	50
2.2.5.1.2 Análise estatística do crescimento de brotações em função de períodos de cultivo	51
2.2.5.1.3 Análises estatísticas de crescimento, de teores de nutrientes minerais e de parâmetros bioquímicos em brotações aos 21 dias de cultivo <i>in vitro</i>	51
2.2.6 Condução do experimento.....	53
2.2.6.1 Suplementação dos meios de cultura.....	53
2.2.6.2 Caracterização do explante-padrão.....	53
2.2.6.3 Variáveis analisadas.....	53
2.2.6.3.1 Relacionadas ao crescimento.....	53
2.2.6.3.2 Análise dos nutrientes minerais do material vegetal.....	54
2.2.6.3.3 Análise bioquímica do material vegetal.....	54

2.2.6.4	Análise do equilíbrio iônico dos meios de cultura.....	57
2.3	Resultados e discussão.....	58
2.3.1	Análise do equilíbrio iônico dos meios de cultura.....	58
2.3.2	Crescimento de brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de macronutrientes em função do período de cultivo.....	63
2.3.2.1	Valores de pH.....	63
2.3.2.2	Observações visuais.....	67
2.3.2.3	Efeito de macronutrientes.....	72
2.3.2.3.1	Nitrogênio.....	72
2.3.2.3.2	Fósforo.....	78
2.3.2.3.3	Potássio.....	82
2.3.2.3.4	Cálcio.....	86
2.3.2.3.5	Magnésio.....	90
2.3.2.3.6	Enxofre.....	94
2.3.2.3.7	Considerações.....	98
2.3.3	Crescimento de brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo.....	99
2.3.4	Teores de nutrientes minerais em brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo.....	108
2.3.4.1	Teor de macronutrientes e interações.....	108
2.3.4.2	Teor de micronutrientes.....	122
2.3.5	Teores de parâmetros bioquímicos nas brotações de <i>Eucalyptus grandis</i> cultivadas <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo.....	127
2.3.5.1	Teor de carboidratos não-estruturais solúveis totais.....	127
2.3.5.2	Teor de proteínas solúveis totais.....	129
2.3.5.3	Teor de prolina.....	131
2.3.6	Análise multivariada por componentes principais ‘biplot’.....	132
3	CONCLUSÕES.....	137
	REFERÊNCIAS.....	138
	ANEXOS.....	152

RESUMO

Macronutrientes, aspectos nutricionais e bioquímicos no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* *in vitro*

Os objetivos deste estudo foram avaliar o equilíbrio iônico dos meios de cultura, o crescimento, aspectos nutricionais e bioquímicos em brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas em meio líquido suplementado com nitrogênio (17,3; 26,0; 39,0 e 58,5 mmol L⁻¹), fósforo (2,0; 3,0; 4,5 e 6,75 mmol L⁻¹), potássio (7,5; 11,0; 16,5 e 24,75 mmol L⁻¹), cálcio (3,3; 5,0; 7,5 e 11,25 mmol L⁻¹); magnésio (2,0; 3,0; 4,5 e 6,75 mmol L⁻¹) e enxofre (2,29; 3,29; 4,79 e 7,04 mmol L⁻¹). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente aleatorizado com 19 tratamentos. As massas fresca e seca, porcentagem de massa seca, taxa de crescimento relativo, pH dos meios de cultura foram avaliadas semanalmente durante 21 dias de cultivo e teores de nutrientes minerais, carboidratos não-estruturais solúveis totais, proteínas solúveis totais e prolina foram avaliados aos 21 dias de cultivos. O equilíbrio iônico dos meios de cultura mostrou alterações em função do macronutriente e concentração utilizada. Fósforo e cálcio foram os que mais influenciaram as estimativas da especiação iônica. A morfogênese das brotações foi afetada pelo macronutriente e concentração utilizada. Concentrações a partir de 39 mmol L⁻¹ de nitrogênio, 4,5 mmol L⁻¹ de fósforo, 16,5 mmol L⁻¹ de potássio, 7,5 mmol L⁻¹ de cálcio, 6,75 mmol L⁻¹ de magnésio e 4,79 mmol L⁻¹ de enxofre mostraram-se excessivas. O meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995) contendo, em mmol L⁻¹, 26,0 (N), 3,0 (P), 11,0 (K), 5,0 (Ca), 3,0 (Mg) e 3,0 (S) apresentou crescimento ótimo das brotações, mas não o crescimento máximo. As massas frescas e secas apresentaram incrementos ao longo do período de cultivo e maiores taxas de crescimento relativo durante os primeiros 7 dias de cultivo. Variações das concentrações dos macronutrientes em meios de cultura promoveram respostas diferenciadas para teores de macronutrientes e de micronutrientes na massa seca de brotações. Teores de carboidratos não-estruturais solúveis totais, proteínas solúveis totais e prolina da massa fresca das brotações variaram em função do macronutriente e concentração utilizada aos 21 dias de cultivo.

Palavras-chaves: nutrição mineral, interações iônicas, *in vitro*, carboidratos não-estruturais solúveis totais, proteínas solúveis totais, prolina

ABSTRACT

Macronutrients, biochemical and nutritional aspects of *Eucalyptus grandis* shoot growth *in vitro*

The aim of this work were to evaluate the ionic equilibrium of the culture media, biochemical and nutritional aspects of *Eucalyptus grandis* shoot growth in liquid media supplemented with nitrogen (17,3; 26,0; 39,0 and 58,5 mmol L⁻¹), phosphate (2,0; 3,0; 4,5 and 6,75 mmol L⁻¹), potassium (7,5; 11,0; 16,5 and 24,75 mmol L⁻¹), calcium (3,3; 5,0; 7,5 and 11,25 mmol L⁻¹); magnesium (2,0; 3,0; 4,5 e 6,75 mmol L⁻¹) and sulphate (2,29; 3,29; 4,79 and 7,04 mmol L⁻¹). The experiment was carried out on a completely randomized statistical design with 19 treatments. The fresh weight, the oven dry weight, the dry weight percentage, the relative growth rate and the pH value were weekly evaluated for 21 days culture period. Mineral nutrients contents, total soluble non-structural carbohydrate, total soluble protein and proline were determined at the 21st day of culture. The ionic equilibrium of the culture media showed alterations in functions of the macronutrient and concentration utilized. Concentration from nitrogen 39 mmol L⁻¹, phosphate 4,5 mmol L⁻¹, potassium 16,5 mmol L⁻¹, calcium 7,5 mmol L⁻¹, magnesium 6,75 mmol L⁻¹ and sulphate 4,79 mmol L⁻¹ showed to be excessives. The culture medium JADS (CORREIA et al., 1995) composition (N 26,0; P 3,0; K 11,0; Ca 5,0; Mg 3,0, and S 3,0 mmol L⁻¹) showed the optimum shoot growth, but not the maximum growth rate. The fresh and oven dry weight production showed increment along the culture period and the relative growth rates were higher at the first week of culture. Variations on the macronutrient concentrations in the culture media showed diferentiated response to the mineral nutrient content in the shoot dry mass. Fresh mass content of total soluble non-structural carbohydrate, total soluble protein and proline showed variations in function of the macronutrients and of the concentration utilized at the 21st day of culture.

Key words: mineral nutrition, ionic interations, *in vitro*, total soluble non-structural carbohydrate, total soluble protein, proline

1 INTRODUÇÃO

A propagação *in vitro* de espécies florestais tem destaque entre as técnicas utilizadas na propagação de clones e de mudas. A possibilidade de obter ganhos genéticos, selecionar *in vitro* genótipos para diferentes características, rejuvenescer e multiplicar rapidamente genótipos selecionados são algumas vantagens relevantes, principalmente quando aplicadas em programas de melhoramento genético florestal.

Os avanços dos sistemas de cultivo *in vitro* são necessários e dependem do aprofundamento de conhecimentos nas áreas de fisiologia, bioquímica e biologia molecular relativos à espécie. Além dos hormônios, um dos fatores que mais influencia e determina o rendimento da produtividade *in vitro* é o equilíbrio nutricional do meio de cultura e a sua interação com o material genético ou explante. A maioria dos meios de cultura é definida de forma empírica e não apresenta especificidade quanto a necessidades nutricionais da espécie, sendo muitas vezes, o fator limitante nos processos morfogênicos. Adicionalmente, é comum o uso de uma única formulação de nutrientes em todas as fases de cultivo *in vitro*, sendo que tal formulação pode não ser favorável ao crescimento ótimo e máximo nas diferentes etapas do processo.

A determinação das variações na composição de nutrientes do meio de cultura para o crescimento dos explantes permite obter informações importantes que podem ser aplicadas à melhoria do meio nutritivo objetivando a otimização do crescimento.

A absorção de nutrientes minerais em plantas depende da quantidade e da forma na qual os íons estão disponíveis à planta e a sua interface com a fonte, quantidade e a seletividade no processo de absorção. Os princípios básicos da absorção de nutrientes minerais aplicam-se para plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, diferenças nas condições fisiológicas e ambientais entre plantas *in vitro* e *in vivo* interferem nos processos de absorção. Tais diferenças relacionam-se com o ambiente químico e físico do meio de cultura, condições atmosféricas no frasco de cultura, especialmente quanto à umidade e o tipo de material vegetal em cultivo.

Sistema de cultivo *in vitro* apresenta uma dinâmica natural onde o seu sucesso depende do tempo do subcultivo e subcultivos sucessivos que desencadeiam uma pressão de seleção à cultura. Assim, quanto mais adequado estiver o ambiente físico e químico do sistema com relação à planta, melhor será o seu desenvolvimento *in vitro*.

Desta forma, postulou-se a seguinte hipótese: a) macronutrientes apresentam papel diferenciado no crescimento de brotações *in vitro*; b) a quantidade e a fonte do macronutriente utilizadas na composição dos meios de cultura estabelecem interações iônicas que interferem na morfogênese ou padrão de crescimento das brotações; c) o equilíbrio iônico do meio de cultura pode alterar o crescimento, os teores dos nutrientes minerais nos tecidos vegetais, de carboidratos não-estruturais solúveis totais, de proteínas solúveis totais e de prolina nas brotações.

Os objetivos deste estudo foram: analisar o equilíbrio iônico dos meios de cultura utilizando a técnica da especiação iônica e avaliar o crescimento das brotações a cada 7 dias, durante 21 dias de cultivo, os teores dos nutrientes minerais nos tecidos vegetais, de carboidratos não-estruturais solúveis totais, de proteínas solúveis totais e de prolina em brotações de *Eucalyptus grandis* Hill (Ex Maiden) cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre, aos 21 dias de cultivo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 *Eucalyptus* e sua importância no segmento de florestas plantadas

A cultura de eucalipto representa a maior área de florestas plantadas nas regiões de clima tropical e subtropical associada principalmente à produção de celulose, carvão, chapas e lenha, sendo amplamente utilizada em reflorestamentos no Brasil, Índia, África do Sul, Portugal, Angola, Espanha e China (MOURA; GUIMARÃES, 2003). O Brasil possui, aproximadamente, 5 milhões de hectares de florestas plantadas, das quais, 64% são florestas de eucalipto (PINTO JÚNIOR, 2004). *Eucalyptus grandis* é a espécie mais cultivada no Brasil devido a seu rápido crescimento, características silviculturais, propriedades tecnológicas da madeira e importância econômica (MOURA; GARCIA, 2000).

A principal vantagem competitiva do Brasil é a sua tecnologia florestal baseada em programas de melhoramento genético e de multiplicação clonal de eucalipto desenvolvida nos últimos 30 anos (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000). Com esse nível de tecnologia, o Brasil tornou-se o maior produtor mundial de celulose (cerca de 6,3 milhões de toneladas/ano) e alcançou um índice médio de produtividade em torno de 40 m³ hectare ao ano com alta qualidade de fibras e polpa de madeira; a rotação pode ser reduzida para 5 anos de idade, sendo manejada, economicamente, em até três rotações sucessivas (IPEF, 2005). Com o desenvolvimento da clonagem em eucalipto, a técnica de micropropagação teve ampla aplicação, principalmente por permitir a reversão a juvenilidade (GONÇALVES, 1980), obtenção de um número maior de plantas para uso na microestaquia e/ou de brotações rejuvenescidas para uso na miniestaquia (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000; XAVIER et al., 2001).

A indústria florestal representa 3,0% do comércio global e 1,0% dos investimentos mundiais de capital direto. Adicionalmente, gera empregos para cerca de 1,29 milhões de pessoas. Em 2004, do total das exportações do agronegócio brasileiro, 16% (US\$ 5 bilhões) corresponderam em produtos florestais, predominantemente originados de florestas plantadas de eucalipto e de *Pinus*. Desta forma, o setor destaca-se como o segundo colocado entre os produtos agrícolas de exportação. No Estado de São Paulo, esse segmento, encontra-se em terceiro lugar entre os produtos de exportação (IPEF, 2005).

2.1.2 Cultura *in vitro* de *Eucalyptus grandis* e híbridos com esta espécie

Na década de 70, surgiram os primeiros estudos relacionados à cultura *in vitro* de *Eucalyptus grandis* (DE FOSSARD, 1974; CRESSWELL; DE FOSSARD, 1974; CRESSWELL; NITSCH, 1975; CRESSWELL; NITSCH, 1977). Grande parte do sucesso destes estudos deve-se a De Fossard e colaboradores ao desenvolverem uma metodologia que possibilitava testar, simultaneamente, nutrientes minerais, auxinas, citocininas, outras substâncias relacionadas ao crescimento e sacarose, em três concentrações (baixa, média e alta) para cada fator. A aplicação desta metodologia permitiu obter informações básicas e importantes para o desenvolvimento de calos e organogênese direta de material juvenil e adulto.

Posteriormente, os estudos conduzidos por Furze e Cresswell (1985), Rao e Venkateswara (1985) e Sita e Rani (1985) com material juvenil e adulto, via organogênese direta, direcionaram o desenvolvimento de tecnologias que permitiram maiores taxas de multiplicação de *Eucalyptus grandis* e de seus híbridos. Aprimoramentos desses métodos foram alcançados por Macrae e Van Staden (1990), Roux e Van Staden (1991); Lubrano (1991); Watt et al. (1996) para material juvenil, enquanto Bravo (2005) obteve organogênese direta a partir de cotilédones e de hipocótilos de progênies de *Eucalyptus grandis*. Concomitantemente, visando a clonagem de material selecionado, a organogênese direta também ocorreu em segmentos nodais provenientes de material adulto obtidos de brotações apicais de copas de árvores (RESENDE; GRAÇA, 1993; JONES; VAN STADEN, 1994; MOKOTEDI et al., 2000; JOSHI et al., 2003), em brotações epicórmicas de ramos de árvores (IKEMORI, 1987; SILVA; TEIXEIRA, 1994; YANG; CHUNG; CHEN, 1995); em segmentos nodais de brotações oriundas de rebrota de cepas de árvores abatidas (WARRAG; LESNEY; ROCKWOOD, 1990; ROUX; VAN STADEN, 1991; WACHIRA, 1997) e em segmentos nodais oriundos de brotações de clones obtidos por estaquia (ROUX; VAN STADEN, 1991, CORREIA et al., 1995; LIMA; GONÇALVES, 1998).

Regeneração *in vitro* via organogênese indireta foi obtida em hipocótilos (WARRAG; LESNEY; ROCKWOOD, 1991; BARRUETO CID et al., 1999), em caules e folhas de material juvenil (CHEN; TSAY; CHUNG, 1996), em gemas apicais de plantas jovens e de plantas adultas (ITO et al., 1996), em cotilédones (BARRUETO CID et al., 1999; GONZÁLEZ, 2002; BRAVO, 2005) e em nó cotiledonar (BARRUETO CID et al., 1999), em folhas de brotações cultivadas *in vitro* oriundas de material juvenil (BARRUETO CID et al., 1999) e de material adulto (LAINÉ;

DAVID, 1994; ALVES; XAVIER; OTONI, 2004) e em folhas de plântulas e de clones comerciais (GONZÁLEZ et al., 2002).

Buscando uma alternativa de regeneração, um protocolo para a embriogênese somática de *Eucalyptus grandis* foi desenvolvido por Watt et al. (1991) utilizando folhas de plântulas com posterior indução de calo seguido de formação de embriões somáticos, os quais apresentaram um nível de eficiência de regeneração de plantas em torno de 30%.

Enquanto, González et al. (2002) obtiveram uma metodologia de transformação genética de *Eucalyptus grandis* e de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* utilizando sementes em germinação via inoculação com *Agrobacterium tumefaciens* do material previamente sonificado; esse sistema transformou eficientemente cotilédones e permitiu a obtenção de plantas transformadas.

Avanços na micropropagação foram alcançados com estudos relacionados à otimização do sistema produtivo objetivando um crescimento ótimo e máximo das brotações, produção de biomassa e, conseqüentemente, redução de custos. Para isto, diferentes formulações de macronutrientes foram testadas por Silva e Teixeira (1994) objetivando a multiplicação e o alongamento de brotações de *Eucalyptus grandis*. Correia et al. (1995) avaliaram o crescimento e o desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* cultivados em meio líquido e sólido, formulado especificamente para o *Eucalyptus grandis*. Mais recentemente, Castro e González (2002) desenvolveram um sistema de imersão temporária para a multiplicação de brotações de *Eucalyptus grandis* oriundas de árvores selecionadas; o sistema propiciou um crescimento homogêneo das brotações com tamanho superior a 2,0 cm.

Por outro lado, as avaliações da produção *in vitro* de *Eucalyptus grandis* e de seus híbridos em função de variações em meios nutritivos, visam além da produtividade, a compreensão dos aspectos nutricionais, fisiológicos e alterações metabólicas. Neste sentido, o efeito de cálcio no crescimento inicial de brotações *in vitro* foi estudado por Langer (2000); a absorção de nutrientes minerais ao longo do período de cultivo por Gribble et al. (2002) e doses de potássio foram avaliadas por Lima (2004) quanto à sintomatologia visual, produção de massa seca, teor e conteúdo de nutrientes de clones híbridos. Adicionalmente, estresses relacionados à nutrição mineral, hídrico e ao alumínio, em brotações cultivadas *in vitro*, foram estudados por Higashi (1996); Higashi e Gonçalves (2006); Souza e Cardoso (2003) e Basso et al. (2003), respectivamente. Enquanto, Stefanuto (2002) avaliou o efeito do cálcio na homeostase de

brotações cultivadas sob deficiência hídrica induzida *in vitro* e Cantarelli (2002) verificou o efeito do cálcio na homeostase de brotações submetidas a diferentes temperaturas.

Aspectos genéticos relacionados ao controle da regeneração *in vitro* de dez progênies de polinização aberta de *Eucalyptus grandis* foram avaliados por Bravo (2005). O estudo mostrou herdabilidade alta ($h^2_m = 0,94$) quanto ao caráter, indicando um forte controle genético sobre a regeneração *in vitro* dentro da população.

2.1.3 Nutrição mineral *in vitro*

2.1.3.1 Meio de cultura

Meios de cultura para o cultivo *in vitro* de plantas são compostos geralmente por íons minerais, reguladores de crescimento, sacarose e vários compostos orgânicos, com a presença ou ausência de agente geleificante. Muitas formulações de meios têm sido feitas nos últimos 100 anos. Entretanto, grande parte das pesquisas realizadas com culturas de raízes, de células e de calos tem preferencialmente feito uso do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), otimizado para a cultura de calo de tabaco (WILLIAMS, 1995). Adicionalmente, este meio tem sido utilizado ou adaptado para a organogênese e a micropropagação de diferentes espécies, sendo que o seu uso representa mais de 50% da micropropagação comercial (LEIFERT et al., 1991).

As composições dos meios de cultura utilizadas para uma espécie ou tipo de cultura são normalmente definidas de forma empírica manipulando uma ou combinações de formulações já existentes (LEIFERT; MURPHY; LUMSDEN, 1995; WILLIAMS, 1995; RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

Basicamente, os meios de cultura diferem entre si pelas concentrações de nutrientes, fontes fornecedoras dos nutrientes e essencialidade dos nutrientes minerais. O meio de cultura MS caracteriza-se por apresentar concentração iônica total alta; as concentrações de nitrogênio, potássio, zinco e cloro são as mais elevadas quando comparadas com as concentrações correspondentes em outros meios (LEIFERT; MURPHY; LUMSDEN, 1995). Na Tabela 1 pode-se verificar as diferenças existentes entre as composições dos meios de cultura MS, GM (GONÇALVES, 1980) modificado e JADS (CORREIA et al., 1995), onde o GM e o JADS são

classificados como meios de cultura com concentração iônica total média e utilizados no cultivo *in vitro* de *Eucalyptus*.

Tabela 1 - Fontes e concentrações de nutrientes minerais dos meios de cultura MS, GM e JADS

Fontes de nutrientes	MS	GM	JADS	Nutriente	MS	GM	JADS
	mmol L ⁻¹				mmol L ⁻¹		
NH ₄ NO ₃	20,61	10	4	N	60	32	26
KNO ₃	18,79	10	8	P	1,25	1,25	3
KH ₂ PO ₄	1,25	1,25	3	K	20	11,25	11
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	1	5	Ca	3	1	5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,99	-	-	Mg	1,5	1	3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5	1	3	S	1,7	1,12	3,29
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,1	0,1	0,2	B	0,1	0,1	0,05
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	0,1	0,2	Cu	0,0001	0,0001	0,005
H ₃ BO ₃	0,1	0,1	0,05	Fe	0,1	0,1	0,2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,07	0,01	0,1	Mn	0,07	0,01	0,07
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,03	0,01	0,015	Zn	0,03	0,01	0,015
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,001	0,001	0,0006	Na	0,202	0,202	0,402
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0001	0,0001	0,005	Co	0,0001	0,001	0,001
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0001	0,001	0,001	I	0,005	0,006	-
KI	0,005	0,005	-	Cl	5,9	0,002	0,002
				Mo	0,001	0,001	0,0006
Ions totais					93,85	48,05	52,03
NO ₃ ⁻ :NH ₄ ⁺	1,9:1	2,2:1	5,5:1				

MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962); GM (GONÇALVES, 1980) modificado; JADS (CORREIA et al., 1995)

A otimização de sistemas de cultivo *in vitro* depende da definição de meios de cultura com suprimento nutricional adequado à espécie. O meio de cultura JADS foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia das Árvores da Escola Superior de Agricultura de “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) sendo este, específico para o cultivo *in vitro* de *Eucalyptus grandis*. A definição deste meio de cultura baseou-se em informações bibliográficas de teores de nutrientes minerais de *Eucalyptus grandis* obtidos em diferentes estudos conduzidos com material juvenil. Com um valor médio de teor a partir de um intervalo de teor para cada nutriente, formulou-se um meio de cultura com balanço iônico ajustado e com níveis de nutrientes considerados adequados para um crescimento ótimo e máximo e, uma produção estimada em 15 g de massa seca em cada litro de meio de cultura. A primeira aplicação desta proposta demonstrou que o crescimento e o desenvolvimento de gemas para *Eucalyptus grandis* foi superior em meio de cultura JADS

líquido do que em meio geleificado com ágar. Resposta inversa foi obtida para híbridos com esta espécie. As produções de massa fresca e massa seca variaram em função do tipo de meio de cultura, líquido ou sólido, e do genótipo. Para alguns clones, a produção de massa seca foi próxima à estimada (CORREIA et al, 1995).

El Badaoui; Morard; Henry (1996) definiram um meio nutritivo baseado em teores de macronutrientes encontrados em plantas de *Solanum paludosum* com 1 ano de idade e crescidas em campo. As fontes fornecedoras dos macronutrientes para a formulação do novo meio de cultura foram: KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O uso deste meio, na forma líquida, na multiplicação de brotações *in vitro*, permitiu aumento da massa fresca e da produção de solamargina, um esteróide presente em frutos verdes, quando comparado à produção alcançada em meio de cultura MS líquido. O novo meio proposto (SPOM) apresentou aproximadamente a metade da concentração iônica total em comparação à do meio de cultura MS, destacando a redução das concentrações de K^+ e de NO_3^- , aumento da concentração de Ca^{2+} e ausência de NH_4^+ e Cl^- .

Morard e Henry (1998) aplicaram a metodologia sugerida por El Badaoui; Morard; Henry (1996) para a mesma espécie tendo como referência para a formulação do meio de cultura, os teores de macronutrientes de plantas de *Solanum paludosum* crescidas em solo e mantidas em casa de vegetação por 1 ano. A eficiência deste meio de cultura (MH1) para produção de massa de brotações e de produção de solamargina foi comparada com as produções obtidas em MS e $\frac{1}{2}$ MS (metade das concentrações dos sais inorgânicos do MS). No novo meio (MH1) onde a concentração de íons totais foi reduzida, nitrogênio suplementado na forma de nitrato e maior concentração de cálcio do que a de potássio, as produções de biomassa e de solamargina foram duas e três vezes maiores que as produções em meio de cultura MS, respectivamente. As produções de biomassa e de solamargina aumentaram em função da menor concentração iônica total dos diferentes meios nutritivos ($\text{MS} < \frac{1}{2} \text{MS} < \text{novo meio MH1}$).

Nessa mesma linha de pesquisa, Fulcheri; Morard; Henry (1998) elaboraram novos meios de cultura líquidos para a produção de massa fresca e de saponinas em culturas de células de *Saponaria officinalis* (MH2) e em culturas de raízes de *Gypsophila paniculata* (MH3). A composição nutricional dos novos meios de cultura foi proposta em função dos teores de macronutrientes e micronutrientes obtidos em análise química a partir de plantas inteiras. Nos novos meios, a cultura de células de *Saponaria officinalis* dobrou a produção de massa fresca e

aumentou de 2,5 mg para 4,4 mg (g de massa fresca)⁻¹ L⁻¹ de saponinas quando comparadas às produções alcançadas em meio de cultura MS modificado. A produção de massa fresca também dobrou em cultura de raízes de *Gypsophila paniculata* e aumentou de 10 mg para 30 mg (g de massa fresca)⁻¹ L⁻¹ de saponinas quando comparada às produções alcançadas em meio de cultura B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968).

Outro estudo conduzido por Monteiro et al. (2000) com *Passiflora edulis*, foram realizadas modificações na composição inorgânica do meio de cultura MS conforme as deficiências minerais de ferro e de cálcio e, provável fitotoxicidade de cloro apresentadas nas culturas *in vitro* mantidas em meio de cultura MS. Um novo meio foi proposto baseado na composição de nutrientes minerais de folhas de plantas jovens de *Passiflora edulis*, o qual proporcionou o desaparecimento dos sintomas de deficiência de ferro e melhorias nos teores de nutrientes no tecido vegetal para cálcio, cobre, ferro, magnésio e enxofre; houve reduções dos teores de cloro e boro.

Terrer e Tomas (2001) propuseram uma metodologia para otimizar e sistematizar as concentrações de macronutrientes na elaboração de um meio de cultura. Os meios de cultura específicos foram formulados em função dos teores de macronutrientes foliares determinados em período de máximo crescimento do genótipo. A eficiência deste método foi testada comparando a multiplicação de brotações em meios de cultura específicos e em meio de cultura MS utilizando seis cultivares de porta-enxertos obtidos de híbridos espontâneos (pessegueiro/amendoeira). Todas as cultivares apresentaram maiores taxas de multiplicação de brotações, maiores alturas, maior número de folhas e baixos sintomas de hiperhidria nos meios de cultura específicos para cada cultivar do que em meio de cultura MS.

Gribble et al. (2002) definiram um novo meio de cultura baseado na avaliação nutricional foliar de um clone de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. As brotações desenvolvidas no novo meio não apresentaram cloroses, permitiram uma melhor uniformidade de crescimento e balanço nutricional adequado. Porém, modificações de concentração de nutrientes no meio de cultura nem sempre resultaram em mudanças similares nos tecidos das plantas. Tais diferenças poderiam estar relacionadas com a existência de interações entre os nutrientes no meio de cultura e/ou entre nutrientes e o agente geleificante que interferem na disponibilidade e absorção dos nutrientes.

2.1.3.2 Absorção mineral e o crescimento *in vitro*

A absorção de nutrientes minerais em plantas depende da quantidade e da forma na qual os íons estão disponíveis à planta e a sua interface com a fonte e a seletividade no processo de absorção. Os princípios básicos da absorção de nutrientes minerais aplicam-se para plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, diferenças nas condições fisiológicas e ambientais entre plantas *in vitro* e *in vivo* interferem nos processos de absorção. Tais diferenças relacionam-se com o ambiente químico e físico do meio de cultura, condições atmosféricas no frasco de cultura, especialmente quanto à umidade e o tipo de material vegetal em cultivo. Crescimento de plantas *in vitro* pode ser comparado ao crescimento de plantas em sistemas de hidroponia. Todavia, no sistema de cultivo *in vitro*, a maior parte do tempo, as plantas estão desprovidas de raízes sugerindo que elas podem utilizar diferentes mecanismos de absorção mineral (WILLIAMS, 1995). Adicionalmente, dependendo do sistema de cultivo *in vitro*, também não há aeração e circulação do meio nutritivo (ZIV, 2001; ASCOUGH; FENNELL, 2004).

A variação da composição iônica do meio de cultura MS (baixa, média e alta), na ausência de reguladores de crescimento, a composição do tecido da plantas de *Ptilotus exaltatus* e o ambiente de cultivo afetaram a absorção de nutrientes minerais *in vitro*. Em geral, o padrão de absorção no crescimento de brotações apresentou similaridade às cultivadas *in vivo*, com exceção do cálcio, cujo teor absorvido foi menor *in vitro*. A ausência de raízes nos explantes e o crescimento em ambiente sob baixa transpiração, características do sistema de cultivo *in vitro*, poderiam estar influenciando na absorção do cálcio. A absorção de nutrientes nos tecidos vegetais não foi proporcional à concentração do meio de cultura, particularmente, em alta concentração iônica (WILLIAMS, 1991).

Williams (1993) ressaltou a importância da composição do meio de cultura, pH, absorção e agentes geleificantes no aumento da biomassa. Sugeriu que a diferença de gradiente de concentração entre o meio de cultura e o tecido do explante tem a difusão como o processo preferencial de absorção em culturas *in vitro*. Normalmente, o teor de nutrientes no tecido é proporcional à concentração inicial disponível no meio nutritivo. Todavia, o teor de nutrientes no tecido pode ser mantido, enquanto as concentrações de nutrientes do meio nutritivo sofram depleções durante o período de cultivo. Provavelmente, estas reduções de minerais do meio sejam balanceadas com a remoção de água, mantendo assim, um gradiente de concentração. Existem

indicações de que a diminuição do crescimento seja precedida por uma redução da absorção sugerindo um efeito dreno; uma grande quantidade total de minerais é extraída do meio de cultura enquanto ocorre aumento de biomassa.

Leifert et al. (1991) enfatizaram a existência de redução de nutrientes minerais e de carboidratos limitando o crescimento *in vitro*. Adicionalmente, dependendo da espécie, do número de explantes por recipiente e do intervalo de subcultivo, a redução de nutrientes e de carboidratos pode se acentuar, sendo mais evidente em sistemas comerciais de produção *in vitro* onde a relação número de plantas/recipiente é alta. Adicionalmente, Leifert; Murphy; Lumsden (1995) ressaltaram a importância de estudos onde se obtém os valores de teores e de níveis críticos de nutrientes minerais nas plantas para a determinação do nível em que um nutriente estaria no seu limite. Desta forma, o início da queda da taxa de crescimento poderia ser correlacionado aos teores de nutrientes encontrados na planta e o início da deficiência. Esse controle poderia auxiliar na compreensão das causas das deficiências nutricionais envolvidas com a precipitação no meio, ligações químicas, limites na absorção, depleção do meio nutritivo e o estado nutricional da planta.

No estudo conduzido por Gribble et al. (2002) cultivando *in vitro* *Gypsophila paniculata* em meio de cultura com a formulação de macronutrientes (GEORGE; PUTTOCK; GEORGE, 1987) e micronutrientes (MURASHIGE; SKOOG, 1962) onde foram testadas concentrações de cálcio e potássio, houve uma correlação linear entre as concentrações destes nutrientes no meio de cultura e os teores de cálcio e de potássio obtidos em análises químicas dos tecidos vegetais das culturas. Provavelmente, a ausência de raízes tenha favorecido o estabelecimento das correlações significativas entre concentrações de nutrientes no meio e os teores dos nutrientes nas culturas, indicando que a absorção tenha sido por difusão passiva. Os resultados também mostraram interações entre cálcio, potássio e magnésio sugerindo que outros mecanismos estejam envolvidos na regulação das concentrações dos nutrientes nos tecidos. Este estudo indicou que a concentração crítica do nutriente pode ser estimada via sistema de cultura de tecidos, relacionando a concentração de cálcio e potássio *in vitro* com os dados da espécie em condições *in vivo*.

A absorção de nutrientes minerais e o crescimento em brotações de *Actinidia deliciosa* em meio de cultura MS, considerando calos na base do caule, caule e folhas, foram avaliados a cada 15 dias durante 60 dias de cultivo por Mezzetti; Rosati; Casalicchio (1991). Houve maior

aumento de massa fresca e seca durante os primeiros 30 dias de cultivo, com um aumento de massa fresca predominante nas folhas e igual distribuição de massa seca para caule e calos. Durante os primeiros 15 dias, o pH do meio de cultura reduziu de 5,8 para 4,8 e retornou ao valor inicial até o período final. Quanto aos nutrientes, após 30 dias de cultivo, 94,5% do fósforo presente no meio de cultura havia sido absorvido pelos explantes e distribuído igualmente no calo, caule e folhas. Durante o primeiro mês, 85% do nitrogênio inicial foram absorvidos. No final do cultivo, somente 2% de fósforo e 5% de nitrogênio permaneciam no meio de cultura. Nitrogênio e fósforo, durante os 30 dias iniciais, estavam distribuídos em calos e folhas, aumentando somente nos calos, no último período. As concentrações de potássio, magnésio, cálcio, ferro, zinco, manganês e cobre do meio de cultura utilizado foram absorvidas, na sua maioria, durante os primeiros 30 dias de cultivo, sendo estas, suficientes para sustentar o crescimento em 60 dias. Maiores acúmulos destes nutrientes minerais foram observados nos calos.

Singha; Oberly; Townsend (1987) cultivaram gemas apicais de *Malus* sp. e *Pyrus communis* em meio de cultura MS líquido suplementado BAP ($8,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) durante 9 semanas. A multiplicação de brotos aumentou linearmente em *Malus* sp. e *Pyrus communis* durante o período de cultivo e nas primeiras 4 semanas, respectivamente. Enquanto, a massa seca foi linear para ambos os gêneros ao longo do cultivo. O pH (5,3 inicial) do meio de cultura variou em função do gênero, com uma redução durante as primeiras 4 semanas e com posterior elevação até o nível do pH inicial, ao final do experimento. Houve uma redução acentuada nas concentrações de fósforo e de ferro no meio de cultura para ambos os gêneros onde, 50% do fósforo foram removidos em 6 semanas e uma redução na concentração de zinco, sendo esta, mais acentuada em meios de cultura para *Malus*. Para potássio, cálcio, magnésio, manganês e boro, as depleções iniciaram entre a 3ª e a 4ª semana. No final do período, somente 50% da concentração inicial de carboidratos permanecia no meio de cultura.

Diniz et al. (1999a,b) estudaram a absorção de nutrientes minerais por explantes de bananeira em função do período de cultivo, visando fornecer subsídios para o ajuste do meio de cultura e o estabelecimento do melhor período de repicagem. O experimento foi conduzido no meio de cultura MS. A massa fresca, massa seca e a altura das plântulas aumentaram até 60 dias, sendo este aumento maior nos primeiros 10 dias. O pH do meio variou durante o preparo, após a adição do ágar, aquecimento e esterilização. O pH decresceu nos primeiros 5 dias de cultivo

permanecendo estável até 60 dias. A maior taxa de absorção, para todos os nutrientes, ocorreu durante os primeiros 20 dias, exceto para manganês, que ficou constante durante 60 dias. O fósforo foi absorvido mais rápido. Exceto fósforo, todos os elementos foram suficientes para manter o crescimento. Os autores sugeriram que a concentração de fósforo fosse duplicada, enquanto as concentrações de zinco, de manganês, de cobre e de boro fossem reduzidas em função das quantidades remanescentes no meio nutritivo e o subcultivo, realizado a cada 30 dias.

Amiri (2000) estudou a taxa de difusão dos minerais P, S, K, Ca, Mg e Na em bananeira cultivada *in vitro* nas concentrações 0 MS; 0,2 MS; 1 MS e 2 MS. Verificou que o crescimento e a taxa de multiplicação estavam correlacionados à taxa de disponibilidade e a absorção dos nutrientes minerais. Maior crescimento e taxa de absorção ocorreram durante os primeiros 30 dias de cultivo. A difusão foi o processo que prevaleceu à disponibilidade de minerais. Sintomas de deficiência nutricional nos explantes e baixa absorção foram relacionados com a baixa taxa de difusão de nutrientes no meio solidificado com ágar.

A limitação de um mineral essencial pode interferir no crescimento de plantas, assim como, altas concentrações de nutrientes no meio. Algumas espécies lenhosas apresentam melhor desenvolvimento em meio com baixa concentração iônica quando comparado à concentração iônica do meio de cultura MS (WILLIAMS, 1995). Em experimentos conduzidos por de Lee e De Fossard (1977) apud Ramage e Williams (2002), para crescimento de brotações a partir de segmentos nodais de *Fragaria ananassa*, a omissão seletiva de ferro, fosfato, potássio, nitrato e cloreto resultou em significativa redução do crescimento dos explantes. A omissão de outros minerais, como, cálcio, magnésio, sulfato, amônio, sódio e vários micronutrientes não foram significativos para o crescimento dos explantes. A omissão de nitrato, fosfato e potássio reduziram significativamente o número de folhas. Entretanto, as respostas deste estudo são questionáveis em função do uso de ágar no meio de cultura. Ágar, além de intervir no potencial hídrico, na disponibilidade dos nutrientes minerais, apresenta contaminação por diferentes nutrientes, os quais, dependendo do nível de contaminação, poderiam suportar parcialmente as exigências nutricionais para o crescimento da espécie (WILLIAMS, 1995).

Todavia, no estudo conduzido por Ramage e Williams (2002), em meio de cultura MS líquido para a indução de meristemas e posterior formação de brotações em discos foliares de *Nicotiana tabacum*, a omissão seletiva de nitrogênio, nitrato ou fosfato inibiu completamente a

indução de meristemas. Enquanto, as omissões seletivas de cálcio, potássio e magnésio não permitiram a formação de brotações, porém não foram limitantes para a indução de meristemas.

Higashi (1996) realizou a diagnose de deficiências de nutrientes minerais em três híbridos de *Eucalyptus* cultivados *in vitro* em meio de cultura JADS líquido. A análise do equilíbrio iônico do meio de cultura e a análise dos teores dos nutrientes minerais do material vegetal mostraram as diferentes exigências nutricionais para cada híbrido. A omissão seletiva da maioria dos micronutrientes não demonstrou sintomas acentuados de deficiências. O contrário ocorreu para a ausência de nitrogênio, cálcio, enxofre, ferro e zinco. Em outro estudo conduzido por Higashi e Gonçalves (2006) durante a multiplicação de brotações *in vitro* de *Eucalyptus grandis*, as omissões seletivas de nitrogênio, fósforo, enxofre, boro, ferro e zinco apresentaram sintomas visuais acentuados. As menores produções de massa seca foram observadas na ausência de nitrogênio seguido da omissão de zinco e boro. Todos os teores de macronutrientes e de micronutrientes nas brotações submetidas às respectivas omissões foram inferiores ao controle.

2.1.3.3 Nutrientes minerais e o crescimento *in vitro*

2.1.3.3.1 Efeito de formulações de meios de cultura no crescimento *in vitro* de *Eucalyptus*

Rao e Venkateswara (1985) observaram que o enraizamento *in vitro* de brotações de *Eucalyptus grandis* oriundas de material jovem e adulto foi mais efetivo quando as brotações permaneciam em meio de White (1954), considerado um meio de baixa concentração iônica (27 mmol L^{-1}) contendo AIA, ANA e AIB, posteriormente, em meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS (MS com as soluções salinas reduzidas à metade) suplementado com carvão ativado e transferidas para meio $\frac{1}{2}$ MS líquido. Neste método, foi possível enraizar 60% das brotações oriundas de material jovem e 35% das brotações provenientes de material adulto.

Donald e Newton (1991) avaliaram o comportamento de 12 clones de *Eucalyptus radiata* quanto ao enraizamento *in vitro*, os quais responderam diferentemente quando submetidos ao meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS ou $\frac{1}{4}$ MS suplementados com ANA (2,7; 8,1 e $16,1 \mu\text{mol L}^{-1}$) e AIB (2,4; 7,3 e $14,8 \mu\text{mol L}^{-1}$). A proliferação de brotações de *Eucalyptus* variou significativamente em meio de cultura MS solidificado e em meio $\frac{1}{2}$ MS líquido.

Lubrano (1991) alterou as concentrações dos macronutrientes da formulação do MS, em mg L⁻¹ para: M1 (809,25 de nitrogênio; 37,4 de fósforo; 769,6 de potássio; 34,8 de cálcio; 37,0 de magnésio e 48,1 de enxofre) e M2 (94,3 de nitrogênio; 22,5 de fósforo; 82,5 de potássio; 95,0 de cálcio; 12,5 de magnésio e 16,25 de enxofre). Estes meios foram suplementados com micronutrientes do meio de cultura MS, e vitaminas e aminoácidos segundo a formulação de De Fossard; Barker; Bourme (1977). A multiplicação de brotações variou em função do clone, tanto quanto, a taxa de enraizamento onde a amplitude observada foi de 58% a 93%.

A proliferação de gemas axilares em material adulto de *Eucalyptus radiata* foi obtida em meio MS suplementado com BAP (0,5 mg L⁻¹) e ANA (0,01 mg L⁻¹). O meio de cultura MS e com as suas soluções salinas reduzidas à metade, ambos suplementados com AIB (5,0 mg L⁻¹) e agente geleificante Gelrite® proporcionaram 90% e 80%, respectivamente de brotações enraizadas; enquanto em meio líquido, as taxas de enraizamento reduziram para 15% em meio MS completo e para 50%, em ½ MS (CHANG; DONALD; JACOBS, 1992).

O enraizamento de brotações de *Eucalyptus grandis* oriundas de material juvenil em meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981) variou de 67% a 69% e no meio de Hoagland's (JANICK, 1986), a amplitude foi de 79% a 94% (BLOMSTED et al., 1993).

Gil e Gil (1994) observaram que a proliferação de brotações de *Eucalyptus tereticornis*, *Eucalyptus camaldulensis* e de dois híbridos com estas espécies foi significativamente superior em todos os materiais quando foi utilizado ½ MS líquido do que MS solidificado.

Lainé e David (1994) avaliaram a organogênese a partir da cultura de calos de folhas de clones de *Eucalyptus grandis*. Os calos foram desenvolvidos em três meios de cultura distintos: macronutrientes, micronutrientes (½ MS ou MS), doses de vitaminas e reguladores de crescimento. O padrão de desenvolvimento dos calos diferenciou consideravelmente enquanto a indução de brotações variou entre clones e meio de cultura.

Brotações de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (A) foram cultivados em dois meios específicos para o cultivo de *Eucalyptus* denominados de SEM e NEM (GRIBBLE et al., 2002). O meio de cultura NEM foi reformulado a partir da composição mineral do meio de cultura SEM, em função dos teores de nutrientes encontrados em análises químicas foliares do clone híbrido (A). As concentrações (mmol L⁻¹) disponíveis em SEM e NEM foram, respectivamente: nitrogênio (27,0 e 20,3); fósforo (1,0 e 0,6); potássio (21,0 e 6,3); magnésio (1,5 e 2,2) e enxofre (2,5 e 3,2). Houve diferenças nos teores dos nutrientes nas brotações em ambos

os meios de cultura. Brotações crescidas em meio SEM apresentaram cloroses e desbalanços nutricionais. O oposto foi verificado em meio NEM onde, adicionalmente, o crescimento das brotações foi uniforme. Em geral, onde a concentração do mineral foi reduzida no meio de cultura NEM, também houve a redução nos teores dos nutrientes nas brotações. Isto não ocorreu para nitrogênio que aumentou em 27% nas brotações e reduziu em 25% a sua concentração no meio; fósforo foi reduzido no meio de cultura NEM, mas foi verificada redução do teor de fósforo nas brotações; boro, zinco e sódio não variaram no meio de cultura NEM, enquanto nas brotações houve aumento de 32% para boro, 61% para zinco e redução de 32% para sódio. A modelagem feita pelo programa GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) sugeriu que os íons que estavam em solução de 90% e 100% para a concentração adicionada deles, exceto o ferro, onde 50% deste nutriente, provavelmente, complexaram-se ao EDTA e o restante, pode ter precipitado com o fósforo.

Joshi et al. (2003) verificaram que brotações de *Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus grandis* apresentaram maior taxa de multiplicação de brotações em MS completo, melhor alongamento e enraizamento das brotações alongadas em ½ MS sem acréscimo de reguladores de crescimento e com adição de AIB (1,0 mg L⁻¹), respectivamente.

A aplicação combinada das soluções de macronutrientes do meio MS reduzidas à metade, das soluções de micronutrientes do MS, compostos orgânicos do meio de Fossard (1974) mais BAP (0,5 µmol L⁻¹) e ANA (0,05 µmol L⁻¹) proporcionou a melhor taxa de multiplicação de brotações (2,25 brotações/explante) para *Eucalyptus nitens* (GOMES; CANHOTO, 2003).

2.1.3.3.2 Efeito de nitrogênio

Rizomas de videira foram cultivados *in vitro* em meios de cultura suplementados com NaNO₃ (5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 mmol L⁻¹) e (NH₄)₂ SO₂ (5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 mmol L⁻¹). O fornecimento de N-NO₃⁻ propiciou um acúmulo de sódio causado pela presença de íons Na⁺ na fonte fornecedora dos sais, um pequeno aumento de nitrogênio e um decréscimo de cálcio. No fornecimento de N-NH₄⁺, houve maior acúmulo de nitrogênio, fósforo e ferro e, decréscimo de potássio. A absorção de N-NH₄⁺ foi mais intensa e menos controlada que N-NO₃⁻ contribuindo para o aumento de nitrogênio nos tecidos e, provavelmente, induzindo alguns

desequilíbrios em relação a outros nutrientes, como a baixa absorção de potássio (VILLEGAS; MAZUELOS; TRONCOSO, 1991).

Evans (1993) variou a concentração do nitrogênio em 20,0; 40,0 e 60,0 mmol L⁻¹ do meio de cultura MS e cultivou diferentes cultivares de *Solanum* spp., as quais responderam diferentemente sob a influência da concentração total de nitrogênio. A redução da concentração de nitrogênio favoreceu o alongamento das plantas, apresentando internódios longos e brotações com folhas mais largas com menor conteúdo de clorofila. A interação entre genótipo e concentração de nitrogênio mostrou significância para conteúdo de clorofila, comprimento de brotações e de internódios. As concentrações de nitrogênio não interferiram na produção de massa fresca ou no número de nós. O estudo sugere que a variação na morfogênese esteja relacionada mais com a concentração total de nitrogênio do que com a relação NO₃⁻:NH₄⁺.

Kaul e Hoffaman (1993) avaliaram a influência dos íons N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻ no crescimento de calos em hipocótilos de *Pinus strobus* crescidos em meio de cultura MS modificado contendo 20,6 mmol L⁻¹ de NH₄NO₃ e 18,8 mmol L⁻¹ de KNO₃⁻ e com adição de ANA. A suplementação de N-NH₄⁺ utilizando como fonte de nutriente NH₄Cl inibiu completamente o crescimento dos calos. A reversão deste efeito inibitório foi obtida adicionando KNO₃ ao meio. Entretanto, o efeito da inibição do crescimento dos calos era decorrente do íon NH₄⁺ e não do Cl⁻. Crescimento ótimo dos calos ocorreu em meio de cultura suplementado com KCl. Os resultados sugerem que a limitação do crescimento dos calos estava relacionada ao acúmulo de NH₄⁺ nos tecidos, levando a uma toxidez e, provavelmente, inibindo a atividade da glutamina sintetase.

Garcia et al. (1994) observaram o efeito das fontes de nitrogênio KNO₃, (NH₄)₂SO₄ e NH₄NO₃ nas concentrações 5, 10, 20 e 30 mmol L⁻¹ de nitrogênio e a sua distribuição em frações amoniacal amínico, amídico e protéico em plântulas de oliveira cultivadas *in vitro*. O aumento da concentração de nitrogênio resultou em elevação do teor de nitrogênio total nos tecidos, sendo menor em KNO₃, intermediário em (NH₄)₂SO₄ e maior em NH₄NO₃. O uso de amônio aumentou significativamente N-amídico e N-amoniacal, enquanto a adição de KNO₃ e de NH₄NO₃ mostrou aumento significativo para N-protéico. Nitrogênio na forma de N-amídica não foi influenciado por nenhum tratamento.

Plântulas de oliveira foram cultivadas *in vitro* em meios de cultura suplementados com KNO₃, (NH₄)₂SO₄ e NH₄NO₃ nas concentrações 0, 5, 10 e 20 mmol L⁻¹ de nitrogênio. Melhor

crescimento foi observado em NH_4NO_3 na concentração de 10 e 20 mmol L^{-1} de nitrogênio, enquanto o uso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ocasionou danos às plântulas e elevou o teor de enxofre nos tecidos. O aumento das concentrações de nitrogênio promoveu elevações dos teores de nitrogênio nos tecidos vegetais, sendo estes menores com o uso de KNO_3 e maiores na presença de NH_4NO_3 (SARMIENTO et al., 1994).

Avila; Pereyra; Argüello (1998) avaliaram o efeito das concentrações de nitrogênio (30 e 60 mmol L^{-1}), na relação $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ com 30% e 50% para NH_4^+ em *Solanum tuberosum* cv. Spunta, em meio líquido e sólido. O crescimento de brotações foi mais elevado em 30 mmol L^{-1} de nitrogênio na relação contendo 30% NH_4 e não mostrou efeito no número de nós indicando que as plantas apresentaram longos internódios. Este efeito foi correlacionado à redução da absorção de nitrogênio sugerindo que a baixa concentração deste elemento e a redução da relação $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ aumentou a taxa de absorção de carbono, favorecendo o acúmulo da massa seca, como também, o aumento da relação massa seca:N, tanto em meio sólido quanto em líquido.

Utilizando um genótipo de noqueira, Zamani e Vahdati (2001) avaliaram o efeito da variação de concentração de nitrogênio no meio de cultura DKW (DRIVER; KUNIYUKI, 1984), o qual apresenta baixa concentração de íons NH_4^+ e NO_3^- . Ao meio DKW, foram testados o dobro da concentração de NH_4NO_3 ou de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, respectivamente, e 1900 mg L^{-1} de KNO_3 . Variação da concentração de nitrogênio e da fonte fornecedora dos íons mostrou que o aumento de NH_4NO_3 promoveu maior taxa de crescimento das brotações do que fontes contendo apenas NO_3^- acompanhada de cálcio ou potássio. O aumento de K^+ reduziu a taxa de crescimento e apresentou brotações com folhas amareladas enquanto o aumento Ca^{2+} , não apresentou sintomas visuais. A alta atividade do K^+ para absorção e, conseqüentemente, sua competição com NH_4^+ deve ter sido a razão para esta resposta; o mesmo não ocorreu com Ca^{2+} .

A redução da concentração utilizada no meio de cultura MS de KNO_3 de 1500,0 mg L^{-1} para 950,0 mg L^{-1} e de NH_4NO_3 de 1650,0 mg L^{-1} para 825,0 mg L^{-1} influenciou no vigor e no crescimento brotações de *Eucalyptus tereticornis*. A diminuição de hiperhidria e o favorecimento do alongamento das brotações foram proporcionais ao aumento da concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de 146,6; 440,0 e 880,0 mg L^{-1} . Maior vigor, taxa de multiplicação, alongamento das brotações e redução de hiperhidria foram alcançados em meio suplementado com as menores concentrações de NH_4NO_3 , de KNO_3 e com a maior concentração de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (SHARMA; RAMAMURTHY, 2000).

Capaldi (2002) avaliou diferentes fontes de nitrogênio em explantes de *Cryptomeria japonica in vitro*. Dez variações de concentrações de NO_3^- (22,5 mmol L^{-1} a 40,0 mmol L^{-1}) e NH_4^+ (0,0 mmol L^{-1} a 20,0 mmol L^{-1}) foram estabelecidas no meio de cultura básico MS utilizando como fonte de nutriente NH_4NO_3 , KNO_3 ou $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, variando apenas o nitrogênio total (25,0 mmol L^{-1} a 60,0 mmol L^{-1}) e as relações $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (2:1 a 26:0). As diferentes concentrações de NO_3^- e NH_4^+ influenciaram o crescimento das brotações, o incremento em massa seca e o conteúdo de carboidratos, proteínas e aminoácidos. A omissão do amônio favoreceu o aumento do crescimento das brotações, da massa seca e dos parâmetros bioquímicos, entretanto reduziu a produção de brotações sugerindo que o amônio presente em baixas concentrações foi favorável ao desenvolvimento das brotações. As concentrações de NO_3^- entre 22,5 e 31,0 mmol L^{-1} e de NH_4^+ até 5,0 mmol L^{-1} foram as mais efetivas para o crescimento e desenvolvimento das brotações.

No sistema de imersão temporária para o cultivo de *Eucalyptus grandis* desenvolvido por Castro e Gonzáles (2002), o uso das concentrações de NH_4NO_3 e de KNO_3 do meio de cultura MS, ambas reduzidas à metade, contribuiu para a operacionalização desse sistema. A produção média de 230 plantas/frasco de 500 mL foi alcançada em 6 semanas e com uma frequência de imersão de 3 minutos a cada 12 horas.

As variações no meio de cultura MS com relação às concentrações de NH_4NO_3 (0,0; $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$), de KNO_3 ($\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$) e de FeNaEDTA ($\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$) influenciaram na formação de raízes de *Eucalyptus globulus* e no pH do meio de cultura. Na ausência de NH_4NO_3 , ocorreram 90% a 94% de explantes enraizados, enquanto, na sua presença, o enraizamento variou de 49% a 62%. A porcentagem de brotações enraizadas e de número de raízes por explante foi maior em $\frac{1}{2}$ ou $\frac{1}{4}$ KNO_3 e $\frac{1}{4}$ FeNaEDTA. Meios contendo NH_4 apresentaram decréscimos do pH nos primeiros 7 dias de cultivo, estabilizando em valores entre 4,0 e 4,5 aos 30 dias de cultivo, enquanto meios sem NH_4 apresentaram menores reduções do pH durante os primeiros 7 dias de cultivo e valores de pH entre 5,5 e 6,0, aos 30 dias de cultivo (BENNETT; MCDavid; MCCOMB, 2003/4).

Russowski e Nicolosso (2003) avaliaram o crescimento *in vitro* de *Pfaffia glomerata* em meio de cultura MS solidificado, sem acréscimo de reguladores de crescimento e sob efeito de concentrações de nitrogênio (0,0; 15,0; 30,0; 60,0 e 90,0 mmol L^{-1}). Para isto utilizaram segmentos nodais com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, obtidos de culturas estabelecidas *in vitro*. No meio de cultura contendo 30,0 mmol L^{-1} de nitrogênio houve maior

porcentual de explantes enraizados e maior número de raízes por explantes, aos 15 dias após a inoculação. Aos 40 dias de cultivo, o crescimento em altura das brotações, número de segmentos nodais por explante, índice de área foliar, número de folhas, massa seca da parte aérea, massa seca das raízes e massa seca total do explante foram maiores em concentração próxima a 48 mmol L⁻¹ de nitrogênio.

Com o objetivo de avaliar a eficiência no processo de assimilação de nitrogênio, foram cultivadas *in vitro* seis variedades de cana de açúcar em meio de cultura MS, sem reguladores de crescimento, e com modificações na concentração original de nitrogênio (0,0; 0,49; 2,46; 4,92; 7,37 e 9,83 mmol L⁻¹). Aos 45 dias de cultivo, a variedade Co 997 apresentou maior ganho de massa seca e maior quantidade de nitrogênio incorporado em aminoácidos livres em relação às demais variedades, sugerindo maior eficiência no processo de assimilação. Nas variedades RB 83102 e RB 75126 foram obtidos os maiores teores de amônio quando cultivadas em meio de cultura sem a presença de nitrogênio, sendo estas menos eficientes no processo de assimilação uma vez que apresentaram os menores teores de aminoácidos livres (DONATO et al., 2003).

Plântulas obtidas a partir da germinação de sementes *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* foram cultivadas em meio de cultura MS básico, líquido e sem reguladores de crescimento, para o estudo de crescimento em diferentes concentrações de nitrogênio (7,5; 15,0; 30,0; 60,0 e 120,0 mmol L⁻¹). O balanço iônico dos meios de cultura foi estabelecido variando as fontes de NO₃NH₄ e KNO₃. A concentração de 7,5 mmol L⁻¹ de nitrogênio foi o nível ótimo para a produção de massa fresca e massa seca tanto para a parte aérea como a radicular. Nesta concentração, obteve-se a maior a relação NO₃⁻:NH₄⁺ (2,99:1) entre os meios testados em função da variação do nitrogênio total. As maiores concentrações de nitrogênio mostram-se excessivas para a produção de massa fresca e massa seca. Os teores de magnésio, boro, manganês e zinco decresceram, enquanto os teores de nitrogênio, potássio e cobre cresceram com o aumento da concentração de nitrogênio; os teores de fósforo, cálcio e ferro não foram influenciados pelo aumento da concentração de nitrogênio; o teor de potássio cresceu até alcançar o valor máximo de nitrogênio (73,0 mmol L⁻¹) e decresceu conforme o aumento da concentração de nitrogênio (KANASHIRO, 2005).

Higashi e Gonçalves (2006) estudando o efeito da omissão seletiva de nitrogênio no meio de cultura JADS líquido, em brotações de *Eucalyptus grandis*, aos 21 dias de cultivo, observaram uma redução da massa seca de 82,02% e de 47% do teor de nitrogênio, em relação

aos controles. Entre os macronutrientes, o nitrogênio foi o elemento que apresentou maior efeito na redução da biomassa seguida das omissões seletivas dos micronutrientes ferro (45,98%) e zinco (46,76%).

2.1.3.3.3 Efeito de fósforo

Elliott; Smith; Bridgen (1993) avaliaram o crescimento de ápices de rizoma de *Alstroemeria* em meio de cultura MS com diferentes concentrações de fósforo (0,0; 0,05; 0,25; 1,25 e 2,50 mmol L⁻¹) obtidas da fonte de nutriente KH₂PO₄. Explantes, em meios de cultura sob efeitos das duas maiores concentrações de fósforo, apresentaram maior quantidade de brotações, maior massa fresca de rizomas e brotações. O teor de fósforo nas brotações variou de 7,0 a 12,5 μmol g⁻¹ de massa fresca nos tratamentos referentes às concentrações de 1,25 e 2,50 mmol L⁻¹ de fósforo e de 3,0 a 8,0 μmol g⁻¹ de massa fresca nos tratamentos com as menores concentrações de fósforo. Enquanto, o teor de fósforo nos rizomas variou de 7,0 a 12,0 μmol g⁻¹ de massa fresca em função dos tratamentos com 1,25 e 2,50 μmol L⁻¹ de fósforo e de 4,0 a 11,0 μmol g⁻¹ de massa fresca, nos tratamentos com menores concentrações de fósforo. Adicionalmente, a maior taxa de crescimento relativo de massa fresca das brotações (0,32 semana⁻¹) foi obtida com explantes cultivados em meios contendo as duas maiores concentrações de fósforo; nas menores concentrações de fósforo, a taxa de crescimento relativo variou de 0,14 a 0,22 semana⁻¹. Nos rizomas, a taxa de crescimento relativo da massa fresca foi aproximadamente duas vezes maior nos tratamentos contendo 1,25 mmol L⁻¹ e 2,50 mmol L⁻¹ de fósforo do que nos tratamentos com as menores concentrações.

Utilizando o meio de cultura MS básico líquido, foram testadas as concentrações de KH₂PO₄ (0,0; 0,0124; 0,124 e 1,24 mmol L⁻¹) no cultivo de segmentos nodais obtidos de plântulas de *Sinningia allgophylla* germinadas *in vitro* com o objetivo de avaliar a adaptação desta espécie às condições de cerrado. O pH inicial de cada tratamento foi ajustado para 4,4. Aos 90 dias de cultivo, os resultados mostraram que maiores crescimentos foram alcançados na maior concentração ou na ausência total de KH₂PO₄, sugerindo que esta espécie apresenta eficiência na utilização de fósforo presente no meio de cultura MS e que a espécie utiliza os nutrientes armazenados em seus tecidos (GOMES; SHEPHERD, 2000).

O efeito de cinco concentrações de fósforo (0,0; 0,312; 0,625; 1,25 e 1,875 mmol L⁻¹) em meio de cultura MS solidificado, sem acréscimo de reguladores de crescimento, foi avaliado utilizando segmentos nodais de *Pfaffia glomerata*, com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, obtidos de culturas estabelecidas *in vitro*. Maior porcentual de explantes enraizados e maior número de raízes por explantes foram obtidos em meio de cultura suplementado com 0,625 mmol L⁻¹ de fósforo, aos 15 dias após a inoculação. Aos 40 dias de cultivo, o crescimento em altura das brotações, número de segmentos nodais por explante, índice de área foliar, número de folhas, massa seca da parte aérea, massa seca das raízes e massa seca total do explante foram maiores em concentração próxima a 1,0 mmol L⁻¹ de fósforo (RUSSOWSKI; NICOLOSSO, 2003).

Utilizando meio de cultura MS básico, líquido e sem reguladores de crescimento, para o estudo de crescimento em diferentes concentrações de fósforo (0,15; 0,30; 0,60; 1,25 e 2,50 mmol L⁻¹), foram cultivadas plântulas de *Aechmea blanchetiana* obtidas a partir da germinação de sementes *in vitro*. O balanço iônico do meio de cultura e a variação das concentrações de fósforo foram estabelecidos com a fonte KH₂PO₄ e KNO₃. A concentração de 2,5 mmol L⁻¹ de fósforo no meio de cultura proporcionou maior produção de massa fresca e seca das plântulas tanto para parte aérea quanto para o sistema radicular. O teor de zinco decresceu, enquanto os teores de fósforo e enxofre cresceram com o aumento da concentração de fósforo; os teores de nitrogênio, potássio, boro, cobre e ferro não foram influenciados pelo aumento da concentração de fósforo e os teores de cálcio, magnésio e manganês decresceram até as concentrações 1,77, 1,59 e 1,57 mmol L⁻¹ de fósforo e, posteriormente, cresceram conforme o aumento da concentração de fósforo (KANASHIRO, 2005).

O efeito da omissão seletiva de fósforo no meio de cultura JADS líquido, em brotações de *Eucalyptus grandis*, aos 21 dias de cultivo, foi verificado por Higashi e Gonçalves (2006). Houve uma redução da massa seca de aproximadamente 18% e de 80% do teor de fósforo em relação aos controles.

2.1.3.3.4 Efeito de potássio

Sriskandarajah; Skirvin; Abu-Qaoud (1990) utilizando o meio de cultura MS básico, verificaram a influência das concentrações de KNO₃ (0,0; 9,39 e 18,79 mmol L⁻¹) combinadas

com a presença e ausência de NH_4NO_3 ($20,61 \text{ mmol L}^{-1}$) no desenvolvimento de raízes adventícias *in vitro* em microestacas de cultivares de *Malus*. As porcentagens de enraizamento e as médias de raízes por microestacas se elevaram com o aumento da concentração de KNO_3 para todas as cultivares na ausência de NH_4NO_3 . No meio de cultura contendo a maior concentração de KNO_3 , houve 100% de microestacas enraizadas para as cultivares ‘Gala’ e ‘Royal Gala’ e 96% para a cultivar ‘Jonalolg’.

Zaidan et al. (1999) avaliaram o comportamento de parâmetros fisiológicos-bioquímicos como crescimento, absorção de nutrientes minerais e seus teores nos tecidos, e os teores de putrescina e poliaminas em *Musa* sp., cultivares ‘Nanica’ e ‘Prata Anã’, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de potássio. Explantes caulinares foram cultivados em meio de cultura MS solidificado, suplementados com BAP ($11,11 \mu\text{mol L}^{-1}$) e modificados nas concentrações de potássio (0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e $30,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Estas concentrações foram estabelecidas com as fontes dos sais KNO_3 e NH_4NO_3 sendo mantida constante a concentração de nitrogênio total do meio de cultura MS em todos os meios. A massa seca e os teores de nutrientes minerais obtidos na parte aérea, raízes e plantas inteiras, em ambas as cultivares, apresentaram uma relação direta entre o desenvolvimento das plântulas e as concentrações de potássio com otimização ao redor de $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ a $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$; nestas concentrações ocorreram os maiores valores para número de plântulas e produção de massa seca, respectivamente. Os teores de putrescina e de poliaminas foram maiores nos níveis mais baixos de potássio, atingindo o máximo na concentração de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Em geral, o íon K^+ foi mais intensamente absorvido do que os outros macronutrientes e micronutrientes sendo que estes tiveram suas absorções diminuídas decorrentes, provavelmente, a um efeito de diluição de seus teores em função do crescimento das plântulas. Adicionalmente, as relações entre potássio e os outros macronutrientes ou com micronutrientes foram crescentes entre $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $30,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

A calogênese em meio de cultura MS de explantes foliares de *Chrysanthemum morifolium* foi influenciada pelo estado nutricional de plantas matrizes crescidas em vaso com areia e irrigada com solução nutritiva variando a concentração de potássio (0; 58,5; 117,0 e $234,0 \text{ mg L}^{-1}$). A massa fresca dos calos obtida foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de potássio fornecida às plantas matrizes; sugerindo que a alta concentração de potássio nos tecidos foliares pode estar interferindo na absorção e disponibilidade de cálcio ou de

magnésio interferindo na calogênese e/ou no crescimento dos calos (BORGATTO et al., 2002). Resultado similar foi por Amaral (2003) trabalhando com *Daucus carota*.

A multiplicação de brotações *in vitro* de *Gypsophila paniculata* foi avaliada em meio de cultura solidificada contendo as soluções de macronutrientes de acordo com George; Puttock; George (1987) e de micronutrientes segundo Murashige e Skoog (1962), variando as concentrações de potássio (0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 80,0 mmol L⁻¹). As massas fresca e seca das culturas aumentaram até a concentração de 10,0 mmol L⁻¹ de potássio e sofreram reduções nas concentrações seguintes. O teor de potássio nas brotações aumentou linearmente até a concentração de 40 mmol L⁻¹ no meio de cultura, sugerindo a ocorrência de absorção passiva. Foi observado que os teores de cálcio e de manganês nas brotações diminuíram com o aumento da concentração de potássio; os teores de magnésio e de enxofre nas brotações reduziram nas duas maiores concentrações de potássio, enquanto os teores de alumínio e de ferro nas brotações aumentaram; os menores teores de boro e de zinco nas brotações foram obtidos na maior e na penúltima concentração de potássio, respectivamente; não houve alteração nos teores de fósforo nas brotações em função das variações das concentrações de potássio (GRIBBLE et al., 2002).

O efeito das concentrações de potássio (1,37; 2,75; 5,5; 11,0 e 22,0 mmol L⁻¹) em meio básico JADS solidificado e suplementado com BAP (2,2 µmol L⁻¹) e AIA (0,57 µmol L⁻¹) foi avaliado por Lima (2004) quanto à sintomatologia visual, produção de massa seca, teor e conteúdo de nutrientes minerais em brotações de três clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, durante fase de multiplicação. A ocorrência de sintomatologias visuais foi específica para cada clone e observada até a concentração de 5,5 mmol L⁻¹ de potássio. A produção de massa seca diferenciou significativamente para todos os clones. Em função do aumento da concentração de potássio, o teor de potássio nas brotações aumentou enquanto os teores de nitrogênio, fósforo, magnésio, manganês e zinco sofreram reduções acentuadas, tanto quanto, os conteúdos totais de nitrogênio, enxofre e zinco, em todos os clones. Os clones apresentaram maior eficiência para a utilização de potássio na menor concentração testada.

No estudo conduzido por Kanashiro (2005), plântulas obtidas a partir da germinação de sementes *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* foram cultivadas em meio de cultura MS básico, líquido e sem reguladores de crescimento, com o objetivo de avaliar o crescimento *in vitro* dessa espécie em diferentes concentrações de potássio (2,5; 5,0; 10,0; 20,0; e 40,0 mmol L⁻¹) obtidas a partir de fonte KNO₃. A concentração estimada de 32,6 mmol L⁻¹ de potássio foi o nível ótimo

para a produção de massa fresca e seca tanto para parte aérea quanto radicular; concentrações superiores a este nível mostraram-se excessivas. Os teores de nitrogênio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, ferro, manganês e zinco decresceram com o aumento da concentração de potássio enquanto os teores de fósforo foram representados significativamente pelo modelo cúbico onde o menor valor da concentração de potássio foi de 10,46 mmol L⁻¹ e o maior, 25,09 mmol L⁻¹, com posterior queda com o aumento da concentração de potássio; o teor de boro não foi influenciado pelo aumento da concentração de potássio e o teor de potássio cresceu com o aumento da concentração de potássio.

Brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas em meio de cultura JADS com omissão seletiva de potássio durante um ciclo de cultivo de 21 dias reduziram a produção de massa seca em aproximadamente 18% e 70% do teor de nitrogênio em relação aos controles (HIGASHI; GONÇALVES, 2006).

2.1.3.3.5 Efeito de cálcio

Teasdale e Richards (1990) cultivaram células de *Pinus radiata* em suspensão em meio MS modificado em concentrações de cálcio (0,2 e 3,0 mmol L⁻¹) e magnésio (1,5 e 7,5 mmol L⁻¹). Um pequeno aumento da produção de células foi obtido quando se aplicou a maior concentração de magnésio ou a menor concentração de cálcio. Quando o meio de cultura foi suplementado com 0,2 mmol L⁻¹ de cálcio e 7,5 mmol L⁻¹ de magnésio, houve redução de ácido bórico nas células em suspensão. O crescimento da cultura de células variou com a concentração de magnésio em função da alteração da concentração de boro. Houve um aumento da concentração de magnésio, em baixa concentração de cálcio.

Das e Mitra (1990) obtiveram multiplicação de brotações em *Eucalyptus tereticornis* em meio de cultura MS modificado onde a concentração de CaCl₂.2H₂O utilizada foi de 146,0 mg L⁻¹. O melhor índice de enraizamento das brotações e de sobrevivência *in vivo* foi obtido em meio de cultura Knop (1865) com as concentrações salinas reduzidas à metade, exceto, para Ca(NO₃).2H₂O, a qual foi reduzida à quarta parte. Nesta etapa também foram reduzidas à metade as soluções de micronutriente e o meio suplementado com AIB (1,0 mg L⁻¹).

Calderon-Baltierra (1994) estudou a influência das concentrações de cálcio (110,0; 220,0 e 440,0 mg L⁻¹) e de ácido giberélico (0,1 e 0,5 mg L⁻¹) no alongamento de brotações de

Eucalyptus globulus cultivado *in vitro* em meio de cultura MS. Brotações alongadas foram obtidas com 440 mg L⁻¹ de cálcio com adição de 0,1 mg L⁻¹ de GA₃. Este procedimento resultou em melhorias na produtividade, na altura dos brotos e na taxa de enraizamento.

O efeito do cálcio como indutor da morfogênese foi estudado por Arruda et al. (2001) utilizando cultura de calos de *Eucalyptus urophylla*. O cálcio na fonte de CaCl₂.2H₂O no meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) influenciou positivamente com relação aos teores de proteínas e açúcares totais e no aumento da atividade da peroxidase. O melhor resultado para a embriogênese foi alcançado com 6,62 mmol L⁻¹ de cálcio.

Maiores taxas de enraizamento de brotações *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus nitens* foram alcançadas quando as soluções de cálcio e de magnésio do meio de cultura MS foram reduzidas à terça parte cada uma e o meio suplementado com 0,5 μmol L⁻¹ de AIB (MOKOTEDI et al., 2000).

Langer (2000) avaliou o efeito de diferentes concentrações de cálcio no crescimento de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* a cada 7 dias, durante 35 dias de cultivo. O meio de cultura básico utilizado foi o JADS modificado nas concentrações de cálcio (0,0; 2,5; 7,5; 10,0 e 15,0 mmol L⁻¹) sendo utilizadas como fonte de nutriente CaCl₂.2H₂O e Ca(NO₃).2H₂O. As concentrações de cálcio influenciaram a produção de massa seca, o número de brotações e a homogeneidade de crescimento das brotações, como também, variaram durante o período de cultivo. As concentrações de cálcio diferenciadas alteraram os teores de nutrientes minerais que variaram em função do período de cultivo; altas concentrações de cálcio não apresentaram sintomas de toxidez enquanto a sua omissão provocou sintomas de deficiências acentuadas nas brotações. A produção de massa seca, número e homogeneidade de crescimento das brotações tanto quanto os teores de nutrientes minerais foram melhores no período de 21 dias de cultivo e concentrações de cálcio a partir de 7,5 mmol L⁻¹ estimularam o crescimento e a diferenciação das brotações.

A calogênese em meio de cultura MS de explantes foliares de *Chrysanthemum morifolium* foi influenciada pelo estado nutricional de plantas matrizes crescidas em vaso com areia e irrigadas com solução nutritiva onde as concentrações de cálcio variaram em (0; 50,0; 100,0 e 200,0 mg L⁻¹) durante 30 e 45 dias. O efeito do cálcio na calogênese mostrou ser dependente da duração do tratamento. Os tratamentos submetidos a 30 dias de exposição ao cálcio, a massa fresca dos calos foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de

cálcio; enquanto os tratamentos submetidos a 45 dias de exposição ao cálcio, a massa fresca dos calos foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de cálcio (BORGATTO et al., 2002).

Gribble et al. (2002) avaliaram a multiplicação de brotações *in vitro* de *Gypsophila paniculata* em meio de cultura solidificado contendo as soluções de macronutrientes de acordo com George et al. (1987) e de micronutrientes segundo Murashige e Skoog (1962) suplementado com reguladores de crescimento e cálcio (0,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mmol L⁻¹). A massa fresca alcançou valor máximo entre as concentrações de 0,64 mmol L⁻¹ e 1,25 mmol L⁻¹ de cálcio enquanto ganhos de massa seca foram observados até a concentração de 1,25 mmol L⁻¹. Os teores de cálcio e de ferro nas brotações aumentaram em função do aumento da concentração de cálcio no meio de cultura e o oposto foi observado para os teores de potássio, enxofre, boro e zinco. Menor teor de magnésio nas brotações foi verificado na maior concentração de cálcio. Esta resposta indica um provável antagonismo entre cálcio na absorção de potássio e magnésio. O teor de fósforo não mostrou tendência com o aumento da concentração de cálcio e o menor teor de manganês foi obtido na maior concentração de cálcio.

Plântulas obtidas a partir da germinação de sementes *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* foram cultivadas em meio de cultura MS básico, líquido e sem reguladores de crescimento, para o estudo de crescimento em concentrações de cálcio (1,5; 3,0; 4,5; 6,0 e 12,0 mmol L⁻¹) obtidas por meio das fontes de nutrientes CaCl₂.2H₂O e Ca(NO₃)₂.4H₂O. Na concentração de 9,38 mmol L⁻¹ de cálcio, em média, houve o maior incremento da produção de massa fresca e seca. As produções de massa fresca e seca sofreram reduções após a concentração 9,38 mmol L⁻¹ de cálcio. Adicionalmente, o fornecimento de cálcio na concentração de 3,0 mmol L⁻¹ utilizando como fonte de nutriente somente CaCl₂.2H₂O, reduziu à produção de massa fresca e massa seca. Os teores de nitrogênio, enxofre, manganês e zinco decresceram com o aumento da concentração de cálcio; os teores de potássio e de magnésio cresceram até as concentrações de 6,91 e 10,04 mmol L⁻¹ de cálcio, respectivamente, enquanto concentrações acima mostraram ser excessivas; os teores de fósforo, boro, cobre e ferro não foram influenciados pelo aumento da concentração de cálcio e o teor de cálcio cresceu com o aumento da concentração de cálcio (KANASHIRO, 2005).

No estudo conduzido por Aranda-Peres (2005), foi avaliado o efeito de concentrações de cálcio (1,5; 3,0; 6,0 e 12,0 mmol L⁻¹) na multiplicação *in vitro* de brotações de *Vriesea*

hieroglyphica, *Vriesea unilateralis* e *Vriesea friburguensis* em meio de cultura MS solidificado e suplementado com BAP ($2,2 \mu\text{mol L}^{-1}$). O ajuste iônico dos meios foi estabelecido utilizando as fontes de nutriente NH_4NO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Em todos os tratamentos, as concentrações de KNO_3 e KH_2PO_4 corresponderam aos valores utilizados no meio de cultura MS e $\frac{1}{2}$ MS, respectivamente. A suplementação de micronutrientes correspondeu à empregada no meio de cultura MS para a concentração de cálcio ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$), enquanto nas três maiores concentrações de cálcio foi duplicada a concentração de cobre e a concentração de ferro foi reduzida à metade. As massas fresca e seca foram maiores na concentração de 12 mmol L^{-1} de cálcio, para todas as espécies. As culturas desenvolvidas nessa concentração diferenciaram-se das demais pelo vigor e coloração verde intenso. Os teores de nitrogênio, potássio e cálcio nas brotações aumentaram com a elevação das concentrações de cálcio no meio de cultura enquanto os teores de magnésio, fósforo e enxofre apresentaram pouca variação. Os maiores teores de cobre foram obtidos nas maiores concentrações de cálcio e o menor teor de ferro relacionou-se à concentração $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de cálcio, para todas as espécies.

O efeito da interação entre cálcio e boro na calogênese em segmentos de hipocótilo de *Eucalyptus urophylla* foi avaliada por Trevisan (2005). O cultivo ocorreu em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) modificado nas concentrações de cálcio (0,0; 3,75; 7,5; 11,25 e $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e de boro (0,0; 25,0; 50,0; 100,0 e $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) utilizando como fonte de nutriente $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e H_3BO_3 , respectivamente. A análise dos calos aos 21 e 31 dias de cultivo indicou que a interação nutricional entre cálcio e boro foi capaz de determinar diferenças importantes quanto à morfologia externa, morfologia interna e parâmetros bioquímicos. Isto evidencia a importância desta interação em processos morfogênicos e metabólicos em calos de *Eucalyptus urophylla* cultivados *in vitro*. Algumas interações favoreceram a formação de meristemóides, desenvolvimento precoce de xilema, raízes, estruturas globulares, variações na produção de massa fresca e massa seca, ocorrência de oxidação, diferenças nos teores de carboidratos, proteínas e prolina. O meio suplementado com cálcio ($7,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e boro ($50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) favoreceu o crescimento dos calos e a ocorrência de calos com antocianina. Meios sem adição de cálcio e de boro formaram calos com menor crescimento e calos com ausência de raízes.

O efeito da omissão seletiva de cálcio no meio de cultura JADS líquido em brotações de *Eucalyptus grandis*, aos 21 dias de cultivo, foi verificado por Higashi e Gonçalves (2006). Houve

redução da massa seca de aproximadamente 15% e de 86% do teor de cálcio em relação aos controles.

2.1.3.3.6 Efeito de magnésio

Foram testadas as variações das concentrações de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,0; 0,015; 0,15 e 1,50 mmol L⁻¹) em meio de cultura MS líquido no cultivo de *Sinningia allgophylla* germinadas *in vitro*. Aos 90 dias de cultivo, os resultados mostraram que os maiores crescimentos foram alcançados na concentração mais elevada ou na ausência de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, sugerindo que esta espécie apresenta eficiência na utilização de magnésio presente no meio de cultura MS e que a espécie utiliza os nutrientes armazenados em seus tecidos (GOMES; SHEPHERD, 2000).

Higashi e Gonçalves (2006) estudando o efeito da omissão seletiva de magnésio no meio de cultura JADS em brotações de *Eucalyptus grandis*, aos 21 dias de cultivo, observaram redução da massa seca de aproximadamente 14% e de 87% do teor de magnésio em relação aos controles.

2.1.3.3.7 Efeito de enxofre

Higashi e Gonçalves (2006) avaliando o efeito da omissão seletiva de enxofre no meio de cultura JADS em brotações de *Eucalyptus grandis*, aos 21 dias de cultivo, observaram redução da massa seca de apenas 11% e de 63% do teor de enxofre em relação aos controles.

2.1.3.4 Nutrientes minerais e teores nutricionais em *Eucalyptus* cultivados *in vitro*

Poucos são os estudos conduzidos *in vitro* com *Eucalyptus* onde se avalia simultaneamente crescimento, produtividade e teores de nutrientes minerais dos tecidos vegetais. Nas Tabelas 2 e 3 estão expressos alguns resultados das análises químicas em brotações de *Eucalyptus* durante a fase de multiplicação.

No sistema de cultivo *in vitro* de *Eucalyptus*, a etapa de multiplicação das brotações é realizada em meio de cultivo sólido ou líquido suplementado com citocinina e/ou citocinina e auxina em uma relação favorável à citocinina como pode ser observado nas referências das Tabelas 2 e 3. O período de avaliação desta etapa varia em função dos trabalhos desenvolvidos.

Entretanto, no estudo conduzido por Correia et al. (1995), melhores crescimento e desenvolvimento de gemas foram obtidos aos 21 dias de cultivo, em meio de cultura JADS. A confirmação deste período de cultivo foi realizada por Langer (2000) onde maior produção de massa seca, número e homogeneidade das brotações estavam correlacionados com melhores teores nutricionais em brotações desenvolvidas em meio de cultura JADS.

Os teores dos nutrientes minerais variam em função do material genético, composição nutricional do meio de cultura, suplementação com reguladores de crescimento e do período de cultivo para a maioria dos nutrientes avaliados (Tabelas 2 e 3). De um modo geral, os teores nutricionais de brotações de *Eucalyptus* cultivadas *in vitro*, tendem a ser maiores quando comparado aos intervalos considerados adequados para cada nutriente tanto para produção de mudas de *Eucalyptus grandis* em viveiro quanto em povoamentos de *Eucalyptus grandis*. Na fase de crescimento de mudas em viveiro existe maior semelhança entre os teores nutricionais obtidos *in vitro* e *in vivo*. Enquanto, os teores de manganês são mais elevados nas culturas *in vivo*.

Kanashiro (2005) cultivando *Aechmea blanchetiana in vitro* em meio de cultura MS sem reguladores de crescimento e Aranda-Peres (2005) cultivando *in vitro* *Vriesea hieroglyphica*, *Vriesea unilateralis* e *Vriesea friburguensis* em meio de cultura MS suplementado com BAP ($2,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) obtiveram a mesma tendência quanto ao aumento de teores foliares de nitrogênio, potássio, fósforo e ferro quando comparados aos intervalos de teores considerados adequados em *Aechmea fasciata* cultivadas em estufas.

A comparação entre os teores nutricionais foliares de *Hevea brasiliensis* mantidas em casa de vegetação, fornecedoras de propágulos para a micropropagação desta espécie e os teores nutricionais encontrados em brotações *in vitro* mostraram aumentos para os valores de nitrogênio, fósforo, potássio, cloro, sódio, manganês e zinco; enquanto, os teores de cálcio, magnésio e cobre reduziram (LARDET et al., 1994). Respostas similares para aumentos dos teores de nitrogênio, fósforo potássio e sódio e reduções dos teores de cálcio e magnésio foram observados em brotações de *Olea europaea* cultivadas *in vitro* quando comparados aos teores foliares de plantas crescidas em campo (COZZA et al., 1997).

Tabela 2 - Teores de macronutrientes em brotações cultivadas *in vitro*, em folhas de mudas em viveiro e em povoamento de *Eucalyptus grandis* e híbridos

Espécie/híbridos	Idade (dias)	Meios de cultura	N	P	K	Ca	Mg	S	Referências
<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	21	JADS ^(1*)	31,90	6,80	32,40	9,80	3,60	2,80	Higashi (1996)
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	21	JADS ^(1*)	30,07	5,90	28,88	11,20	3,40	3,00	Higashi (1996)
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	21	JADS ^(1*)	36,80	6,80	30,60	12,40	3,80	3,70	Higashi (1996)
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	7	JADS ⁽¹⁾	51,21	5,42	36,45	-	3,05	4,45	Langer (2000) ³
	14		48,97	5,31	36,44	-	2,94	4,16	
	21		31,68	3,32	40,94	9,62	4,78	3,54	
	28		28,00	4,22	33,27	9,42	4,28	3,78	
	35		27,51	4,15	29,44	9,61	4,19	3,23	
	28	SEM	40,80	3,70	35,20	5,90	3,90	4,00	
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	28	MEM	51,70	3,70	18,60	17,10	4,40	5,80	Gribble et al. (2002)
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	4	GM ^(2*)	45,64	3,90	35,04	2,14	1,06	2,52	Basso et al. (2003) ⁴
	8		43,26	4,53	65,80	2,70	1,64	2,37	
	12		38,08	4,53	51,38	2,68	1,84	2,08	
	16		34,58	4,16	62,02	2,64	1,74	2,41	
	20		31,50	3,84	74,06	2,48	1,72	2,37	
	24		31,64	3,87	38,24	2,42	1,70	1,92	
	28		30,94	3,72	52,36	2,64	1,60	2,61	
	21	JADS ⁽¹⁾	36,71	3,01	55,26	8,73	4,49	5,06	
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> (A)	21	JADS ⁽¹⁾	23,17	2,76	40,05	10,60	4,32	3,53	Lima (2004)
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> (B)	21	JADS ⁽¹⁾	30,10	2,98	33,32	8,90	5,06	3,43	Lima (2004)
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> (C)	21	JADS ⁽¹⁾	29,60	5,90	30,80	10,70	4,27	3,53	Higashi e Gonçalves (2006)
<i>E. grandis</i>	21	JADS ^(1**)	30-45	2-6	15-35	7,5-15	2-4	2-2,5	Higashi e Gonçalves (2001)
<i>Eucalyptus</i> sp.	21	JADS/GM	30-45	2-6	15-35	7,5-15	2-4	2-2,5	Higashi e Gonçalves (2001)
Mudas de <i>E. grandis</i>	30-45	-	35,0-40,0	3,5-4,0	20,0-25,0	8,0-10,0	4,0-4,5	2,5-3,0	Silveira e Higashi (2002)
Mudas de <i>E. grandis</i>	80-100	-	13,0-15,0	1,5-2,0	15,0-20,0	8,0-12,0	3,0-3,5	1,3-1,5	Silveira e Higashi (2002)
Povoamentos de <i>E. grandis</i>	-	-	21,0-23,0	1,3-1,4	9,0-1,0	5,0-6,0	2,5-3,0	1,5-2,5	Malavolta et al. (1997)

⁽¹⁾Correia et al. (1995) sólido + BAP (2,2 µmol L⁻¹) e AIA (0,57 µmol L⁻¹); ^(1*)Correia et al. (1995) líquido + BAP (0,88 µmol L⁻¹) e AIA (0,57 µmol L⁻¹); ^(1**)Correia et al. (1995) líquido + BAP (2,2 µmol L⁻¹); ^(2*)Gonçalves (1980), líquido + BAP (0,88 µmol L⁻¹) e AIA (0,57 µmol L⁻¹); SEM e MEM, sólido + cinetina (2,3 µmol L⁻¹) e AIA (1,5 µmol L⁻¹); ⁽³⁾Avaliação a cada 7 dias durante 35 dias de cultivo; ⁽⁴⁾Avaliação a cada 4 dias durante 28 dias de cultivo; A, B e C = clones

Tabela 3 - Teores de micronutrientes em brotações cultivadas *in vitro*, em folhas de mudas em viveiro e em povoamento de *Eucalyptus grandis* e híbridos

Espécie/híbridos	Idade (dias)	Meios de cultura	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Na	Referências
<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	21	JADS ^(1*)	-	20,0	800,0	210,0	100,0	1700,0	Higashi (1996)
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	21	JADS ^(1*)	-	20,0	610,0	260,0	90,0	1500,0	Higashi (1996)
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	21	JADS ^(1*)	-	20,0	620,0	260,0	90,0	1800,0	Higashi (1996)
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	7	JADS ⁽¹⁾	22,44	16,25	362,0	148,0	52,0	-	Langer (2000) ⁽³⁾
	14		24,88	15,25	309,0	147,0	52,0	-	
	21		29,60	14,00	240,0	104,0	39,0	-	
	28		23,05	14,75	370,0	173,0	41,0	-	
	35		22,44	15,25	372,0	169,0	41,0	-	
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	28	SEM	60,0	-	43,0	182,0	51,0	2200,0	Gribble et al. (2002)
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	28	MEM	79,0	-	91,0	180,0	82,0	1500,0	Gribble et al. (2002)
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	4	GM ^(2*)	38,16	4,4	243,0	38,0	72,0	1380,0	Basso et al. (2003) ⁽⁴⁾
	8		77,44	3,0	258,0	46,0	78,0	1633,0	
	12		51,25	4,0	328,0	43,0	71,0	1518,0	
	16		59,11	3,0	515,0	46,0	72,0	1656,0	
	20		56,49	3,0	495,0	46,0	70,0	1679,0	
	24		55,18	2,0	264,0	44,0	72,0	1679,0	
	28		52,56	2,0	293,0	44,0	70,0	1702,0	
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> (A)	21	JADS ⁽¹⁾	79,0	10,0	335,0	159,5	53,0	-	Lima (2004)
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> (B)	21	JADS ⁽¹⁾	39,0	5,5	543,0	198,5	42,0	-	Lima (2004)
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> (C)	21	JADS ⁽¹⁾	40,25	10,25	310,0	171,0	37,5	-	Lima (2004)
<i>E. grandis</i>	21	JADS ^(1**)	58,0	22,5	386,0	130,0	47,5	712,0	Higashi e Gonçalves (2006)
<i>Eucalyptus</i> sp.	21	JADS/GM	25-50	8-15	100-350	100-300	40-80	-	Higashi e Gonçalves (2001)
Mudas de <i>E. grandis</i>	30-45	-	40-60	15-20	130-150	300-500	50-70	-	Silveira e Higashi (2002)
Mudas de <i>E. grandis</i>	80-100	-	30-40	10-15	80-130	300-500	30-40	-	Silveira e Higashi (2002)
Povoamentos de <i>E. grandis</i>	-	-	25-30	7-10	100-400	300-400	12-17	-	Malavolta et al. (1997)

⁽¹⁾Correia et al. (1995) sólido + BAP (2,2 µmol L⁻¹) e AIA (0,57 µmol L⁻¹); ^(1*)Correia et al. (1995) líquido + BAP (0,88 µmol L⁻¹) e AIA (0,57 µmol L⁻¹); ^(1**)Correia et al. (1995) líquido + BAP (2,2 µmol L⁻¹); ^(2*)Gonçalves (1980), líquido + BAP (0,88 µmol L⁻¹) e AIA (0,57 µmol L⁻¹); SEM e MEM, sólido + cinetina (2,3 µmol L⁻¹) e AIA (1,5 µmol L⁻¹); ⁽³⁾Avaliação a cada 7 dias durante 35 dias de cultivo; ⁽⁴⁾Avaliação a cada 4 dias durante 28 dias de cultivo; A, B e C = clones

2.1.3.5 Nutrientes minerais e aspectos bioquímicos em *Eucalyptus* cultivados *in vitro*

Os estudos conduzidos envolvendo avaliações sobre aspectos bioquímicos em *Eucalyptus* cultivados *in vitro* são raros. Destes, a maioria visa a compreensão de questões relacionadas ao estresse em plantas observando, principalmente, variações dos teores de carboidratos, proteínas e prolina.

As relações que ocorrem entre os teores de carbono e um nutriente específico podem indicar se uma deficiência nutricional está limitando o crescimento da planta. O crescimento limitado indica que o excesso de carbono foi afastado da produção de metabólitos secundários constituídos de carbono (HAKULINEN, 1998). Enquanto, a síntese de proteínas requer uma demanda por aminoácidos, um alto suprimento por energia e por nutriente. Na sua ausência, os mecanismos de crescimento e de manutenção dos órgãos cessam, restringindo diretamente a taxa de crescimento das plantas (PORTER; LAWLOR, 1991). O acúmulo de prolina em células vegetais, resultado do aumento na via de glutamato ou da ornitina (LEHNINGER, 1995), submetidas a estresse hídrico, tem sido sugerida como um mecanismo de ajuste osmótico (DELAUNEY; VERMA, 1993). Entretanto, alguns autores sugerem outras funções para o acúmulo de prolina, como: estabilizador de estruturas sub-celulares (SCHOBERT; TSCHESCHE, 1978); sequestrante de radicais livres (SARADHI et al., 1995); depósito de energia (HARE; CRESS, 1997); componente da cascata de sinalização molecular do estresse (WERNER; FINKELSTEIN, 1995) e constituinte principal de proteínas da parede celular de plantas (NANJO et al., 1999). Enquanto, vários trabalhos indicam uma alta correlação entre o acúmulo de prolina e o aumento da tolerância à seca, outros sugerem que o acúmulo é simplesmente um efeito do estresse (DELAUNEY; VERMA, 1993; MADAN et al., 1995).

Culturas de brotações de *Eucalyptus microcorys* foram condicionadas em um aumento gradativo de NaCl (de 50,0 mmol L⁻¹ para 150,0 mmol L⁻¹) em meio de cultura MS durante 12 meses consecutivos. Houve inibição do crescimento durante o período adaptativo, sendo este recuperado com o tempo. Durante a adaptação salina, houve redução de pigmentos fotossintéticos menos para feofitina b. Adicionalmente, foram observadas elevações dos níveis de prolina, glicinabetaína, sacarose e glucose. O processo adaptativo era acompanhado por elevação dos níveis de sódio e cloro, como também, da redução de potássio. Crescimento e pigmentos foram

reduzidos em brotações tolerantes à salinidade (150,0 mmol L⁻¹ NaCl) apresentando níveis elevados apenas de prolina, sacarose e glucose (CHEN; KEIPER; FILIPPIS, 1998).

Trevisam (2001) ao analisar calos de *Eucalyptus urophylla in vitro* verificou que o boro interfere na quantificação de proteínas solúveis totais. Na concentração de 50,0 µmol L⁻¹ de boro, houve melhor resposta para crescimento de calos. Houve aumento e redução de proteínas solúveis em culturas de calos em concentrações inferiores e superiores a 50,0 µmol L⁻¹, respectivamente. Nos tratamentos com excesso ou toxidez de boro, observou-se o dobro da concentração de prolina quando comparado aos outros tratamentos. O teor de carboidratos solúveis totais foi significativo apenas na maior concentração de boro (200 µmol L⁻¹).

Em outro estudo, Trevisam (2005) constatou que as interações entre diferentes concentrações de boro e cálcio influenciaram o desenvolvimento de calos de *Eucalyptus urophylla* cultivados *in vitro* quanto à morfologia externa e interna, acúmulo de carboidratos solúveis totais, proteínas solúveis totais e prolina; essas respostas também sofreram interferência do período de cultivo.

Arruda et al. (2001) verificaram a influência do cálcio em quantificações de proteínas solúveis totais. A análise demonstrou que concentrações crescentes de cálcio determinaram aumentos nas concentrações de proteínas solúveis totais em calos de *Eucalyptus urophylla*.

Stefanuto (2002) avaliou diferentes concentrações de cálcio na homeostase em brotações de um clone de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* submetidas à deficiência hídrica. O crescimento relativo não sofreu alterações. Foi observado aumento do conteúdo de prolina, aminoácidos e açúcares solúveis. Aminoácidos solúveis e açúcares solúveis foram mais sensíveis à detecção do estresse hídrico induzido em relação às avaliações histológicas. O cálcio (2,5 mmol L⁻¹) atuou como atenuador nos danos causados pelo estresse hídrico e na tolerância à deficiência hídrica.

Diferentes concentrações de cálcio na homeostase de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* submetidas a diferentes temperaturas foram estudadas por Cantarelli (2002). O cálcio influenciou na resposta da planta à variação de temperatura, contribuindo para a manutenção da homeostase; baixas temperaturas exigiram maiores concentrações de cálcio, enquanto altas temperaturas requereram menores concentrações de cálcio. Houve diferença entre os teores de prolina em função da concentração de cálcio.

Souza; Cardoso; Gonçalves (2002) avaliaram os efeitos da salinidade e da diluição do meio de cultura em plântulas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* cultivados *in vitro*. A massa seca não foi significativa, todavia, as concentrações de açúcares totais e de prolina apresentaram maiores diferenças entre os tratamentos relacionados com a salinidade. Em relação ao controle, as plântulas desenvolvidas em meio de cultura, diluído, tenderam a reduzir as concentrações de açúcares solúveis e de prolina.

O efeito do alumínio na fisiologia e bioquímica em brotações de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* cultivadas *in vitro* foi avaliado por Basso et al. (2003). A adição de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ao meio de cultura Gonçalves (1980) modificado afetou a disponibilidade de cálcio, fósforo e potássio, reduzindo a absorção, contribuindo para maior atividade de fosfatase ácida, acúmulo de poliaminas e a redução da concentração de proteínas totais.

A importância do conceito hierárquico de estresse de plantas foi discutida por Souza e Cardoso (2003). Estudando plântulas de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro*, os autores observaram que as variáveis macroscópicas (crescimento baseado em altura da plântula e massa seca) foram mais sensíveis à deficiência hídrica quando comparadas às variáveis microscópicas (bioquímicas relacionadas com proteínas solúveis, açúcares totais e prolina). Tal resposta sugere que os níveis hierárquicos mais altos (macroscópicos) sofreram uma maior restrição aos estresses que os níveis mais baixos (microscópicos).

Souza; Cardoso; Gonçalves (2004) obtiveram respostas às mudanças de temperatura em brotações aclimatadas e não aclimatadas de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em meio de cultura JADS considerando alterações no nível de prolina e proteínas solúveis totais. Temperatura baixa elevou nível de prolina que se manteve alto após o período de recuperação. Brotações submetidas à temperatura alta foram capazes de recuperar-se dos choques após o período de recuperação.

Avaliações bioquímicas na multiplicação de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas em meios de cultura com omissão seletiva de macronutrientes e micronutrientes mostraram que menores teores de proteínas solúveis totais foram encontrados em meios de cultura com a omissão de nitrogênio, fósforo, cálcio e enxofre; enquanto para carboidratos solúveis não-estruturais totais, menores teores foram observados na omissão de cobre, manganês e potássio; na omissão de zinco, houve maior acúmulo de prolina seguida da omissão de magnésio diferenciando significativamente do controle (HIGASHI; GONÇALVES, 2006).

2.1.4 Interação iônica

Diversos autores têm citado a ocorrência de interações entre íons em plantas (OLSEN, 1972; MARSCHNER, 1995; MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997; MENGEL; KIRKBY, 2001; EPSTEIN; BLOOM, 2005). Grande parte dessas interações iônicas está sintetizada na Tabela 4.

Tabela 4 - Interações entre elementos minerais no processo de absorção em plantas (+ aumento; - diminuição)

Elemento	Inibição ou sinergismo do nutriente mineral																				
	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Co	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Zn	Cd	Cr	Pb	Na	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁻	
N	+				-	-			-					-							
P		+						-	-	-	-	+	-	±		-	-				
K			+	-	-																
Ca			-	+	-		-	-	-	-				-	-						
Mg			-		+									-							
S						+											-				
B							+														
Co								+		-	-			-							
Cu									+	-	-			-	-						
Fe			-					-	-	+	+		-	+							
Mn			-	-	-			-		-	+			-							
Mo									-	-		+									+
Ni										-	-		+	-	-						
Zn									-	-	-			+	-						
Cd										-	-				+						
Cr										-	-					+					
Pb														-			+				
Na			-		-													+			
NO ₃ ⁻		-		-		-						-								+	
NH ₄ ⁻				-	-	-															+

Fonte: Higashi (1996)

Segundo Malavolta; Vitti; Oliveira (1997), a velocidade de absorção de um nutriente mineral pode sofrer aumento, diminuição ou não ser influenciada pela presença de outro elemento. Desta forma, os efeitos interiônicos podem ser definidos como antagonismo, quando a presença de um elemento diminui a absorção de outro cuja toxidez é, assim, evitada; inibição, quando ocorre diminuição da absorção de um elemento sendo esta provocada pela presença de outro íon e sinergismo, quando a presença de um nutriente mineral aumenta a absorção de outro mineral. Assim, o Ca²⁺ atua de forma antagonista sobre o íon Cu²⁺; o Ca²⁺, em alta concentração, apresenta efeito de inibição competitiva sobre o íon K⁺ e, em baixa concentração, o Ca²⁺ tem ação de sinergismo sobre o íon K⁺. O Ca²⁺ apresenta inibição competitiva sobre o íon Zn²⁺.

Enquanto, o K^+ tem efeito de inibição competitiva com relação aos íons Mg^{2+} e Ca^{2+} . Os íons NO_3^- e NH_4^+ têm ação de inibição não competitiva sobre $H_2BO_3^-$. Efeito de inibição não competitiva é apresentado pelo $H_2PO_4^-$ sobre o Zn^{2+} e de sinergismo com relação ao íon MoO_4^{2-} .

Adicionalmente, existem outros fatores internos e externos que influenciam a absorção dos nutrientes como: pH, inibição ou sinergismo com outros íons, efeito do íon acompanhante, níveis de carboidratos, estado iônico interno, características genéticas da planta (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997; CASTRO; KLUGE; PERES, 2005) e interação com hormônios vegetais (PEREZ; KERBAUY, 2005).

Os estudos conduzidos por Banowetz (1992) e Samuelson; Campbell; Larsson (1995) evidenciaram que as citocininas são ativadoras da enzima nitrato redutase. Enquanto, Takei et al. (2001) demonstraram que a aplicação de nitrato induz o acúmulo de citocininas nas raízes, após no suco xilemático e, posteriormente, nas folhas. Desta forma, as citocininas podem representar um sinal de longa distância indicando a disponibilidade de nitrogênio da raiz para o caule.

2.1.5 Equilíbrio iônico dos meios de cultura pela técnica de especiação iônica

O programa de modelagem geoquímico GEOCHEM-PC foi inicialmente desenvolvido para o cálculo do equilíbrio iônico nas soluções do solo e outros sistemas naturais de água (MATTIGOD; SPOSITO, 1979; SPOSITO; MATTIGOD, 1980). Os equilíbrios que podem ser calculados pelo programa GEOCHEM são: complexação, precipitação, oxidação-redução, troca de cátions e adsorção de íons metálicos. Este programa pode ser empregado para: simulação do efeito da mudança do pH, força iônica, potencial redox, conteúdo de água ou a concentração de alguns elementos na solubilidade de um elemento químico escolhido na solução do solo.

A análise do equilíbrio químico de meios de cultura utilizando a técnica de especiação iônica por meio do software GEOCHEM-PC (MATTIGOD; SPOSITO, 1979; SPOSITO; MATTIGOD, 1980) foi utilizada pela primeira vez por Higashi (1996) na avaliação de meios de cultura com omissão seletiva de nutrientes minerais para o cultivo *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Posteriormente, Monteiro et al. (2000) comparou a especiação iônica do meio de cultura MS e de um novo meio de cultura, ambos utilizados no cultivo *in vitro* de *Passiflora edulis* e Langer (2000) verificou o equilíbrio químico do meio de cultura JADS modificado em diferentes concentrações de cálcio para o cultivo de *Eucalyptus*

urophylla x *Eucalyptus grandis*. Basso et al. (2003) avaliaram a especiação iônica do meio de cultura GM (GONÇALVES, 1980) modificado contendo várias concentrações de alumínio visando o crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. A versão do software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) foi utilizada por Gribble et al. (2002) na avaliação da especiação iônica de meios de cultura objetivando a otimização do cultivo *in vitro* de um clone de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

2.2 Material e métodos

O estudo foi conduzido no Laboratório de Fisiologia das Árvores do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba, Estado de São Paulo.

2.2.1 Material vegetal

Foram utilizadas sementes de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, procedentes de Bofete-SP e obtidas na área de produção de sementes da segunda geração (APS: F2), talhão T415, lote B038 da empresa Eucatex S.A. As sementes das progênes dessa procedência são originárias de Coff’s Harbour, Austrália, as quais foram introduzidas no Brasil pela International Paper Company e as progênes encontram-se no talhão 69, em Mogi Guaçu-SP.

O setor de sementes do Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais (IPEF-ESALQ/USP) forneceu as sementes utilizadas neste estudo.

2.2.2 Desinfestação das sementes

Aproximadamente, 1,0 g de sementes foi disposto sobre um pedaço de gaze (10 cm²). As pontas do tecido foram amarradas com auxílio de um barbante e desta forma, as sementes permaneceram em água corrente por 1 hora.

Posteriormente, as sementes ficaram em agitação constante, em solução de hipoclorito de sódio comercial contendo 2% de cloro ativo, com adição de três gotas de Tween 20 para cada 100 mL de solução.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram imersas em água destilada e esterilizada e, lavadas por três vezes consecutivas.

2.2.3 Obtenção de plântulas *in vitro*

Após a desinfestação superficial, as sementes foram inoculadas em meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995) com as concentrações das soluções salinas reduzidas à metade e disponíveis em frascos de vidros transparentes com capacidade volumétrica de 250 mL. Cada frasco, vedado com tampa de polipropileno, continha 40 mL de meio de cultura. Inocularam-se 12 sementes por frasco distanciadas entre si, em aproximadamente 1,0 cm. O procedimento de inoculação ocorreu em câmara de fluxo laminar. Acrescentou-se ao meio de cultura 30 g L⁻¹ de sacarose e 5 g L⁻¹ de ágar Merck®. O pH do meio foi ajustado para 5,8 utilizando KOH 1 N ou KCl 1N, antes do acréscimo do ágar e a sua esterilização deu-se em autoclave à temperatura de 121°C sob pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 15 minutos.

O desenvolvimento das plântulas ocorreu em 50 dias de cultivo, em ambiente à temperatura de 26°C ± 2°C, fotoperíodo de 12/12 horas e radiação ativa fotossintética (PAR) de 50 µmol m² s⁻¹ fornecida por duas lâmpadas fluorescentes Sylvânia®, branca fria, com 110 W cada uma e localizadas a 30 cm do nível em cada prateleira.

2.2.4 Estabelecimento da cultura *in vitro*

Como fontes de explantes, utilizaram-se plântulas com 50 dias de idade após a inoculação, com tamanho entre 4,0 cm a 5,0 cm e, no mínimo, apresentando quatro gemas axilares ao longo do eixo caulinar (Figura 1A). Destas, foram seccionados o 3º e/ou o 4º segmentos nodais estabelecendo um tamanho para estes segmentos caulinares de aproximadamente 1,0 cm.

Foram inoculados dez segmentos nodais por frascos de vidro transparente com capacidade volumétrica de 250 mL. Cada frasco continha 40 mL de meio de cultura JADS suplementado com 2,2 µmol L⁻¹ de BAP, 30 g L⁻¹ de sacarose e 5 g L⁻¹ de ágar Merck®.

Aos 50 dias após a inoculação dos segmentos nodais, realizou-se a primeira transferência dos explantes. Foram transferidos quatro explantes por frasco que continha 40 mL

do mesmo meio de cultura utilizado para a inoculação dos segmentos nodais. Após 21 dias, realizou-se o primeiro subcultivo, seccionando cada explante ao meio e inoculando quatro novos explantes por frasco. Foram realizados mais dois subcultivos respeitando o intervalo de 21 dias de cultivo entre os subcultivos. O número de seccionamentos em cada explante aumentou com o avanço do número de subcultivos. Desta forma, estabeleceu-se a cultura fornecedora de explantes para a instalação do experimento (Figuras 1B).

O meio de cultura utilizado nos respectivos subcultivos foi igual ao utilizado para a inoculação dos explantes. O valor de ajuste do pH e o sistema de esterilização dos meios de cultura utilizados nesta etapa foram realizados de acordo aos citados no item 2.2.3.

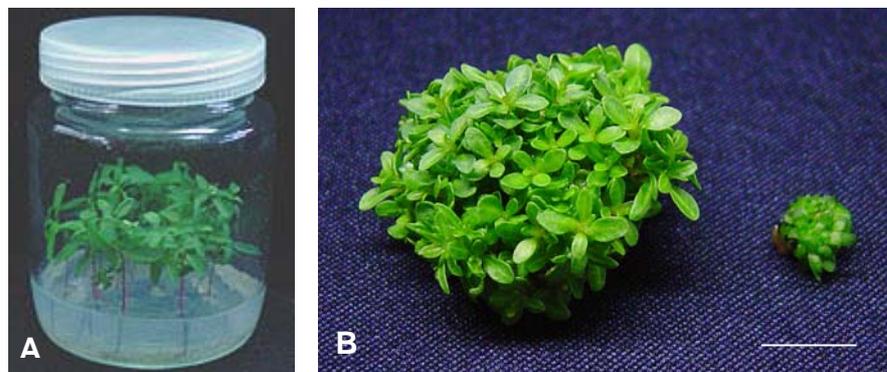


Figura 1 - (A) Plântulas de *Eucalyptus grandis* com 50 dias de idade após a inoculação das sementes *in vitro*; (B) cultura fornecedora de explantes [esquerda] e explante-padrão [direita] com 21 dias de cultivo, utilizadas na instalação do experimento. Barras = 1 cm

2.2.5 Experimento realizado

2.2.5.1 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado com 19 tratamentos e 93 repetições, totalizando 1767 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi composta por 1 frasco com 4 explantes, totalizando 7068 explantes.

O experimento foi conduzido em duas etapas em função da limitação de espaço na sala de crescimento das culturas e da operacionalização do ensaio. A 1^a e a 2^a etapa foram conduzidas com 10 tratamentos e 9 tratamentos, respectivamente. Houve um intervalo de 30 dias entre o início da elaboração das mesmas.

As análises estatísticas foram realizadas no sistema computacional estatístico SAS (SAS INSTITUTE, INC, 1997).

2.2.5.1.1 Definição dos tratamentos

O meio de cultura básico utilizado no estudo foi o meio JADS definido com base em informações sobre teores de nutrientes minerais obtidos em material jovem de *Eucalyptus grandis*.

Os tratamentos constaram de variações nas concentrações dos macronutrientes indicadas na Tabela 5, sendo a concentração 2 correspondente às concentrações de macronutrientes do meio de cultura básico (JADS).

Tabela 5 - Concentrações, em mmol L^{-1} , de macronutrientes definindo os tratamentos do experimento onde a concentração 2 refere-se ao meio de cultura básico JADS

Macronutrientes	Meios de cultura (tratamentos)			
	1	2 (JADS)	3	4
			mmol L^{-1}	
Nitrogênio (N)	17,3	26,0	39,0	58,5
Fósforo (P)	2,0	3,0	4,5	6,75
Potássio (K)	7,3	11,0	16,5	24,75
Cálcio (Ca)	3,3	5,0	7,5	11,25
Magnésio (Mg)	2,0	3,0	4,5	6,75
Enxofre (S)	2,29	3,29	4,79	7,04

Meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995)

A composição, fonte de nutriente, respectivos balanços iônicos e relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ dos meios de cultura modificados em função das variações das concentrações dos macronutrientes encontram-se nos Anexos 1 a 6. Pode-se observar que as concentrações dos nutrientes no meio de cultura básico (2-JADS) foram mantidas constantes nos meios modificados para diferentes concentrações de macronutrientes, exceto para a concentração de SO_4^{2-} na concentração 1 de magnésio (Anexo 5) onde a mesma não foi balanceada. Desta forma, a concentração Mg_1 apresenta $5,29 \text{ mmol L}^{-1}$ de SO_4^{2-} ao invés de $3,29 \text{ mmol L}^{-1}$ SO_4^{2-} existente no meio JADS. Também, houve variação da concentração de Cl^- em relação à existente no JADS em função do ajuste iônico nos tratamentos com nitrogênio (N_1), potássio (K_3 e K_4) e cálcio (Ca_3 e Ca_4).

2.2.5.1.2 Análise estatística do crescimento de brotações em função de períodos de cultivo

O crescimento de brotações foi analisado durante 21 dias de cultivo (0; 7; 14 e 21). Em cada período, 12 unidades experimentais foram aleatoriamente escolhidas sendo utilizadas 48 unidades experimentais no total, por tratamento.

As variáveis massa fresca, massa seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo foram avaliadas. Efetuou-se a análise exploratória dos dados para averiguar as pressuposições de homogeneidade de variâncias, independência dos erros, distribuição normal dos erros, observações discrepantes, efeito de escala, tamanho da amostra para estimar o ruído ao nível nominal e observações influentes. Posteriormente, as análises estatísticas dos resultados experimentais foram realizadas pela análise de variância da regressão tendo como variáveis respostas massa fresca, massa seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo e, como variável independente, o período de cultivo.

A escolha do melhor modelo foi baseada nos coeficientes de determinação ajustados (R^2) e na significância do teste de F do modelo, na significância dos coeficientes de regressão pelo teste 't', de Student considerando um nível aceitável de significância de 1% (BANZATTO; KRONKA, 1995).

Em cada período desta etapa, como também aos 4 dias de cultivo foi verificado o pH dos meios de cultura. Para isto, foram utilizadas 5 unidades experimentais de cada tratamento escolhidas aleatoriamente na medição realizada no 4º dia, e 5 unidades experimentais entre as 12 unidades escolhidas para as avaliações de crescimento no 7º, 14º e 21º dia.

2.2.5.1.3 Análises estatísticas de crescimento, de teores de nutrientes minerais e de parâmetros bioquímicos em brotações aos 21 dias de cultivo *in vitro*

Foram utilizadas 30 unidades experimentais por tratamento, escolhidas aleatoriamente, para a análise do crescimento e de teores de nutrientes minerais em brotações, aos 21 dias de cultivo. Posteriormente, com a massa seca destas unidades experimentais foram estabelecidos 3 grupos constituídos por 10 unidades experimentais cada um, para análise química dos nutrientes minerais e determinando 3 repetições por nutriente analisado. Das 10 unidades experimentais

restantes, coletaram-se brotações aleatoriamente dos explantes para realizar as análises bioquímicas com 3 repetições por variável analisada.

A análise exploratória dos dados foi realizada para averiguar as pressuposições de homogeneidade de variâncias, independência dos erros, distribuição normal dos erros, observações discrepantes, efeito de escala e tamanho da amostra para estimar o ruído ao nível nominal. As transformações dos dados foram definidas de acordo com a potência ótima de Box-Cox. Os efeitos dos tratamentos nas variáveis estudadas foram avaliados mediante análise de variância e teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Aplicou-se uma análise de correlação (coeficiente de correlação de Pearson, $p < 0,05$; Anexo 19) aos dados relacionados ao crescimento, teores de nutrientes minerais e bioquímicos com a finalidade de verificar a intensidade de associação entre estas variáveis. Todas as variáveis foram testadas, exceto a taxa de crescimento relativo por ter apresentado colinearidade com os dados de massa seca. A análise foi realizada com dados de três repetições por tratamento. Para isto, os dados das variáveis relacionadas ao crescimento contendo 30 repetições, foram reunidos em 3 grupos compostos por 10 unidades experimentais cada um. Desta forma, estabeleceram-se três repetições para esta análise.

Adicionalmente, com a verificação de elevado número de correlações significativas entre as variáveis indicadas na matriz de correlação de Pearson (Anexo 19), foi possível submeter os dados relacionados ao crescimento, teores nutricionais e bioquímicos a uma análise multivariada por componentes principais, permitindo desta forma, agrupar as variáveis significativas (coeficientes dos componentes a um valor maior a 0,65 nos auto-vetores) em poucos componentes, facilitando a interpretação das informações. Além disso, a visualização das relações entre variáveis, entre tratamentos e entre variáveis e tratamentos (Anexo 20) que mais influenciaram na multiplicação de brotações foi apresentada em um gráfico 'biplot' (GABRIEL, 1971). Esta análise estatística, representada graficamente, foi definida utilizando os valores médios de cada variável por tratamento.

2.2.6 Condução do experimento

2.2.6.1 Suplementação dos meios de cultura

Os meios de cultura foram utilizados na forma líquida e suplementados, em $\mu\text{mol L}^{-1}$, com: BAP (2,2), piridoxina (2,4); ácido nicotínico (4,0); tiamina (14,8); mioinositol (555,0); L-arginina (40,2); L-glutamina (992,3); L-cisteína (20,6), pantotenato de cálcio (5,0) e sacarose (30 g L^{-1}) conforme Correia et al. (1995).

Em cada frasco foram dispensados 40 mL de meio de cultura líquido. Para favorecer a sustentação dos explantes sobre o meio de cultura, utilizou-se um suporte confeccionado com fibro-espuma medindo aproximadamente de 4,5 cm de diâmetro e 0,7 cm de espessura.

Frascos, sistema de vedação dos mesmos, valor do ajuste do pH dos meios, forma de esterilização dos meios e condições de crescimento das culturas, utilizados nesta etapa, foram realizados de acordo ao citado no item 2.2.3.

2.2.6.2 Caracterização do explante-padrão

O experimento foi instalado fazendo uso de explante-padrão (Figura 1b) constituído por um aglomerado de brotos compactos e uniformes, com diâmetro aproximado de 8,0 mm correspondendo a valores médios de 46,0 mg e 4,1 mg de massa fresca e massa seca, respectivamente, e média da porcentagem da massa seca igual a 8,7%.

2.2.6.3 Variáveis analisadas

2.2.6.3.1 Relacionadas ao crescimento

- a) Massa fresca: cada explante foi lavado várias vezes com água destilada e deionizada; posteriormente, disposto sobre uma toalha de papel absorvente e pesado em mg, em balança analítica eletro-mecânica marca Metter.
- b) Massa seca: cada explante foi colocado em um saco de papel e, posteriormente, levado para a estufa de secagem à temperatura de 60°C , onde permaneceu até obter peso

constante. A pesagem foi realizada, em mg, em balança analítica eletro-mecânica marca Metter.

- c) Porcentagem da massa seca: calculou-se: $[\text{massa seca da unidade experimental} / \text{massa fresca da unidade experimental}] \times 100$
- d) Taxa de crescimento relativo (TCR): foi calculada utilizando a equação definida por Hunt (1982): $\text{TCR} = [(\ln \text{ massa seca final} - \ln \text{ massa seca inicial}) / \text{tempo 2} - \text{tempo 1}] \times 100$; onde, $\ln \text{ massa seca final} = \ln \text{ da massa seca no tempo 2}$ e $\ln \text{ massa seca inicial} = \ln \text{ da massa seca no tempo 1}$.

2.2.6.3.2 Análise dos nutrientes minerais do material vegetal

As determinações dos nutrientes minerais (N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Cu, Mn, Na e Cl) do material vegetal foram realizadas no Laboratório de Química Analítica do Departamento de Solos e Nutrição Mineral da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

Após a secagem do material vegetal, as unidades experimentais de cada tratamento foram agrupadas, misturadas e, desta forma, definiram-se três amostras. As amostras foram moídas individualmente, digeridas em ácido nítrico-perclórico (P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn, Zn e Na) e ácido sulfúrico (N) para a obtenção dos extratos visando à determinação dos nutrientes minerais conforme metodologia descrita por Malavolta; Vitti; Oliveira (1997). A determinação de P foi realizada pelo método da colorimetria de metavanadato; K, por fotometria de chama de emissão; Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn e Na por espectrometria de absorção atômica; S, por turbidimetria de sulfato de bário; B, por colorimetria de azotometina H; Cl, por titulometria do nitrato de prata e, N, pelo método semi-micro Kjeldahl.

2.2.6.3.3 Análise bioquímica do material vegetal

2.2.6.3.3.1 Quantificação de proteínas solúveis totais (Método de Bradford, 1976)

a) Extração de proteínas

- Preparo da solução de extração: foram dispensados em um beaker 4 mL de tampão tris-HCl pH 6,8; 1,6 mL de β -mercaptoetanol; 6,4 mL de SDS-10% (p/v); 6,4 mL de glicerol; 3,2 mL de

DMSO; 1-3 g de PVP 40; 10,4 mL de água destilada e deionizada. Posteriormente, a solução foi colocada sob agitação magnética por 45 minutos.

- Preparo das amostras de brotações para posterior quantificação: foram coletadas aleatoriamente brotações de dez unidades experimentais para a formação das amostras com ± 500 mg (material vegetal fresco) para cada tratamento. O material foi macerado em gral de porcelana com 4 mL da solução de extração para cada tratamento. Após a maceração, o material vegetal permaneceu por 1 hora em reação à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi aquecida até ferver permanecendo em reação por 3 minutos. Após resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 13.444,14 g durante 300 segundos, obtendo-se desta forma, o extrato bruto. O sobrenadante foi coletado com auxílio de micropipeta e utilizado para a quantificação do teor de proteínas solúveis totais.

b) Quantificação de proteínas solúveis totais

- Preparo da solução-estoque de BSA (albumina bovina): pesou-se 0,5 mg de BSA/mL de NaCl 0,5 M. A solução foi homogeneizada por meio de um agitador magnético.

- Preparo da solução de Coomassie Brilliant Blue G 250: em um balão volumétrico (1 L) foram dissolvidos 100 mg de Coomassie Brilliant Blue em 50 mL de etanol. A solução foi agitada vigorosamente e, lentamente foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico concentrado. Completou-se o volume com água destilada e deionizada. A solução foi filtrada em papel de filtro Whatman n°1.

- Preparo da curva analítica de calibração e leitura das amostras: a curva analítica de calibração foi realizada, em triplicata, com os seguintes padrões: 0; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180 e 200 mg de albumina bovina L⁻¹. Adicionou-se o volume de 500 μ L de solução NaCl 0,5 M, sendo que o volume final foi completado para 5 mL com a solução de Coomassie. A curva analítica de calibração foi estabelecida a 595 nm em espectrofotômetro e com ela obteve-se a equação da reta ($Y = 0,2221 + 0,0049 X$; $R^2 = 0,95$) por meio da qual foi possível a determinação do teor de proteínas totais em cada tratamento na forma de mg de proteínas g⁻¹ de material vegetal fresco. Para a quantificação dos teores de proteínas totais nas amostras, foram

acrescentados 50 µL de amostra em 4,5 mL de solução de Coomassie. Posteriormente, procedeu-se à leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

2.2.6.3.3.2 Determinação de carboidratos não-estruturais solúveis totais – Método de Antrona (YENM; WILLIS, 1954)

a) Extração de carboidratos não-estruturais solúveis totais: brotações foram coletadas aleatoriamente utilizando dez unidades experimentais para a formação das amostras de ± 500 mg (material vegetal fresco) para cada tratamento. A maceração do material procedeu-se em gral de porcelana com a adição de 10 mL de etanol 80% (v/v). Esse extrato foi filtrado em papel de filtro Whatman nº1 e o volume recolhido foi mantido em estufa a 45°C até a evaporação total do álcool (aproximadamente 17 horas). Após a evaporação, as amostras foram novamente suspensas em 30 mL de água destilada e deionizada.

b) Determinação com reagente de antrona

- Preparo do reagente de antrona: foram adicionados 45 mL de ácido sulfúrico concentrado e 100 mg de antrona em 5 mL de água destilada e deionizada. A solução foi deixada por 30 minutos em temperatura ambiente, sendo agitada ocasionalmente para obter-se a clarificação da mesma.

- Preparo da curva analítica de calibração de glicose: foi preparada uma curva analítica de calibração, em triplicata, com os seguintes padrões de glicose: 0; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175 e 200 mg de glicose L⁻¹. De cada padrão, pipetou-se 1 mL e em seguida, foram adicionados 7 mL do reagente de antrona. A solução foi agitada e aquecida em água fervente por 10 minutos. Após resfriamento em gelo, procedeu-se à leitura a 625 nm em espectrofotômetro obtendo-se a curva analítica de calibração e a equação da reta ($Y = 0,0505 + 0,0054 X$; $R^2 = 0,99$) que melhor se adaptou aos pontos obtidos. Procedeu-se então, à leitura das amostras, e com a equação obtida mediante a curva analítica de calibração, foi possível a estimativa da concentração de carboidratos não-estruturais totais (em mg de glicose g⁻¹ de material vegetal fresco) para cada tratamento proposto.

2.2.6.3.3.3 Determinação dos níveis de prolina (modificado de BATES; WALDREN; TEARE, 1973)

a) Extração da prolina: brotações foram coletadas aleatoriamente em dez unidades experimentais para a formação das amostras de ± 500 mg (material vegetal fresco) para cada tratamento. Os materiais foram macerados em gral de porcelana em 10 mL de solução de ácidos sulfosalicílico a 3% (m/v). Os extratos foram centrifugados a 3.360,70 g durante 900 segundos.

b) Determinação com reagente de ninidrina ácida

- Preparo do reagente: em um beaker foram adicionados 1,25 g de ninidrina, 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico 6 M (404,58 mL de H_3PO_4 85% em 1 L H_2O), sob agitação, até a dissolução e homogeneização completa da solução.

- Preparo da curva analítica de calibração de prolina:

As concentrações padrões de prolina usadas, em triplicatas, para a construção da curva de calibração foram: 0; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180 e 200 mg de prolina L^{-1} . De cada padrão, pipetou-se 2 mL, em seguida foram adicionados 2 mL de ninidrina ácida e 2 mL de acético glacial. Os tubos foram vedados com papel alumínio e mantidos em banho fervente por 1 hora. Posteriormente, resfriados em banho de gelo.

Prosseguiu-se, então, à leitura a 520 nm em espectrofotômetro obtendo-se a curva analítica de calibração e a equação da reta ($Y = - 0,0412 + 0,0439X$; $R^2 = 0,99$) que melhor se enquadrou aos pontos obtidos. Em seguida, realizou-se à leitura das amostras, e com a equação obtida mediante a curva de ajuste dos pontos, tornou-se possível obter a estimativa da concentração de prolina (em μg de prolina g^{-1} de material vegetal fresco) para cada tratamento proposto.

2.2.6.4 Análise do equilíbrio iônico dos meios de cultura

A análise do equilíbrio iônico dos diferentes meios de cultura foi realizada utilizando a técnica de especiação iônica por meio do software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995).

Antes da aplicação do programa GEOCHEM, obteve-se a concentração molar total de todas as espécies (metais e ligantes) para cada meio de cultura. O cálculo foi realizado com os valores das concentrações transformados em log x e com os valores de pH obtidos após a esterilização dos meios de cultura.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Análise do equilíbrio iônico dos meios de cultura

Na aplicação do programa GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) obteve-se a distribuição das espécies (metal e ligante) em cada meio de cultura pelo cálculo do equilíbrio iônico, bem como, as suas prováveis espécies iônicas livres e ligadas ou precipitadas.

Os resultados do programa GEOCHEM encontram-se nos Anexos 7 a 18. Verifica-se que o equilíbrio iônico dos meios de cultura sofreu alterações em função dos tratamentos. Pode-se observar que a maioria das espécies iônicas encontra-se disponível para o cultivo *in vitro* das brotações na forma livre ou ligada ao EDTA_4^- . Esta alta porcentagem do total de cada elemento disponível em sua forma iônica preferencial para a absorção também foi observada na especiação iônica do meio de cultura MS e MS modificado para o cultivo *in vitro* de *Passiflora edulis* (MONTEIRO et al., 2000), do meio de cultura específico para o cultivo *in vitro* de um clone híbrido de *Eucalyptus* (GRIBBLE et al., 2002) e do meio de cultura GM (BASSO et al., 2003).

Por outro lado, independente do tratamento, verifica-se que, em média 14,0% do total de Fe^{2+} ($0,200 \text{ mmol L}^{-1}$) e 14,8% do total de SO_4^{2-} ($3,29 \text{ mmol L}^{-1}$) adicionados nos meios de cultura estão ligados ao PO_4^{3-} e Ca^{2+} , respectivamente, evidenciando a indisponibilidade de uma proporção considerável de ferro e de enxofre ao cultivo das brotações.

Entre os tratamentos, as concentrações de fósforo e cálcio foram as que mais influenciaram os resultados das estimativas das espécies iônicas relacionadas principalmente aos metais Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e aos ligantes SO_4^{2-} e PO_4^{3-} . Tais resultados encontram-se sintetizados nas Tabelas 6, 7, 8, 9 e 10.

Na Tabela 6, pode-se observar que maiores variações das porcentagens das espécies de cálcio encontram-se nos tratamentos de fósforo, cálcio e aqueles contendo maiores concentrações de enxofre (Mg_1 , S_3 e S_4). Com a elevação das concentrações de fósforo, houve redução de Ca^{2+} livre e aumento de Ca^{2+} ligado ao PO_4^{3-} . Enquanto a elevação da concentração de cálcio

favoreceu o aumento de Ca^{2+} livre e a redução de Ca^{2+} ligado ao SO_4^{2-} . Nota-se, que as porcentagens de Ca^{2+} livre reduziram em meios de cultura com maior concentração de enxofre S_3 (4,79 mmol L^{-1}), Mg_1 (5,29 mmol L^{-1}) e S_4 (7,04 mmol L^{-1}). Nestes tratamentos foram observadas maiores porcentagens de Ca^{2+} ligado ao SO_4^{2-} , como também menores porcentagens de Ca^{2+} livre em S_4 e Mg_1 com relação aos demais tratamentos. Entre S_1 e S_4 ocorreu um aumento de Ca^{2+} ligado ao SO_4^{2-} correspondente a 62,2%, provavelmente formando sulfato de cálcio.

Observa-se na Tabela 7 que com as elevações das concentrações de fósforo ocorreram reduções das porcentagens de Fe^{2+} livre e Fe^{2+} ligado ao EDTA_4^- , como também aumentos das porcentagens relacionadas com Fe^{2+} ligado ao PO_4^{3-} . Com esta tendência, do total da concentração de ferro existente no meio de cultura contendo a concentração P_4 , apenas 12,53% e 64,04% encontram-se na forma Fe^{2+} livre e ligado ao EDTA_4^- , respectivamente, ambas disponíveis às culturas e 22,11% não estão disponíveis em função da sua ligação ao íon PO_4^{3-} . Por outro lado, o aumento da concentração de cálcio proporcionou elevação das porcentagens de Fe^{2+} livre e redução de Fe^{2+} ligado ao EDTA_4^- .

Na Tabela 8, os dados revelam que houve redução das porcentagens de Mn^{2+} livre e de Mn^{2+} ligado ao SO_4^{2-} , como também aumento das porcentagens de Mn^{2+} ligado ao EDTA_4^- em função da elevação das concentrações de fósforo. Enquanto nas concentrações de cálcio foram observados aumentos das porcentagens de Mn^{2+} livre e reduções do Mn^{2+} ligado ao EDTA_4^- de acordo com a elevação das concentrações de cálcio. Houve redução das porcentagens de Mn^{2+} livre e aumento do Mn^{2+} ligado ao SO_4^{2-} em função do aumento da concentração de enxofre.

Quanto às espécies predominantes de SO_4^{2-} (Tabela 9), foram observadas reduções das porcentagens de SO_4^{2-} livre e de SO_4^{2-} ligado ao Mg^{2+} , bem como aumento de SO_4^{2-} ligado ao Ca^{2+} em função da elevação da concentração de cálcio. Esta espécie iônica também foi influenciada pelo aumento das concentrações de magnésio, onde as porcentagens de SO_4^{2-} livre reduziram enquanto as porcentagens de SO_4^{2-} ligado ao Mg^{2+} se elevaram.

Verifica-se na Tabela 10 que a elevação da concentração de cálcio proporcionou reduções da porcentagem de PO_4^{3-} ligado ao H^+ e aumento de PO_4^{3-} ligado ao Ca_2^+ . Nas concentrações Ca_4 obteve-se menor porcentagem de PO_4^{3-} livre (86,60%) e maior porcentagem de PO_4^{3-} ligado ao Ca_2^+ (11,91%).

Ficou evidente que as alterações das concentrações de macronutrientes influenciaram no estabelecimento das ligações iônicas de acordo com suas afinidades e, provavelmente, muitas

delas não disponíveis ao desenvolvimento das culturas. Isto foi observado com muita clareza em concentrações de níveis mais elevados.

Os resultados da especiação iônica do meio de cultura JADS, com pH inicial 5,38 obtidos neste estudo foram aproximados ao resultado da especiação iônica do tratamento controle (JADS) realizada com pH inicial fixado em 5,8 realizado por Higashi (1996). Também houve semelhança com os resultados obtidos por Langer (2000) em relação às concentrações 5,0 e 7,5 mmol L⁻¹ de cálcio correspondentes a este estudo, quando analisou a especiação iônica do meio de cultura JADS com diferentes concentrações de cálcio (0,0; 2,0; 5,0; 7,5; 10,0 e 15,0 mmol L⁻¹), fixando o pH inicial em 5,8, para todos os tratamentos.

Essas respostas indicam a importância da análise da especiação iônica dos meios nutritivos em sistemas de cultivo *in vitro* para maior compreensão das possíveis interações iônicas e suas ligações com os teores de nutrientes minerais analisados nos tecidos vegetais, bem como estabelecer prováveis correlações com as respostas morfogênicas e metabólicas.

Por outro lado, existem fatores internos e externos que influenciam a velocidade de absorção iônica como: pH, aeração ou concentração de oxigênio, umidade, temperatura, crescimento, característica do elemento (efeito do íon acompanhante), inibição ou sinergismo com outros íons, concentração de carboidrato, estado iônico interno, intensidade transpiratória e as características genéticas da planta (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997; CASTRO; KLUGE; PERES, 2005).

Adicionalmente, o programa GEOCHEM possibilita a obtenção da simulação do equilíbrio iônico dos meios de cultura e as possíveis espécies iônicas existentes nos meios, mas o mesmo não permite a inclusão das concentrações de outros componentes do meio, como reguladores de crescimento, vitaminas e açúcares. Neste sentido, as respostas poderiam ser diferentes. Ademais, esta análise refere-se ao equilíbrio iônico inicial dos meios nutritivos e a disponibilidade dos íons sofre alterações ao longo do período de cultivo.

Tabela 6 - Espécies predominantes de cálcio estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes para o cultivo de *Eucalyptus grandis in vitro*

Tratamentos mmol L ⁻¹	Espécies iônicas				Outros ⁽¹⁾
	Ca ²⁺	Ca ²⁺ - SO ₄ ²⁻	Ca ²⁺ - PO ₄ ³⁻	% do total	
JADS *	86,21	9,73	3,98		0,08
N ₁ 17,30	85,62	10,19	4,10		0,08
N ₃ 39,00	86,88	9,28	3,75		0,08
N ₄ 58,50	87,78	8,55	3,58		0,08
P ₁ 2,00	87,50	9,84	2,58		0,08
P ₃ 4,50	84,56	9,57	5,77		0,09
P ₄ 6,75	82,54	9,38	7,98		0,11
K ₁ 7,30	85,80	10,14	3,98		0,08
K ₃ 16,50	86,87	9,14	3,89		0,10 ^(*)
K ₄ 24,75	87,80	8,40	3,65		0,14 ^(*)
Ca ₁ 3,30	85,26	10,52	4,13		0,09
Ca ₃ 7,50	87,54	8,70	3,65		0,10 ^(*)
Ca ₄ 11,25	89,21	7,46	3,21		0,13 ^(*)
Mg ₁ 2,00	81,19	15,06	3,66		0,08
Mg ₃ 4,50	86,67	9,27	3,98		0,08
Mg ₄ 6,75	87,47	8,57	3,87		0,10
S ₁ 2,29	87,75	7,00	4,16		0,09
S ₃ 4,79	82,80	13,37	3,75		0,08
S ₄ 7,04	77,90	18,51	3,52		0,08

(N₂ = 26,0; P₂ = 3,0; K₂ = 11,0; Ca₂ = 5,0; Mg₂ = 3,0; S₂ = 3,29 mmol L⁻¹); ⁽¹⁾Ca²⁺ ligado ao EDTA₄⁻ ou ^()Σ Ca²⁺ ligado ao EDTA₄⁻ e Ca²⁺ ligado ao Cl⁻

Tabela 7 - Espécies predominantes de ferro estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes para o cultivo de *Eucalyptus grandis in vitro*

Tratamentos mmol L ⁻¹	Espécies iônicas			Outros ⁽¹⁾
	Fe ²⁺	Fe ²⁺ - PO ₄ ³⁻	Fe ²⁺ - EDTA	
JADS *	17,25	13,99	66,93	1,84
N ₁ 17,30	17,06	14,21	66,89	1,85
N ₃ 39,00	17,64	13,41	67,08	1,87
N ₄ 58,50	17,96	13,01	67,17	1,86
P ₁ 2,00	19,60	10,23	68,09	2,08
P ₃ 4,50	14,99	17,75	65,67	1,59
P ₄ 6,75	12,53	22,11	64,04	1,32
K ₁ 7,30	17,20	13,97	66,95	1,88
K ₃ 16,50	17,52	13,66	67,08	1,74
K ₄ 24,75	17,87	13,23	67,27	1,64
Ca ₁ 3,30	16,64	14,14	67,33	1,89
Ca ₃ 7,50	18,20	13,59	66,47	1,74
Ca ₄ 11,25	19,52	12,99	65,90	1,60
Mg ₁ 2,00	16,72	13,36	67,22	2,70
Mg ₃ 4,50	17,42	13,81	66,97	1,79
Mg ₄ 6,75	17,70	13,57	67,02	1,72
S ₁ 2,29	17,53	14,26	66,80	1,41
S ₃ 4,79	16,93	13,48	67,15	2,43
S ₄ 7,04	16,38	12,87	67,43	3,31

*(N₂ = 26,0; P₂ = 3,0; K₂ = 11,0; Ca₂ = 5,0; Mg₂ = 3,0; S₂ = 3,29 mmol L⁻¹); ⁽¹⁾Σ Fe²⁺ ligado ao SO₄²⁻ e Fe²⁺ ligado ao NO₃⁻

Tabela 8 - Espécies predominantes de manganês estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes para o cultivo de *Eucalyptus grandis in vitro*

Tratamentos mmol L ⁻¹	Espécies iônicas				
	Mn ²⁺	Mn ²⁺ - PO ₄ ³⁻	Mn ²⁺ - EDTA	Outros ⁽¹⁾	
		% do total			
JADS	*	37,57	4,24	58,19	0,05
N ₁	17,30	37,24	4,43	58,28	-
N ₃	39,00	38,10	4,07	57,83	-
N ₄	58,50	38,60	3,76	57,63	-
P ₁	2,00	39,97	4,50	55,46	0,08
P ₃	4,50	34,95	3,96	61,09	-
P ₄	6,75	31,69	3,60	64,71	-
K ₁	7,30	37,43	4,42	58,15	-
K ₃	16,50	37,83	3,98	57,81	0,39
K ₄	24,75	38,12	3,65	57,30	0,93
Ca ₁	3,30	36,52	4,41	58,98	-
Ca ₃	7,50	38,96	3,87	56,81	0,36
Ca ₄	11,25	40,72	3,40	54,99	0,89
Mg ₁	2,00	35,83	6,65	57,52	-
Mg ₃	4,50	37,87	4,05	58,07	-
Mg ₄	6,75	38,32	3,37	57,92	-
S ₁	2,29	38,47	3,04	58,50	-
S ₃	4,79	36,44	5,88	57,68	-
S ₄	7,04	34,72	8,25	57,03	-

*(N₂ = 26,0; P₂ = 3,0; K₂ = 11,0; Ca₂ = 5,0; Mg₂ = 3,0; S₂ = 3,29 mmol L⁻¹); ⁽¹⁾ Mn²⁺ ligado ao Cl⁻

Tabela 9 - Espécies predominantes de enxofre estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes para o cultivo de *Eucalyptus grandis in vitro*

Tratamentos mmol L ⁻¹	Espécies iônicas			Outros ⁽¹⁾	
	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻ - Ca ²⁺	SO ₄ ²⁻ - Mg ²⁺		
		% do total			
JADS	*	74,53	14,72	7,40	3,35
N ₁	17,30	73,37	15,42	7,76	3,45
N ₃	39,00	75,60	14,04	7,04	3,32
N ₄	58,50	77,41	12,95	6,48	3,09
P ₁	2,00	74,32	14,90	7,42	3,07
P ₃	4,50	74,80	14,49	7,37	3,09
P ₄	6,75	75,06	14,19	7,40	3,10
K ₁	7,30	74,57	15,35	7,72	2,36
K ₃	16,50	74,45	13,83	6,92	4,82
K ₄	24,75	74,29	12,72	6,34	6,65
Ca ₁	3,30	77,87	10,52	8,03	3,59
Ca ₃	7,50	70,38	19,94	6,59	3,10
Ca ₄	11,25	66,39	25,26	5,61	2,74
Mg ₁	2,00	77,34	14,38	4,83	3,44
Mg ₃	4,50	72,32	14,03	10,41	3,26
Mg ₄	6,75	69,42	12,98	14,55	2,95
S ₁	2,29	73,63	15,32	7,66	3,40
S ₃	4,79	74,54	14,00	7,08	3,38
S ₄	7,04	76,88	13,10	6,68	3,33

*(N₂ = 26,0; P₂ = 3,0; K₂ = 11,0; Ca₂ = 5,0; Mg₂ = 3,0; S₂ = 3,29 mmol L⁻¹); ⁽¹⁾ Σ SO₄²⁻ ligado ao K⁺, Na⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ e H⁺

Tabela 10 - Espécies predominantes de fósforo estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes para o cultivo de *Eucalyptus grandis in vitro*

Tratamentos mmol L ⁻¹	Espécies iônicas			
	PO ₄ ³⁻ - H ⁺	PO ₄ ³⁻ - Ca ²⁺ % do total	Outros ⁽¹⁾	
JADS	*	91,17	6,60	2,23
N ₁	17,30	90,79	6,81	2,40
N ₃	39,00	91,66	6,23	2,11
N ₄	58,50	92,11	5,95	1,95
P ₁	2,00	91,29	6,48	2,22
P ₃	4,50	91,42	6,47	2,21
P ₄	6,75	92,56	5,92	1,53
K ₁	7,30	91,14	6,60	2,26
K ₃	16,50	91,28	6,45	2,26
K ₄	24,75	91,98	6,06	1,96
Ca ₁	3,30	93,14	4,53	2,32
Ca ₃	7,50	88,85	9,18	1,94
Ca ₄	11,25	86,60	11,91	1,49
Mg ₁	2,00	92,28	6,08	1,65
Mg ₃	4,50	90,30	6,60	3,09
Mg ₄	6,75	89,54	6,42	4,04
S ₁	2,29	90,66	6,90	2,43
S ₃	4,79	91,65	6,22	2,13
S ₄	7,04	92,06	5,83	2,10

*(N₂ = 26,0; P₂ = 3,0; K₂ = 11,0; Ca₂ = 5,0; Mg₂ = 3,0; S₂ = 3,29 mmol L⁻¹); ⁽¹⁾Σ PO₄³⁻ ligado ao Mg²⁺ e ligado ao Fe²⁺

2.3.2 Crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes em função de períodos de cultivo

2.3.2.1 Valores de pH

Os valores de pH nos diferentes meios de cultura durante o ciclo de cultivo estão indicados na Tabela 11. Após a esterilização em autoclave, os valores de pH dos meios de cultura, inicialmente ajustados para 5,8, reduziram em torno de 0,4 unidade, exceto em P₄ (0,6 unidade) e Ca₄ (0,7 unidade) onde as diminuições foram mais acentuadas.

A ocorrência de redução do pH nos meios de cultura após a esterilização em autoclave também foi observada em estudos conduzidos com meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981) líquido (EYMAR et al., 2000) e MS solidificado (WILLIAMS; TAJI; WINNEY, 1991; MEZZETTI; ROSATI; CASALICCHIO, 1991; DINIZ et al., 1999a,b; DANTAS et al., 2001; RUZIC et al., 2001). A redução do valor do pH em meio WPM líquido foi similar à obtida neste estudo, aproximadamente 0,4 unidade, enquanto em meio MS sólido, ficou em torno 0,2 unidade.

Tabela 11 - Variação dos valores de pH em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes para o crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis in vitro* em função do período de cultivo

Tratamentos mmol L ⁻¹	pH				
	0 (inicial)	4	7	14	21
Período de cultivo (dias)					
JADS *	5,38 ± 0,015	5,12 ± 0,156	4,44 ± 0,289	4,13 ± 0,210	4,84 ± 0,360
N ₁ 17,30	5,41 ± 0,001	5,31 ± 0,129	5,02 ± 0,297	5,41 ± 0,252	5,99 ± 0,070
N ₃ 39,00	5,37 ± 0,005	4,98 ± 0,190	4,52 ± 0,258	4,05 ± 0,190	4,34 ± 0,286
N ₄ 58,50	5,36 ± 0,033	4,46 ± 0,140	4,37 ± 0,131	4,40 ± 0,300	4,80 ± 0,237
P ₁ 2,00	5,34 ± 0,029	5,08 ± 0,201	4,24 ± 0,250	4,80 ± 0,129	5,28 ± 0,377
P ₃ 4,50	5,43 ± 0,007	4,87 ± 0,254	4,49 ± 0,289	4,14 ± 0,208	4,90 ± 0,427
P ₄ 6,75	5,20 ± 0,003	4,97 ± 0,126	4,27 ± 0,174	4,14 ± 0,195	4,91 ± 0,427
K ₁ 7,30	5,40 ± 0,012	4,95 ± 0,212	4,44 ± 0,225	4,50 ± 0,272	4,78 ± 0,378
K ₃ 16,50	5,42 ± 0,029	4,69 ± 0,223	4,63 ± 0,262	4,03 ± 0,070	4,98 ± 0,420
K ₄ 24,75	5,33 ± 0,006	4,93 ± 0,242	4,21 ± 0,224	4,32 ± 0,268	5,48 ± 0,426
Ca ₁ 3,30	5,40 ± 0,009	4,87 ± 0,199	4,44 ± 0,162	5,03 ± 0,124	4,74 ± 0,291
Ca ₃ 7,50	5,32 ± 0,007	4,99 ± 0,104	4,74 ± 0,201	4,47 ± 0,199	6,00 ± 0,156
Ca ₄ 11,25	5,12 ± 0,012	4,92 ± 0,105	4,62 ± 0,261	4,40 ± 0,249	4,74 ± 0,337
Mg ₁ 2,00	5,35 ± 0,006	4,84 ± 0,169	4,29 ± 0,181	4,88 ± 0,233	4,70 ± 0,271
Mg ₃ 4,50	5,45 ± 0,013	5,04 ± 0,204	4,49 ± 0,195	5,08 ± 0,409	6,06 ± 0,089
Mg ₄ 6,75	5,43 ± 0,021	5,44 ± 0,082	4,92 ± 0,251	5,33 ± 0,322	6,01 ± 0,302
S ₁ 2,29	5,43 ± 0,006	4,93 ± 0,229	4,64 ± 0,300	5,24 ± 0,146	5,52 ± 0,363
S ₃ 4,79	5,39 ± 0,003	4,88 ± 0,212	4,56 ± 0,246	4,37 ± 0,279	5,13 ± 0,441
S ₄ 7,04	5,42 ± 0,001	4,67 ± 0,169	4,57 ± 0,265	4,44 ± 0,271	4,83 ± 0,245
Média	5,36	4,94	4,52	4,58	5,15
Amplitude	0,33	0,98	0,84	1,38	1,72

Média ± erro padrão da média; n = 5; * (N₂ = 26,0; P₂ = 3,0; K₂ = 11,0; Ca₂ = 5,0; Mg₂ = 3,0; S₂ = 3,29 mmol L⁻¹)

Essas reduções dos valores de pH verificadas após a autoclavagem podem ser atribuídas principalmente, à precipitação de cátions em meios com pH mais elevados e em função do aumento da temperatura necessária à esterilização. Dalton; Iqbal; Turner (1983) demonstraram que no meio de cultura MS com pH acima de 5,0, o Fe²⁺ livre oxida-se rapidamente em Fe³⁺ e liga-se ao PO₄³⁻ para formar o fosfato férrico insolúvel. Esta forma insolúvel presente no meio e indisponível às plantas, aumenta com a elevação do pH durante o preparo do meio de cultura e com o aumento da temperatura em função da esterilização do mesmo (MINOCHA, 1987).

Desta forma, as estimativas das especiações iônicas verificadas neste estudo estão em concordância, pois a maioria das espécies indisponíveis às plantas relaciona-se principalmente com as ligações de ferro e cálcio ao fosfato, e do sulfato ao cálcio. Provavelmente, estes fatos podem justificar os maiores tamponamentos iniciais verificados nos meios de cultura com concentrações mais elevadas de fósforo e cálcio (Tabela 11). Adicionalmente, Schenk; Hsiao; Bornman (1991) observaram que a autoclavagem dos meios de cultura promoveu a quebra da sacarose em frutose e glucose em função da presença da fonte de ferro-EDTA e, conseqüentemente, a formação de compostos tóxicos como as hexoses e compostos fenólicos, bem como a caramelização do açúcar com aminoácidos. Tais reações também podem contribuir para a variação do pH.

Com a inoculação dos explantes e o início do crescimento das brotações, exceto para Mg₄, em todos os meios de cultivo foram observadas reduções de pH após 4 dias de cultivo, definindo um intervalo de variação de 4,46 (N₄) a 5,44 (Mg₄) (Tabela 11). Aos 7 dias de cultivo, as reduções de pH se acentuaram; houve aumento da acidez dos meios, apresentando valores entre 4,21 (K₄) a 5,05 (N₁). Entretanto aos 14 dias, 52,6% dos meios de cultura apresentaram elevação de pH, os quais variaram de 4,03 (K₃) a 5,41 (N₁). Aos 21 dias, o intervalo de variação observado foi de 4,34 (N₃) a 6,06 (Mg₃) onde 89,5% dos tratamentos apresentavam pH com valores superiores àqueles obtidos no 14º dia de cultivo. Adicionalmente, no período final, os valores de pH nos tratamentos N₁, Ca₃, Mg₃, Mg₄ e S₁ foram superiores aos seus valores de pH iniciais. Enquanto N₁ foi o único tratamento que obteve valores de pH > 5,0 ao longo do período.

Os explantes de *Eucalyptus grandis* acidificaram os meios de cultura principalmente durante os primeiros 7 dias de cultivo seguidos de elevações dos valores de pH em todos os meios. Williams; Taji; Winney (1991) cultivando *Ptilotus* verificaram redução do pH durante os primeiros 15 dias de cultivo com relação ao pH inicial seguido de equilíbrio, em torno de pH 4,0, em até 30 dias. Enquanto Diniz et al. (1999a,b) cultivando *Musa* sp. detectaram redução do pH durante os primeiros 4 dias de cultivo com relação ao pH inicial seguido de equilíbrio, em torno de pH 4,0, em até 60 dias de cultivo. Esses autores enfatizam que essa tendência foi dependente do tipo do explante, do material genético e do ágar utilizado, sendo a mesma independente do pH inicial.

Por outro lado, Mezzetti; Rosati; Casalicchio (1991) cultivando calos, segmentos nodais e folhas de *Actinidia deliciosa* em meio de cultura MS também observaram redução do pH em 15

dias de cultivo e posterior elevação do pH, chegando a valores próximos do pH inicial (5,8) aos 60 dias de cultivo. Enquanto Ramage e Willians (2003) avaliando a organogênese em discos foliares de *Nicotiana tabacum* em meio de cultura MS verificaram queda do pH inicial (5,8) durante os primeiros 4 dias de cultivo com estabilização em torno de pH 5,2 em até 24 dias e posterior elevação para valor superior ao pH inicial entre 28 e 36 dias de cultivo; o aumento do pH ocorreu durante a fase de diferenciação e crescimento de gemas sendo um indicativo de que variações do pH dos meios de cultura podem também ser dependentes da fase de cultivo *in vitro*.

De um modo geral, os meios de cultura testados apresentaram baixa capacidade tamponante. Reduções dos valores de pH foram atenuadas nos meios de cultura sem a presença de amônio (N_1) (Anexo 1) e com maior relação $NO_3^-:NH_4^+$ ($S_1 = 7,67:1$; $Mg_3 = 9,4:1$; $Mg_4 = 103,0:1$) (Anexos 6; 5), como também para Ca_3 , os quais apresentaram valores de pH superiores aos iniciais em 21 dias de cultivo. Desta forma, reduções do pH mais acentuadas nos primeiros dias de cultivo podem estar relacionadas ao crescimento dos explantes com a absorção preferencial de NH_4^+ e conseqüente liberação de H^+ ; com a exaustão de amônio no meio de cultura, ocorre a utilização do NO_3^- e, conseqüente liberação de OH^- , contribuindo para a elevação do pH (MEZZETTI; ROSATI; CASALICCHIO, 1991; DINIZ et al., 1999a,b; RAMAGE; WILLIAMS, 2002; SHIN et al., 2003). Resposta similar também foi alcançada para o enraizamento de brotações *Eucalyptus globulus*: em meios de cultura contendo NH_4^+ houve decréscimo do pH nos primeiros 7 dias de cultivo, estabilizando em valores entre 4,0 e 4,5 aos 30 dias, enquanto em meios sem NH_4^+ foram obtidas menores reduções do pH durante os primeiros 7 dias de cultivo e valores de pH entre 5,5 e 6,0, aos 30 dias (BENNETT; MCDAVID; MCCOMB, 2003/4).

Outros fatores como, troca de íons entre propágulo e o meio nutritivo envolvendo atividades metabólicas, formação de compostos orgânicos (WILLIAMS, 1995), absorção preferencial de K^+ como um mecanismo de regulação do pH (WILLIAMS; TAJI; WINNEY, 1991) e o acúmulo de CO_2 gerado pela respiração dos explantes (LEVA et al., 1984 apud WILLIAMS, 1992) podem favorecer a acidificação dos meios de cultura. Valores de pH inferiores a 5,0 limitam a disponibilidade da maioria dos elementos, principalmente fósforo, cálcio e magnésio (WILLIAMS, 1995) contribuindo para a redução da absorção de cátions, talvez por competição entre estes íons e H^+ por sítios do carregador (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

2.3.2.2 Observações visuais

Os resultados dos diferentes tratamentos indicam que a morfogênese foi afetada em função do macronutriente e da concentração utilizada (Tabela 12).

Ganhos de biomassa e qualidade da cultura *in vitro* são os que se buscam para a melhoria do sistema de cultivo *in vitro*. Dessa forma, visa-se um crescimento ótimo e máximo das brotações que contribuam para aumentar o rendimento nas fases de multiplicação e alongamento de brotações (CORREIA et al., 1995; RAMAGE; WILLIANS, 2003) e, conseqüentemente, obter maior sucesso no enraizamento de brotações *in vitro* ou *in vivo*, via miniestaquia ou microestaquia, e no índice de mudas de qualidade (XAVIER et al., 2001).

Tabela 12 – Características dos explantes observadas visualmente relativas ao crescimento, textura e vigor das brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo

Tratamentos mmol L ⁻¹	Figuras	Crescimento das brotações	Folha	Textura do tecido vegetal/vigor
JADS ^(*)	2 e 3	<ul style="list-style-type: none"> ●Aglomerado homogêneo, compacto, uniforme ●Crescimento médio 	●Pequenas	<ul style="list-style-type: none"> ●Macia ●Vigor: bom
N ₁ (17,3)	3	<ul style="list-style-type: none"> ●Aglomerado homogêneo, menos compacto, uniforme ●Crescimento reduzido 	●Muito pequenas	<ul style="list-style-type: none"> ●Macia ●Vigor: bom
N ₃ (39,0)	3	<ul style="list-style-type: none"> ●Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme ●Crescimento intenso 	<ul style="list-style-type: none"> ●Pequenas e grandes ●Presença de lâminas foliares encurvadas para cima 	<ul style="list-style-type: none"> ●Macia ●Vigor: regular
N ₄ (58,5)	2 e 3	<ul style="list-style-type: none"> ●Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme ●Crescimento intenso 	<ul style="list-style-type: none"> ●Grandes ●Alta frequência de lâminas foliares encurvadas para cima 	<ul style="list-style-type: none"> ●Maciez reduzida ●Vigor: ruim ●Folhas quebradiças (hiperhidria)
P ₁ (2,0)	3	<ul style="list-style-type: none"> ●Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme ●Crescimento reduzido 	●Muito pequenas e pequenas	<ul style="list-style-type: none"> ●Macia ●Vigor: ruim
P ₃ (4,5)	3	<ul style="list-style-type: none"> ●Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme ●Crescimento reduzido 	<ul style="list-style-type: none"> ●Muito pequenas e pequenas ●Lâminas foliares tortuosas 	<ul style="list-style-type: none"> ●Macia ●Vigor: ruim
P ₄ (6,75)	3	<ul style="list-style-type: none"> ●Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme ●Crescimento reduzido 	<ul style="list-style-type: none"> ●Pequenas e médias ●Presença de lâminas foliares tortuosas ou encurvadas para cima 	<ul style="list-style-type: none"> ●Macia ●Vigor: ruim

Tabela 12 – Características dos explantes observadas visualmente relativas ao crescimento, textura e vigor das brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo

Tratamentos mmol L ⁻¹	Figuras	Crescimento das brotações	Folha	(conclusão)
				Textura do tecido vegetal/vigor
K ₁ (7,3)	3	<ul style="list-style-type: none"> •Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme •Crescimento intenso 	<ul style="list-style-type: none"> •Pequenas e grandes •Presença de lâminas foliares encurvadas para baixo 	<ul style="list-style-type: none"> •Macia •Vigor: regular •Presença de hastes avermelhadas
K ₃ (16,5)	3	<ul style="list-style-type: none"> •Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme •Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> •Pequenas e grandes •Presença de lâminas foliares tortuosas e encurvadas para baixo 	<ul style="list-style-type: none"> •Macia •Vigor: regular
K ₄ (24,5)	3	<ul style="list-style-type: none"> •Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme •Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> •Pequenas e médias •Presença de lâminas encurvadas para baixo 	<ul style="list-style-type: none"> •Macia •Vigor: regular
Ca ₁ (3,3)	4	<ul style="list-style-type: none"> •Aglomerado homogêneo, compacto, uniforme •Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> •Pequenas e médias 	<ul style="list-style-type: none"> •Macia •Vigor: bom
Ca ₃ (7,5)	4	<ul style="list-style-type: none"> •Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme •Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> •Pequenas e grandes •Lâminas foliares tortuosas 	<ul style="list-style-type: none"> •Macia •Vigor: regular
Ca ₄ (11,25)	4 e 5A	<ul style="list-style-type: none"> •Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme •Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> •Pequenas e grandes •Lâminas foliares tortuosas •Presença de pontuações escuras 	<ul style="list-style-type: none"> •Maciez reduzida •Vigor: ruim •Presença de hastes alongadas e intumescidas
Mg ₁ (2,0)	4	<ul style="list-style-type: none"> •Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme •Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> •Pequenas e médias 	<ul style="list-style-type: none"> •Macia •Vigor: bom
Mg ₃ (4,5)	4	<ul style="list-style-type: none"> •Aglomerado homogêneo, menos compacto, uniforme •Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> •Pequenas 	<ul style="list-style-type: none"> •Macia •Vigor: bom
Mg ₄ (6,75)	4	<ul style="list-style-type: none"> •Aglomerado homogêneo, compacto, uniforme •Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> •Muito pequenas 	<ul style="list-style-type: none"> •Macia •Vigor: bom
S ₁ (2,29)	4	<ul style="list-style-type: none"> •Aglomerado homogêneo, menos compacto, uniforme •Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> •Pequenas 	<ul style="list-style-type: none"> •Macia •Vigor: bom
S ₃ (4,79)	4	<ul style="list-style-type: none"> •Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme •Crescimento intenso 	<ul style="list-style-type: none"> •Pequenas e médias; alongadas •Lâminas foliares tortuosas e encurvadas para cima 	<ul style="list-style-type: none"> •Macia •Vigor: regular •Presença de hastes intumescidas
S ₄ (7,04)	4 e 5B	<ul style="list-style-type: none"> •Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme •Crescimento intenso 	<ul style="list-style-type: none"> •Muito pequenas, pequenas e médias; alongadas •Lâminas foliares tortuosas e encurvadas para cima 	<ul style="list-style-type: none"> •Maciez reduzida •Vigor: ruim •Presença de hastes intumescidas

*(N₂ = 26,0; P₂ = 3,0; K₂ = 11,0; Ca₂ = 5,0; Mg₂ = 3,0; S₂ = 3,29 mmol L⁻¹); todos os tratamentos apresentaram brotações com coloração verde

Além das diferenças de ganhos de biomassa em função dos tratamentos e da obtenção de brotações com coloração verde, algumas variações foram observadas visualmente, no final do cultivo, quanto às características do explante relativas ao crescimento, textura do tecido vegetal e vigor das brotações. As descrições das observações visuais realizadas em cada tratamento encontram-se na Tabela 12.

A Figura 2 mostra como exemplos, as características das brotações cultivadas na concentração 2 (JADS) durante o período de cultivo e na concentração N_4 , aos 14 e 21 dias de cultivo. As características de crescimento das brotações nos demais tratamentos, aos 21 dias de cultivo, podem ser visualizadas nas Figuras 3 e 4.

Os resultados obtidos indicam que nem sempre o crescimento máximo corresponde ao ótimo. Desta forma, níveis mais elevados de nitrogênio (N_3 e N_4) (Figuras 2; 3) e de enxofre (S_3 e S_4) (Figuras 4; 5b) favoreceram um crescimento acentuado das brotações, entretanto, fora do padrão considerado adequado à multiplicação de brotações do sistema de cultura *in vitro* de *Eucalyptus*: brotações com crescimento uniforme e homogêneo, coloração verde, vigorosa e ausência de hiperhidria.



Figura 2 - Características do crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em meios de cultura JADS aos 0, 7, 14 e 21 dias de cultivo (da esquerda para a direita) e N_4 aos 14 e 21 dias de cultivo (esquerda para a direita). JADS ($N_2 = 26,0$; $P_2 = 3,0$; $K_2 = 11,0$; $Ca_2 = 5,0$; $Mg_2 = 3,0$; $S_2 = 3,29 \text{ mmol L}^{-1}$); N_4 ($N = 58,5$; $P_2 = 3,0$; $K_2 = 11,0$; $Ca_2 = 5,0$; $Mg_2 = 3,0$; $S_2 = 3,29 \text{ mmol L}^{-1}$). Barras = 1cm

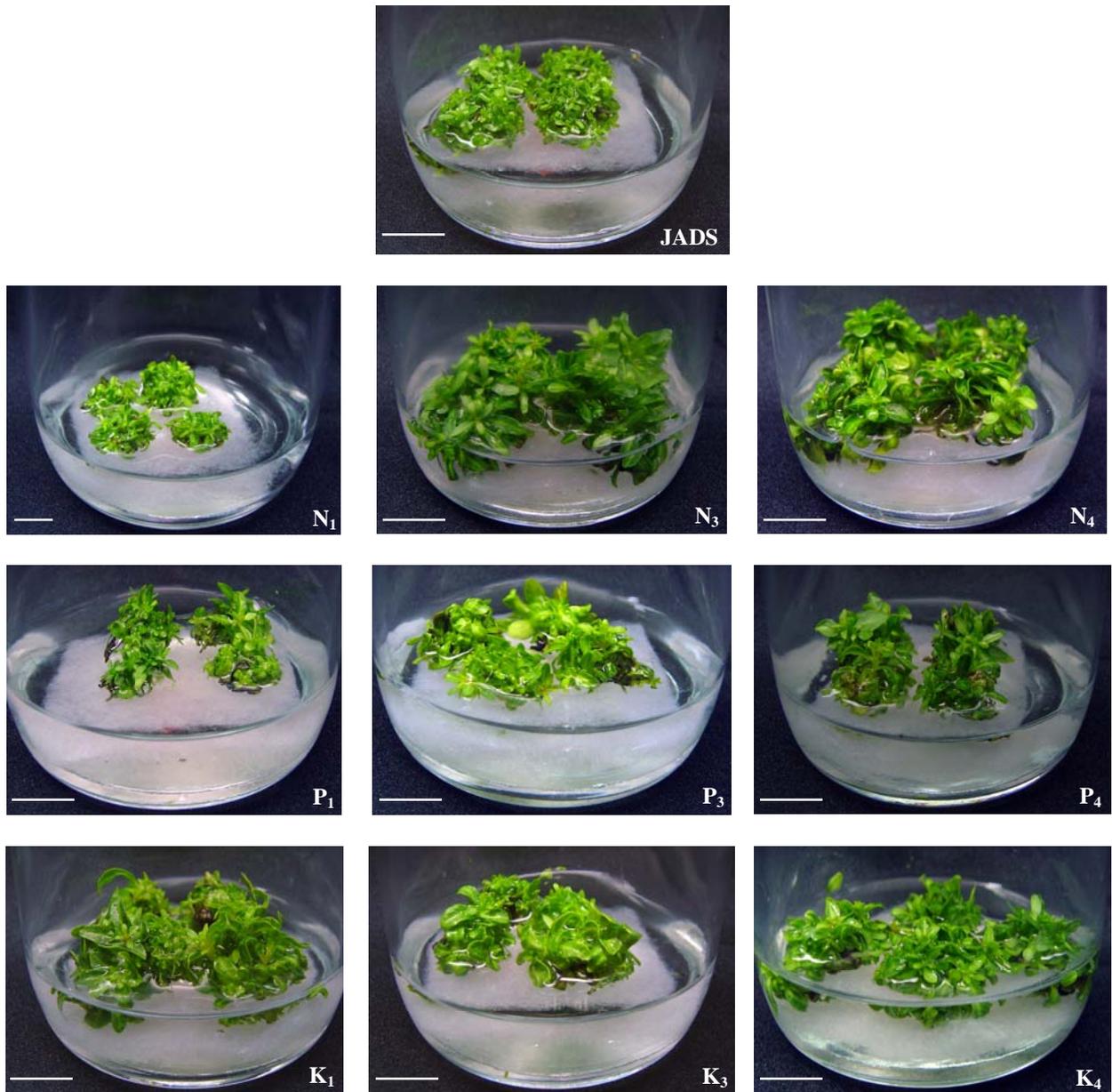


Figura 3 - Características do crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo. Em mmol L^{-1} : JADS ($\text{N}_2 = 26,0$; $\text{P}_2 = 3,0$; $\text{K}_2 = 11,0$; $\text{Ca}_2 = 5,0$; $\text{Mg}_2 = 3,0$; $\text{S}_2 = 3,29$); $\text{N}_1 = 17,3$; $\text{N}_3 = 39,0$; $\text{N}_4 = 58,5$; $\text{P}_1 = 2,0$; $\text{P}_3 = 4,5$; $\text{P}_4 = 6,75$; $\text{K}_1 = 7,3$; $\text{K}_3 = 16,5$; $\text{K}_4 = 24,75$. Barras = 1 cm

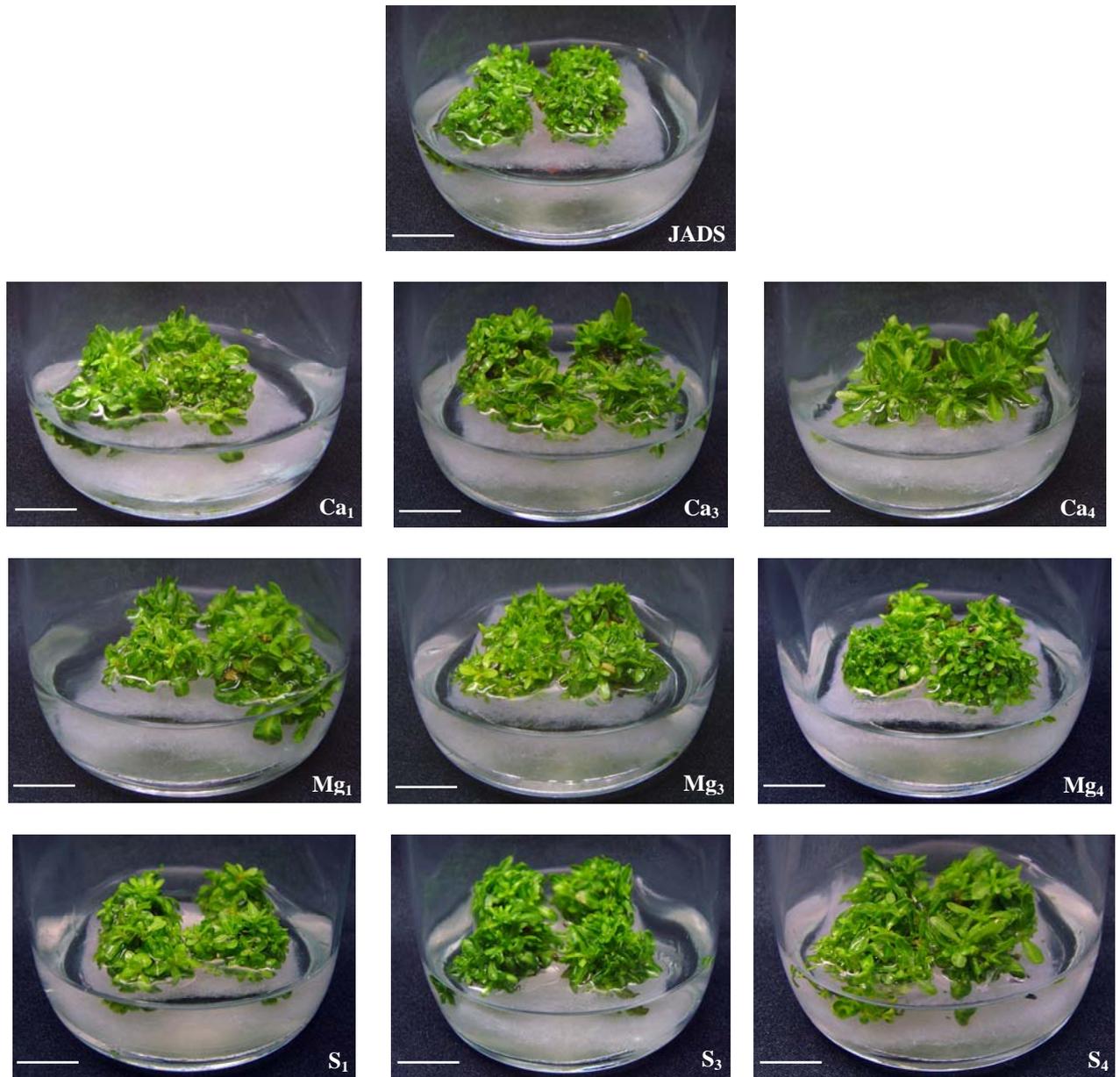


Figura 4 - Características do crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* *in vitro* cultivadas em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo. Em mmol L^{-1} : JADS ($\text{N}_2 = 26,0$; $\text{P}_2 = 3,0$; $\text{K}_2 = 11,0$; $\text{Ca}_2 = 5,0$; $\text{Mg}_2 = 3,0$; $\text{S}_2 = 3,29$) $\text{Ca}_1 = 3,3$; $\text{Ca}_3 = 7,5$; $\text{Ca}_4 = 11,25$; $\text{Mg}_1 = 2,0$; $\text{Mg}_3 = 4,5$; $\text{Mg}_4 = 6,75$; $\text{S}_1 = 2,29$; $\text{S}_3 = 4,79$; $\text{S}_4 = 7,04$). Barras = 1 cm

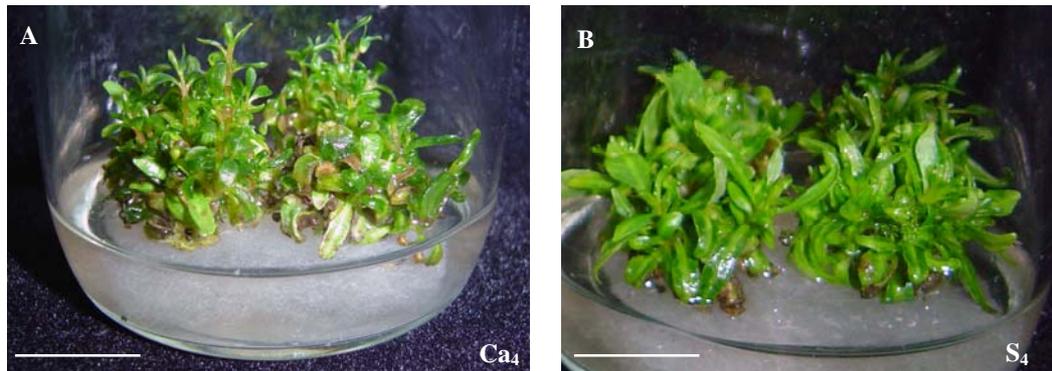


Figura 5 - Características do crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em meio de cultura JADS suplementados com: (A) 11,25 mmol L⁻¹ de cálcio [Ca₄] e (B) 7,04 mmol L⁻¹ de enxofre [S₄]. Barras = 1cm

Outros tratamentos como P₁, P₃, P₄, K₁, K₃, K₄, Ca₃ e Ca₄ também apresentaram crescimentos inadequados (Tabela 12; Figuras 3; 4; 5A). Esses resultados reforçam a complexidade de estudos sobre nutrição mineral *in vitro* e respostas morfogênicas em função do efeito do macronutriente, da sua concentração e das interações com outros nutrientes, disponibilidade de nutrientes, da interfase entre meios de cultura e explante (WILLIAMS, 1995; RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

2.3.2.3 Efeito de macronutrientes

2.3.2.3.1 Nitrogênio

2.3.2.3.1.1 Massa fresca e massa seca

A aplicação da análise de variância da regressão para a massa fresca (Figura 6) e massa seca (Figura 7) obtidas em meios de cultura suplementados com 17,3 (N₁); 26,0 (N₂-JADS); 39,0 (N₃) e 58,5 (N₄) mmol L⁻¹ de nitrogênio, em função do período de cultivo como variável independente, demonstrou que o modelo linear quadrático (p=0,0001) foi significativo para todas as concentrações de nitrogênio em ambas variáveis.

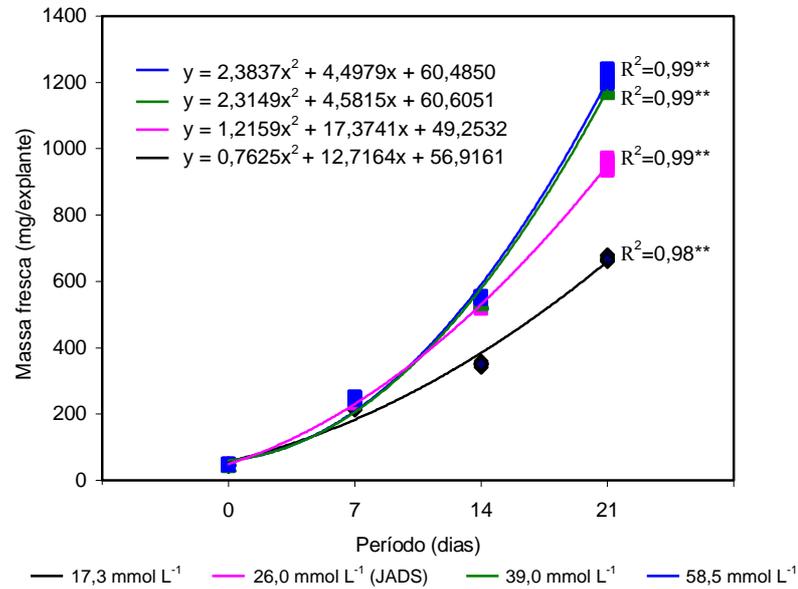


Figura 6 – Valores observados e funções ajustadas para a massa fresca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de nitrogênio em função do período cultivo. **significativo $p=0,0001$

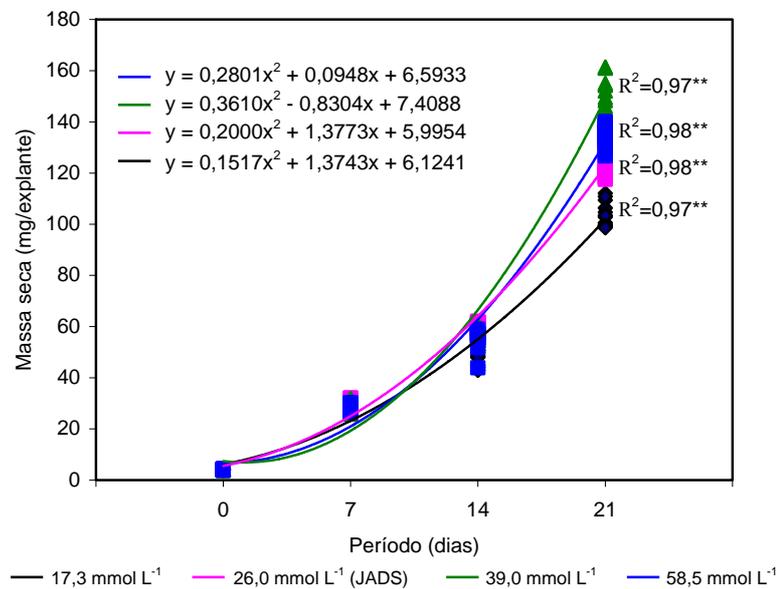


Figura 7 - Valores observados e funções ajustadas para a massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de nitrogênio em função do período cultivo. **significativo $p=0,0001$

Em todas as concentrações, houve incrementos de massa fresca e massa seca ao longo do período de cultivo. Em 21 dias de cultivo, as massas fresca e seca aumentaram 14,7 e 25,9; 20,0 e 30,3; 25,4 e 37,2; 25,7 e 32,8 vezes em N₁, N₂, N₃ e N₄, respectivamente. Russowski e Nicolosso (2003) observaram que a massa seca da parte aérea de *Pfaffia glomerata* obtida em meio de cultura MS modificado em concentrações de nitrogênio ($0,0 \leq N \leq 90,0 \text{ mmol L}^{-1}$) foi maior em concentração próxima a 48 mmol L^{-1} de nitrogênio e Kanashiro (2005) verificou que entre as concentrações de nitrogênio testadas ($7,5 \leq N \leq 120,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio de cultura MS, a concentração de $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de nitrogênio apresentou nível ótimo para a produção de massa fresca e massa seca da parte aérea de *Aechmea blanchetiana*.

Entre as concentrações de nitrogênio, pode-se inferir que o crescimento das brotações na menor concentração N₁ ($17,3 \text{ mmol L}^{-1}$) mostrou-se limitado já na primeira semana de cultivo conduzindo às menores produções de massa fresca e seca (Figuras 6; 7), apresentando brotações aglomeradas, pouco compactas e folhas muito pequenas, aos 21 dias de cultivo (Tabela 12; Figura 3). Provavelmente, além da redução do nitrogênio total deste tratamento, o seu fornecimento somente com a fonte de NO₃⁻ (Anexo 1) deve ter influenciado tanto na produção de biomassa quanto na morfogênese. Capaldi (2002) verificou que a omissão do amônio no meio de cultura MS reduziu a produção de brotações *Cryptomeria japonica in vitro* e sugeriu que o NH₄⁺ fornecido em baixas concentrações (até $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e na presença de NO₃⁻ entre 22,5 e $31,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi favorável ao crescimento e desenvolvimento das brotações. Neste sentido, a relação sugerida está de acordo com a existente em N₂ (JADS), onde o nitrogênio total foi fornecido via N-NH₄⁺ ($4,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e N-NO₃⁻ ($22,0 \text{ mmol L}^{-1}$). Este tratamento apresentou produção de massa fresca (Figura 6) e massa seca (Figura 7) intermediárias entre as concentrações de nitrogênio testadas e características de crescimento das brotações consideradas ótimas: aglomerado homogêneo, com crescimento uniforme e folhas pequenas (Tabela 12; Figuras 2a; 3).

Por outro lado, aumentos da concentração de nitrogênio com redução da relação NO₃⁻:NH₄⁺ (Anexo 1) que contribuíram para maior ganho de biomassas e, conseqüentemente, maior ocorrência de expansão celular, particularmente em N₄, não correspondeu em maior produção de massa seca. (Figura 7). Ademais, neste tratamento ocorreu hiperhidria (KEVERS et al., 2004) comprometendo o vigor das brotações de maneira mais acentuada do que em N₃ (Tabela 12; Figuras 2b; 3). Sharma e Ramamurthy (2000) também observaram redução do vigor das brotações e a ocorrência de hiperhidria em brotações de *Eucalyptus tereticornis* cultivadas em

meio de cultura MS, o qual possui concentração total de N (60 mmol L^{-1}) e relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (1,9:1) (Tabela 1) semelhantes ao N_4 (Anexo 1). Entretanto, Evans (1993) verificou que as concentrações do nitrogênio (20,0; 40,0 e $60,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio de cultura MS influenciaram a morfogênese, mas não ocasionaram efeito na produção de massa fresca de diferentes cultivares de *Solanum* spp., sugerindo que a variação na morfogênese esteja relacionada mais com a concentração total de nitrogênio do que com a relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$.

Estas respostas sugerem que a concentração total de nitrogênio mais adequada para a multiplicação de brotações *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* encontra-se entre 26 mmol L^{-1} e abaixo de 39 mmol L^{-1} e a sua definição poderia contribuir para a obtenção do crescimento ótimo e máximo das brotações (GRIBBLE et al., 2002; KANASHIRO, 2005).

2.3.2.3.1.2 Porcentagem de massa seca

A aplicação da análise de variância da regressão para a variável porcentagem da massa seca obtida em meios de cultura suplementados com 17,3 (N_1); 26,0 (N_2 -JADS); 39,0 (N_3) e 58,5 (N_4) mmol L^{-1} de nitrogênio, em função do período de cultivo como variável independente, demonstrou que o modelo linear cúbico ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações de nitrogênio. As maiores porcentagens de massa seca ocorreram aos 7 e 21 dias de cultivo, em todas as concentrações, exceto para N_1 , onde não foi observada redução da porcentagem da massa seca aos 14 dias de cultivo (Figura 8).

Variação no conteúdo de água na planta reflete na ação dos hormônios vegetais e na absorção de nutrientes minerais, transporte e metabolismo celular (AUER et al., 1992; RAMAGE; WILLIAMS, 2004; EPSTEIN; BLOOM, 2005). Neste estudo, a porcentagem de massa seca foi maior na menor concentração de nitrogênio e, conseqüentemente, menor conteúdo de água ao longo do período de cultivo. Provavelmente, a limitação na assimilação de nitrogênio em função da baixa concentração deste elemento tenha comprometido o processo de divisão e expansão celular, disponibilidade de água e de outros nutrientes, formação e redistribuição de compostos orgânicos, atividades e síntese de hormônios envolvidos no crescimento e diferenciação celular conduzindo a uma situação de estresse (TAIZ; ZEIGER, 2002), favorecendo o acúmulo de massa seca e o aumento da relação massa seca:N (ÁVILA et al., 1994).

Com a elevação do nitrogênio total e redução da relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ nos meios de cultura, houve tendência para a redução da porcentagem da massa seca e aumento do conteúdo de água nas brotações. Isto sugere que o aumento da concentração de nitrogênio estimulou o crescimento e o acúmulo de água. Em concentrações mais elevadas desencadeou uma desordem fisiológica, como a hiperhidria (KEVERS et al., 2004), observada de forma mais acentuada no tratamento N_4 (Figuras 2; 3). Adicionalmente, este fato como também as variações no pH dos meios de cultura (Tabela 11) podem ter favorecido as variações da porcentagem da massa seca ao longo do cultivo como observado aos 14 dias de cultivo. As reduções das porcentagens de massa seca neste período podem estar relacionadas com a intensa atividade de crescimento e diferenciação celular durante os primeiros 7 dias de cultivo, variação do pH dos meios de cultura, gerando um desequilíbrio na homeostase, exigindo da cultura maior atividade metabólica e de redistribuição de solutos e nutrientes, favoráveis à manutenção do crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2002; RAMAGE; WILLIAMS, 2003).

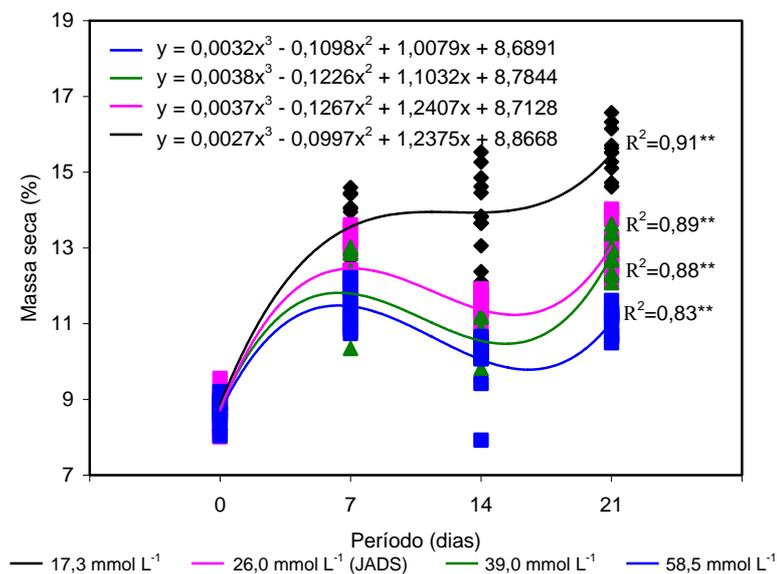


Figura 8 - Valores observados e funções ajustadas para a porcentagem da massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de nitrogênio em função do período cultivo. ******significativo $p=0,0001$

2.3.2.3.1.3 Taxa de crescimento relativo

A aplicação da análise de variância da regressão para taxa de crescimento relativo obtida em meios de cultura suplementados com 17,3 (N₁); 26,0 (N₂-JADS); 39,0 (N₃) e 58,5 (N₄) mmol L⁻¹ de nitrogênio, em função do período de cultivo como variável independente, demonstrou que o modelo linear quadrático (p=0,0001) foi significativo para todas as concentrações de nitrogênio (Figura 9).

As maiores taxas de crescimento relativo foram obtidas entre 0-7 dias, as quais variaram de 27,3% em N₄ a 28,3% em N₁; no período seguinte (7-14 dias), os valores reduziram e variaram de 7,2% em N₁ a 10,2% em N₂ e no último período (14-21 dias), as taxas apresentaram pequenas elevações mantendo-se entre 10,5% em N₂ e 14,1% em N₃ sugerindo manutenção do crescimento em N₁ e N₂ e tendência em aumentar o crescimento em N₃ e N₄.

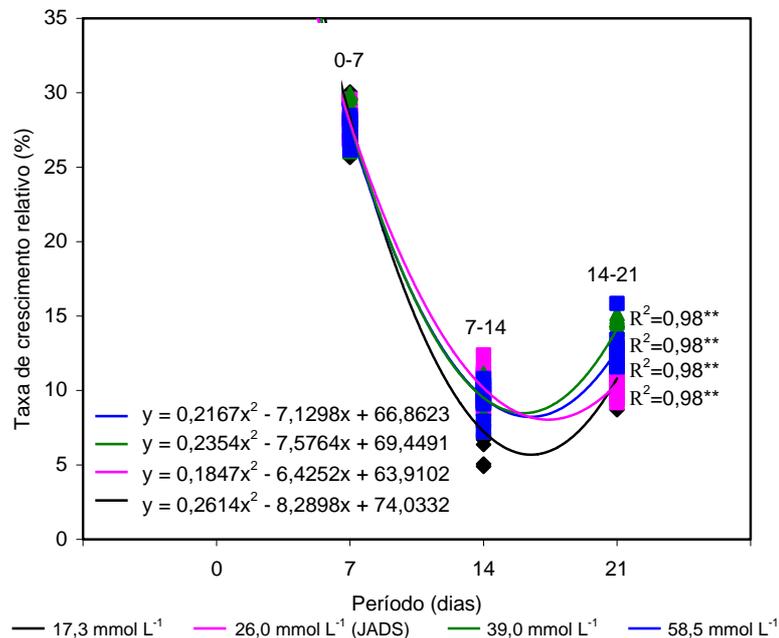


Figura 9 - Valores observados e funções ajustadas para a taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de nitrogênio em função do período cultivo.
**significativo p=0,0001

2.3.2.3.2 Fósforo

2.3.2.3.2.1 Massa fresca e massa seca

A aplicação da análise de variância da regressão para massa fresca (Figura 10) e massa seca (Figura 11) obtidas em meios de cultura suplementados com 2,0 (P₁); 3,0 (P₂-JADS); 4,5 (P₃) e 6,75 (P₄) mmol L⁻¹ de fósforo, em função do período de cultivo como variável independente, demonstrou que o modelo linear (p=0,0001) foi significativo na concentração P₁ para massa fresca e nas concentrações P₁-P₃-P₄ para massa seca, enquanto o modelo quadrático (p=0,0001) foi significativo às concentrações P₂-P₃-P₄ para massa fresca e em P₂ para massa seca.

Em todas as concentrações, houve incrementos de massa fresca e massa seca ao longo do período de cultivo. Em 21 dias de cultivo, as massas fresca e seca aumentaram 18,3 e 30,6; 20,0 e 30,3; 19,5 e 26,9; 19,7 e 29,5 vezes em P₁, P₂, P₃ e P₄, respectivamente. Russowski e Nicolosso (2003) observaram que a massa seca da parte aérea de *Pfaffia glomerata* obtida em meio de cultura MS modificado em concentrações de fósforo (0,0≤P≤1,875 mmol L⁻¹) foi maior em concentração próxima a 1 mmol L⁻¹ de fósforo e Kanashiro (2005) verificou que entre as concentrações de fósforo testadas (0,15≤P≤2,5 mmol L⁻¹) em meio de cultura MS, a concentração de 2,5 mmol L⁻¹ de fósforo promoveu maior produção de massa fresca e massa seca foliar de *Aechmea blanchetiana*.

As produções de massa fresca e seca apresentaram pouca variação em função das concentrações de fósforo durante o ciclo de cultivo (Figuras 10; 11). Entretanto, melhor característica quanto ao crescimento do explante e vigor das brotações foram alcançadas na concentração P₂ (JADS) sugerindo que concentrações abaixo de 3 mmol L⁻¹ de fósforo possam limitar o crescimento e que acima, sejam excessivas causando reduções na organogênese e alterações na morfogênese (Tabela 12; Figura 3). Por outro lado, as especiações iônicas dos tratamentos P₃ e P₄ sugerem complexação do Fe²⁺ ao PO₄³⁻ (17,75% e 22,11%) (Tabela 7) e Ca²⁺ ao PO₄³⁻ (5,77% e 7,98 %) (Tabela 6), respectivamente, o que poderia explicar, parcialmente, tais respostas em função redução da disponibilidade destes nutrientes nos respectivos meios de cultura. Gribble et al. (2002) cultivando um clone de híbrido de *Eucalyptus* em meio de cultura com 0,100 mmol L⁻¹ de ferro inferiu que 50% do Fe²⁺ estavam complexados ao EDTA e que o restante, provavelmente, ligado ao PO₄³⁻ e não disponível às culturas. Por outro lado, baixos

valores de pH durante o desenvolvimento da cultura (Tabela 11) poderiam estar reduzindo a disponibilidade do fosfato e afetando a difusão de íons PO_4^{3-} disponíveis no meio de cultura para as brotações (WILLIAMS, 1995; DINIZ et al., 1999a).

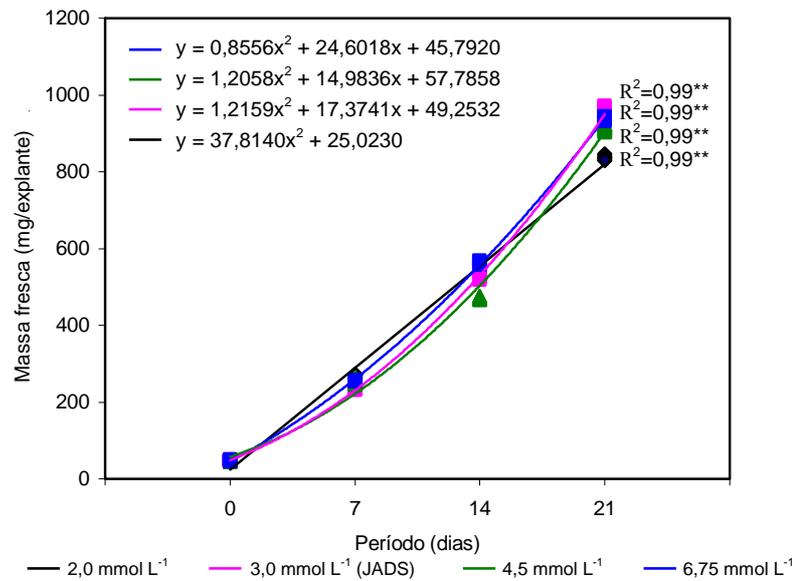


Figura 10 - Valores observados e funções ajustadas para a massa fresca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de fósforo em função do período do cultivo. **significativo $p=0,0001$

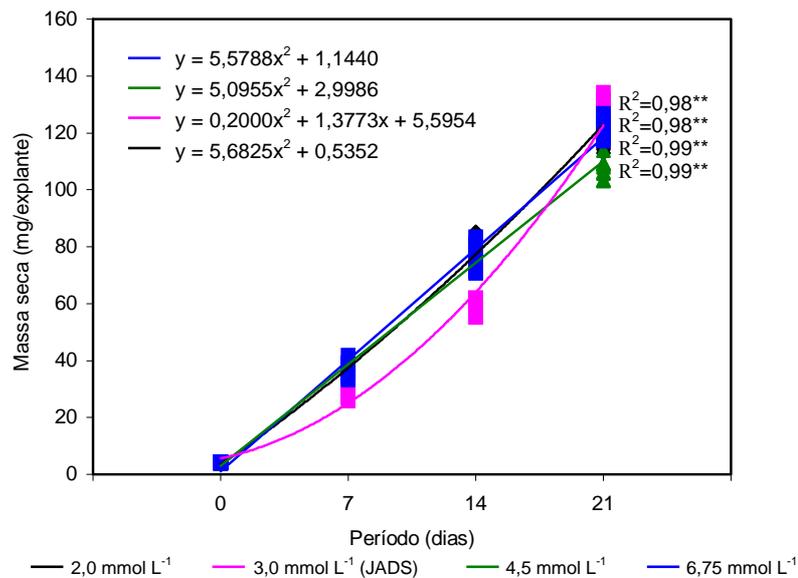


Figura 11 - Valores observados e funções ajustadas para a massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de fósforo em função do período cultivo. ** significativo $p=0,0001$

2.3.2.3.2.2 Porcentagem de massa seca

A aplicação da análise de variância da regressão para a porcentagem de massa seca obtida em meios de cultura suplementados com 2,0 (P₁); 3,0 (P₂-JADS); 4,5 (P₃) e 6,75 (P₄) mmol L⁻¹ de fósforo, em função do período de cultivo como variável independente, demonstrou que o modelo linear quadrático (p=0,0001) foi significativo para as concentrações de fósforo P₁ e P₃, enquanto o modelo linear cúbico (p=0,0001) foi significativo para as concentrações de fósforo P₂ e P₄ (Figura 12).

As tendências das curvas para ganhos de porcentagens de massa seca, em 21 dias de cultivo, sugerem que as concentrações de fósforo P₁, P₃ e P₄ foram limitantes para o crescimento das brotações em função da menor disponibilidade de fosfato, ocasionada pelo baixo fornecimento em P₁ e pelas prováveis interações com ferro e cálcio já discutidas no item anterior. O estresse causado nestes tratamentos modifica a homeostase celular favorecendo o acúmulo de massa seca. Desta forma, o comportamento para ganhos de porcentagem de massa seca em P₂ (JADS), ao longo do período de cultivo, pareceu ser favorável ou não afetou o crescimento das brotações.

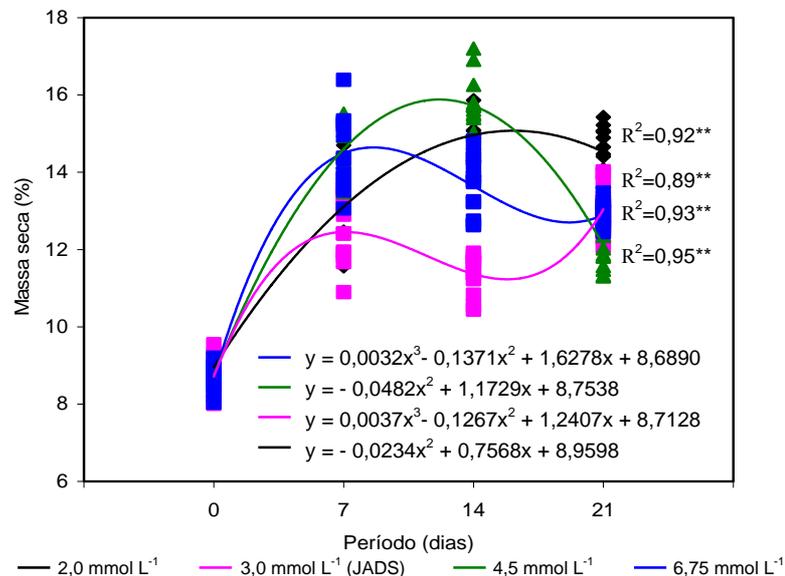


Figura 12 - Valores observados e funções ajustadas para a porcentagem de massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de fósforo em função do período cultivo. **significativo p=0,0001

2.3.2.3.3 Taxa de crescimento relativo

A aplicação da análise de variância da regressão para a taxa de crescimento relativo obtida em meios de cultura suplementados com 2,0 (P₁); 3,0 (P₂-JADS); 4,5 (P₃) e 6,75 (P₄) mmol L⁻¹ de fósforo, em função do período de cultivo como variável independente, demonstrou que o modelo linear cúbico (p=0,0001) foi significativo para todas as concentrações de fósforo (Figura 13).

Maiores médias das taxas de crescimento relativo foram obtidas entre 0-7 dias, as quais variaram de 28,1% em P₂ a 31,4% em P₄; no período seguinte (7-14 dias), os valores reduziram e variaram de 10,0% em P₃ a 11,4% em P₁; no último período (14-21 dias), houve reduções das taxas em P₃ (5,7%), P₁ (6,2%), P₄ (6,5%) e manutenção em P₂ (10,5%).

A tendência para manutenção da taxa de crescimento relativo no último período sugere que P₂ (JADS) apresenta melhor equilíbrio nutricional e afinidade com o genótipo, ou seja, melhor relação meio de cultura/planta para a manutenção do crescimento entre as concentrações de fósforo testadas (WILLIAMS, 1995).

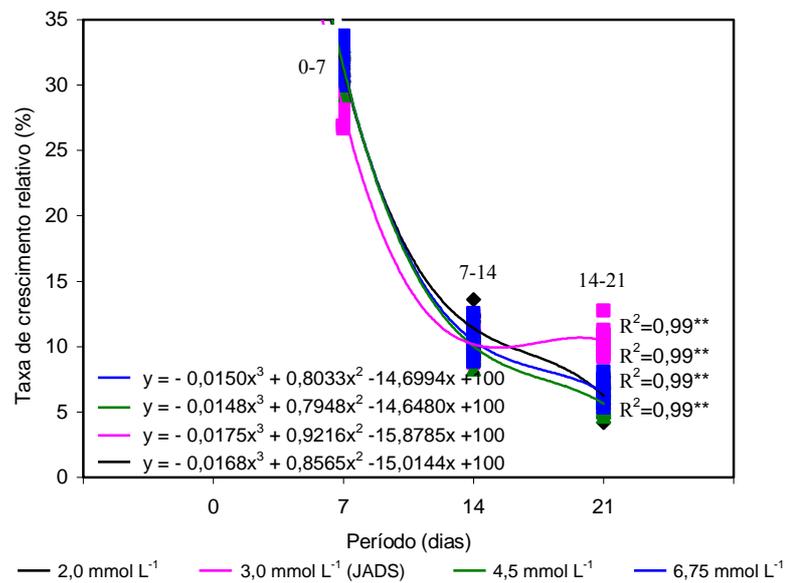


Figura 13 - Valores observados e funções ajustadas para a taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de fósforo em função do período cultivo. **significativo p=0,0001

2.3.2.3.3.3 Potássio

2.3.2.3.3.1 Massa fresca e massa seca

A aplicação da análise de variância da regressão para a massa fresca (Figura 14) e seca (Figura 15) obtidas em meios de cultura suplementados com 7,3 (K_1); 11,0 (K_2 -JADS); 16,5 (K_3) e 24,75 (K_4) mmol L⁻¹ de potássio, em função do período de cultivo como variável independente, demonstrou que o modelo linear quadrático ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações de potássio.

Em todas as concentrações houve incrementos de massa fresca e massa seca ao longo do período de cultivo. Em 21 dias de cultivo, as massas fresca e seca aumentaram 23,6 e 36,0; 20,0 e 30,3; 20,6 e 28,6; 25,0 e 29,6 vezes em K_1 , K_2 , K_3 e K_4 , respectivamente.

As diferentes concentrações de potássio responderam de forma semelhante para a produção de massa fresca e seca durante 21 dias de cultivo (Figuras 14; 15). Entretanto, a tendência para maior produção de massa seca na menor concentração K_1 verificada no período final de cultivo, pode ser um indicativo de que o material genético seja mais eficiente na absorção de potássio. Lima (2004) verificou que a produção de massa seca, em 21 dias de cultivo, variou em função da concentração de potássio ($1,37 \leq K \leq 22,0$ mmol L⁻¹) utilizada no meio de cultura JADS, como também em função dos clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, sendo estes mais eficientes para a utilização de potássio na menor concentração testada.

Por outro lado, melhor padrão de crescimento das brotações foi alcançado na concentração K_2 (JADS) sugerindo que concentrações abaixo de 11 mmol L⁻¹ de potássio podem interferir na morfogênese e que acima, sejam excessivas (Tabela 12; Figuras 3). Entretanto, neste estudo, os ajustes iônicos estabelecidos nos dois maiores níveis de potássio foram definidos com a adição de KCl (Anexo 3) e a elevação da concentração de Cl⁻ no meio de cultura poderia estar influenciando os resultados favorecendo alterações metabólicas e variações morfológicas (Tabela 12; Figura 3) (WILLIAMS, 1995; MONTEIRO et al., 2000).

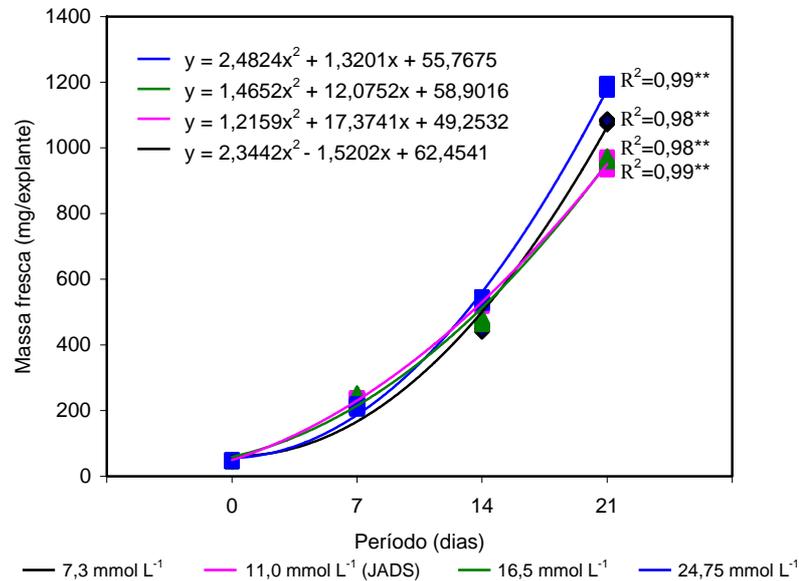


Figura 14 - Valores observados e funções ajustadas para a massa fresca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de potássio em função do período cultivo. **significativo $p=0,0001$

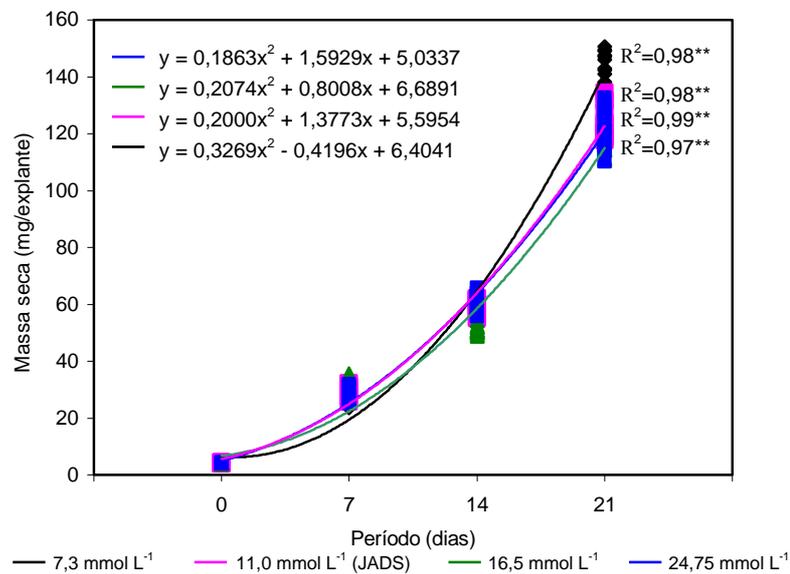


Figura 15 - Valores observados e funções ajustadas para a massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de potássio em função do período cultivo. **significativo $p=0,0001$

Entretanto, Gribble et al. (2002) observaram que as massas fresca e seca de *Gypsophila paniculata* cultivadas em diferentes concentrações de potássio ($0,0 \leq K \leq 80,0$ mmol L⁻¹) aumentaram até a concentração de 10,0 mmol L⁻¹ e sofreram reduções nas concentrações seguintes. Kanashiro (2005) também observou que a produção de massa fresca e seca da parte aérea de *Aechmea blanchetiana* obtidas em meio de cultura MS com diferentes concentrações de potássio ($2,5 \leq K \leq 40,0$ mmol L⁻¹) obtiveram incrementos até a concentração de 32,6 mmol L⁻¹ de potássio e que concentrações superiores a este nível mostraram-se excessivas. A mesma tendência foi obtida por Zaidan et al. (1999) em *Musa* sp. cultivada *in vitro* sob diferentes concentrações de potássio ($0,0 \leq K \leq 30,0$ mmol L⁻¹), onde as maiores massas secas foram alcançadas entre 15 e 20,0 mmol L⁻¹.

2.3.2.3.3.2 Porcentagem de massa seca

A aplicação da análise de variância da regressão para a porcentagem de massa seca obtida em meios de cultura suplementados com 7,3 (K₁); 11,0 (K₂-JADS); 16,5 (K₃) e 24,75 (K₄) mmol L⁻¹ de potássio, em função do período de cultivo como variável independente, demonstrou que o modelo linear quadrático ($p=0,0001$) foi significativo para a concentração K₁, enquanto o modelo linear cúbico ($p=0,0001$) foi significativo para as concentrações K₂, K₃ e K₄. Os maiores valores em K₂ e K₃ foram observados aos 7 e 21 dias de cultivo; entre este período, houve pequenas reduções da porcentagem da massa seca. Aos 7 dias, a concentração K₄ apresentou maior porcentagem de massa seca seguido de reduções acentuadas até 21 dias (Figura 16).

O comportamento para ganhos de porcentagem de massa seca em K₁ ao longo do período de cultivo sugere a ocorrência de menor conteúdo de água nas brotações, provavelmente causada pela limitação de potássio em função do intenso crescimento (Tabela 12; Figura 3) proporcionando maior acúmulo de massa seca. A elevação da concentração de potássio nos meios de cultura favoreceu a ocorrência de variações na porcentagem da massa onde maiores valores foram observados aos 7 e 21 dias de cultivo em K₂ e K₃. Ficou evidente que a maior concentração de potássio (K₄) apresentou maior capacidade para acumular água após 7 dias de cultivo apresentando menor porcentagem de massa seca, aos 21 dias de cultivo, entre as concentrações de potássio testadas.

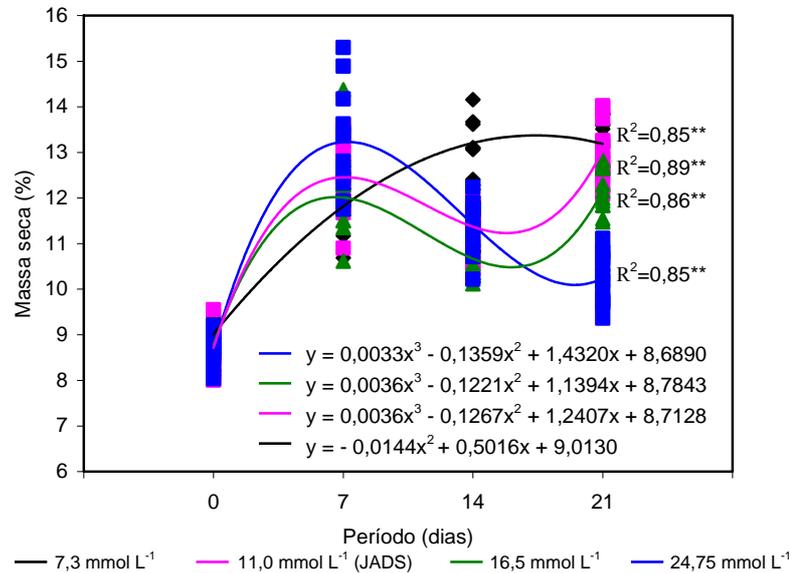


Figura 16 - Valores observados e funções ajustadas para a porcentagem de massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de potássio em função do período cultivo. **significativo $p=0,0001$

2.3.2.3.3 Taxa de crescimento relativo

A aplicação da análise de variância da regressão para a taxa de crescimento relativo obtida em meios de cultura suplementados com 7,3 (K_1); 11,0 (K_2 - JADS); 16,5 (K_3) e 24,75 (K_4) mmol L⁻¹ de potássio, em função do período de cultivo como variável independente, demonstrou que o modelo linear quadrático ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações de potássio (Figura 17).

Maiores médias das taxas de crescimento relativo foram obtidas entre 0-7 dias, as quais variaram de 27,1% em K_1 a 28,4% em K_3 ; no período seguinte (7-14 dias), os valores reduziram e variaram de 7,5% em K_3 a 11,2% em K_4 e no último período (14-21 dias), os valores mantiveram-se entre 9,8% em K_4 a 13,1% em K_1 , sugerindo estabilização e manutenção do crescimento das brotações em K_2 ; K_4 e K_1 ; K_3 , respectivamente.

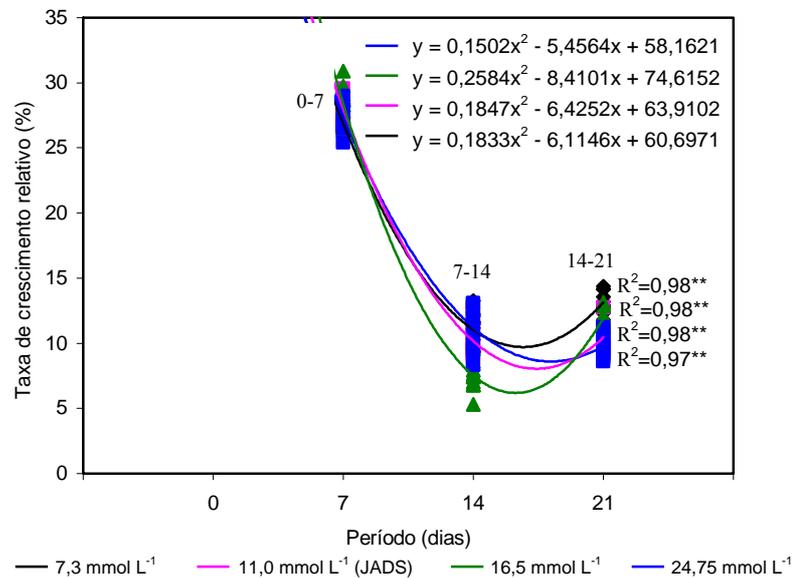


Figura 17 - Valores observados e funções ajustadas para a taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de potássio em função do período cultivo. **significativo p=0,0001

2.3.2.3.4 Cálcio

2.3.2.3.4.1 Massa fresca e massa seca

A aplicação da análise de variância da regressão da massa fresca (Figura 18) e massa seca (Figura 19) obtidas em meios de cultura suplementados com 3,3 (Ca₁); 5,0 (Ca₂-JADS); 7,5 (Ca₃) e 11,25 (Ca₄) mmol L⁻¹ de cálcio, em função do período de cultivo como variável independente demonstrou que o modelo linear quadrático (p=0,0001) foi significativo para todas as concentrações de cálcio.

Em todas as concentrações houve incrementos de massa fresca e massa seca ao longo do período de cultivo. Em 21 dias de cultivo, as massas fresca e seca aumentaram 18,9 e 24,3; 20,0 e 30,3; 19,6 e 28,0; 25,7 e 30,7 vezes em Ca₁, Ca₂, Ca₃ e Ca₄, respectivamente.

Entre as concentrações de cálcio pode-se inferir que a menor concentração Ca₁ (3,3 mmol L⁻¹) limitou o crescimento das brotações desde a primeira semana de cultivo conduzindo às menores produções de massa fresca e seca (Figuras 18; 19). Entretanto, o padrão de crescimento das brotações nesta concentração mostrou-se homogêneo, compacto, com folhas pequenas e médias, aos 21 dias de cultivo (Tabela 12; Figura 4). Provavelmente, a redução do cálcio total

neste tratamento e a diminuição da relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (Anexo 4) influenciaram a produção das biomassas tanto quanto a morfogênese.

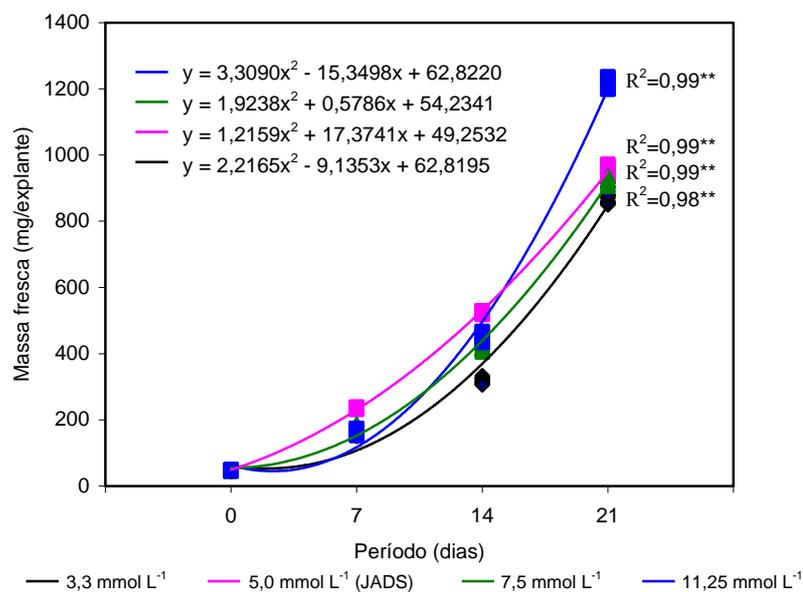


Figura 18 - Valores observados e funções ajustadas para a massa fresca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de cálcio em função do período cultivo. ******significativo $p=0,0001$

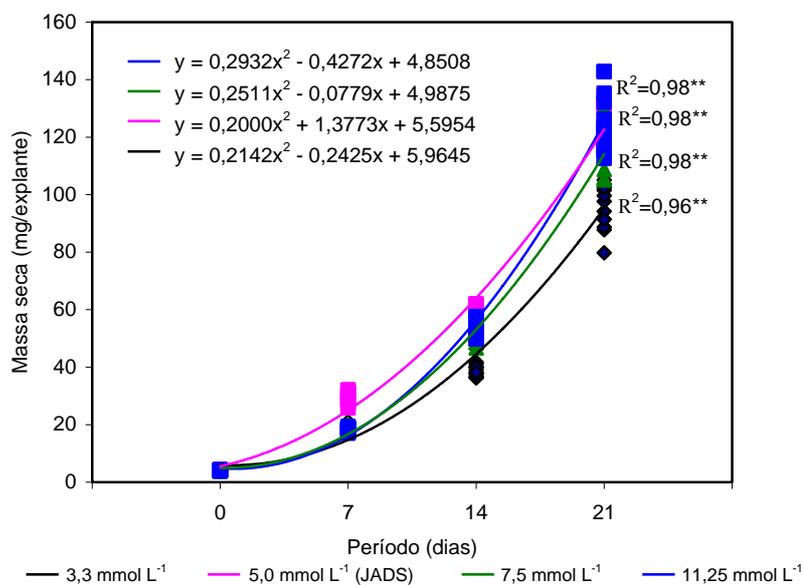


Figura 19 - Valores observados e funções ajustadas para a massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de cálcio em função do período cultivo. ******significativo $p=0,0001$

Ca₂ (JADS) mostrou-se superior para produção de massa fresca, exceto para Ca₄, após 14 dias de cultivo (Figura 18). Ca₂ foi superior aos demais tratamentos para a produção de massa seca durante 21 dias de cultivo. Neste período, as massas secas em Ca₂ e Ca₄ foram semelhantes (Figura 18). Entretanto, Ca₂ apresentou melhor característica quanto ao crescimento dos explantes e vigor das brotações entre as concentrações testadas (Tabela 12; Figura 2; 4).

Variações das produções de massas fresca e seca nas concentrações Ca₃ e Ca₄ durante o período de cultivo podem ser reflexos das interações iônicas estabelecidas principalmente com os íons SO₄²⁻ (Tabelas 6; 9) e PO₄³⁻ (Tabela 10), as quais reduziram a disponibilidade de cálcio nos meios de cultura. Talvez este fato possa justificar as menores produções das massas fresca e seca nos primeiros dias de cultivo, como também alterações na morfogênese observadas em Ca₃ e Ca₄ (Tabela 12; Figuras 4; 5A). Adicionalmente, os ajustes iônicos para os níveis em Ca₃ e Ca₄ foram estabelecidos com a adição de CaCl₂.2H₂O, elevando o nível de Cl⁻ para 5,002 mmol L⁻¹ e 12,502 mmol L⁻¹, respectivamente (Anexo 4). Entretanto, no estudo conduzido por Langer (2000) para avaliar o crescimento de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em meio de cultura JADS, as concentrações 7,5; 10,0 e 15,0 mmol L⁻¹ de cálcio foram estabelecidas com CaCl₂.2H₂O e Ca(NO₃).2H₂O, elevando a concentração de Cl⁻ em até 20 mmol L⁻¹, as quais não apresentaram sintomas de toxidez em 21 dias de cultivo, como também, a partir de 7,5 mmol L⁻¹ de cálcio houve estímulos ao crescimento e diferenciação das brotações. Enquanto, Kanashiro (2005) verificou que o uso de CaCl₂.2H₂O como fonte única de cálcio (3,35 mmol L⁻¹) em meio de cultura MS, o Cl⁻ adicionado (6,0002 mmol L⁻¹) foi tóxico e reduziu a produção de massa fresca e massa seca foliar de *Aechmea blanchetiana*.

2.3.2.3.4.2 Porcentagem de massa seca

A aplicação da análise de variância da regressão para a porcentagem de massa seca obtida em meios de cultura suplementados com 3,3 (Ca₁); 5,0 (Ca₂-JADS); 7,5 (Ca₃) e 11,25 (Ca₄) mmol L⁻¹ de cálcio, em função do período de cultivo como variável independente demonstrou que o modelo linear quadrático (p=0,0001) foi significativo para as concentrações Ca₃ e Ca₄, enquanto o modelo linear cúbico (p=0,0001) foi significativo para as concentrações Ca₁ e Ca₂ (Figura 20).

As tendências observadas para ganhos de porcentagens de massa seca nas concentrações Ca_1 e Ca_2 em 21 dias de cultivo indicam que no final do cultivo, Ca_2 apresenta menor conteúdo de água que Ca_1 , não interferindo na qualidade do crescimento das brotações observadas visualmente em ambos tratamentos (Tabela 12; Figura 4). Enquanto, a tendência para ganhos de porcentagem de massa seca obtida nas maiores concentrações de cálcio conduziu a uma situação de estresse de forma mais acentuada em Ca_4 do que em Ca_3 . Fatores que podem estar interferindo para isto já foram discutidos no item anterior, os quais devem contribuir à limitação de crescimento e/ou alterações metabólicas e morfológicas (Tabela 12; Figura 4).

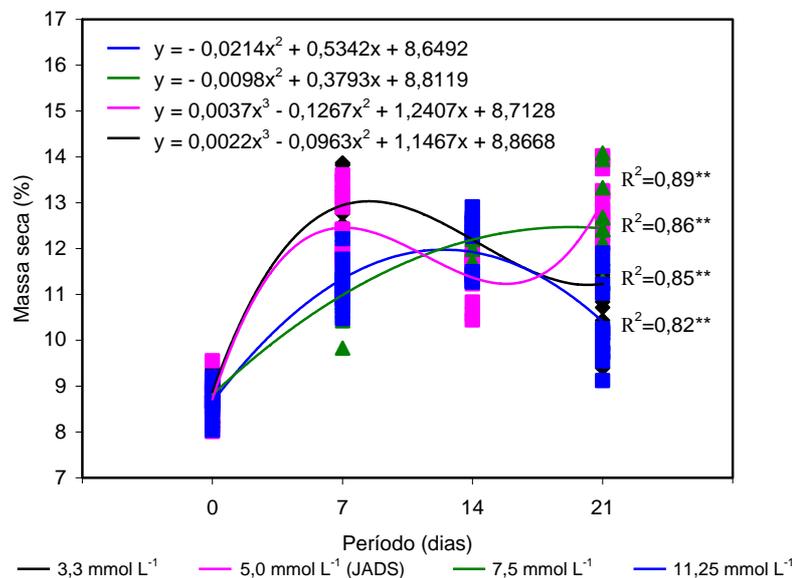


Figura 20 - Valores observados e funções ajustadas para a porcentagem de massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de cálcio em função do período cultivo. **significativo $p=0,0001$

2.3.2.3.4.3 Taxa de crescimento relativo

A aplicação da análise de variância da regressão para a taxa de crescimento relativo obtida em meios de cultura suplementados com 3,3 (Ca_1); 5,0 (Ca_2 -JADS); 7,5 (Ca_3) e 11,25 (Ca_4) $mmol L^{-1}$ de cálcio, em função do período de cultivo como variável independente demonstrou que o modelo linear cúbico ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações de cálcio (Figura 21).

Para todas as concentrações, as maiores médias das taxas de crescimento relativo foram obtidas entre 0-7 dias, as quais variaram de 21,3% em Ca₄ a 28,1% em Ca₂; no período seguinte (7-14 dias), os valores reduziram e variaram de 9,1% em Ca₁ a 15,5% em Ca₄; no último período (14-21 dias), os valores mantiveram-se entre 10,4% em Ca₂ a 13,1% em Ca₁, sugerindo estabilização do crescimento em Ca₂, Ca₃, Ca₄ e manutenção em Ca₁.

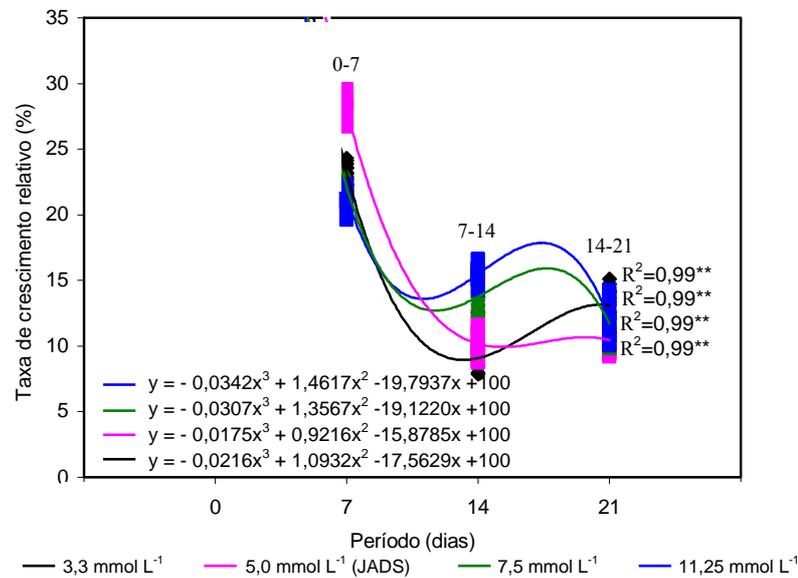


Figura 21 - Valores observados e funções ajustadas para a taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de cálcio em função do período cultivo. **significativo $p=0,0001$

2.3.2.3.5 Magnésio

2.3.2.3.5.1 Massa fresca e massa seca

A aplicação da análise de variância da regressão para a massa fresca (Figura 22) e massa seca (Figura 23) obtidas em meios de cultura suplementados com 2,0 (Mg₁); 3,0 (Mg₂-JADS); 4,5 (Mg₃) e 6,75 (Mg₄) mmol L⁻¹ de magnésio, em função do período de cultivo como variável independente, demonstrou que o modelo linear quadrático ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações de magnésio.

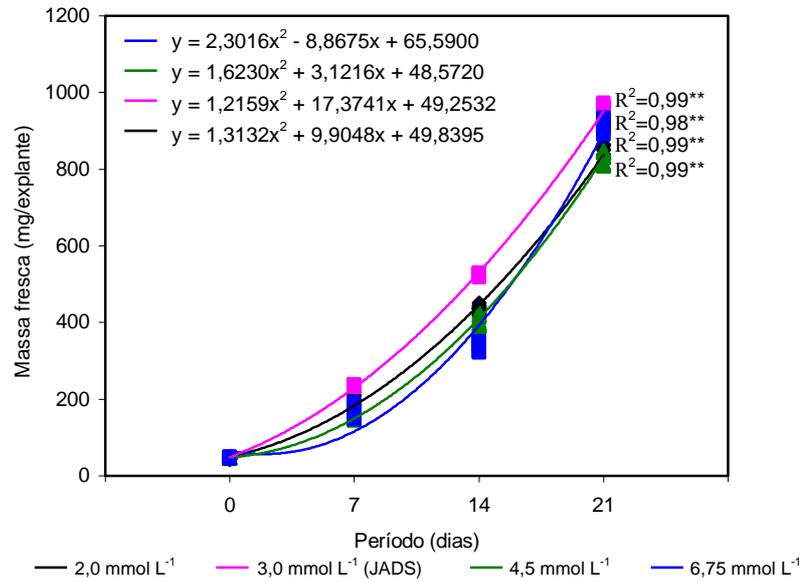


Figura 22 - Valores observados e funções ajustadas para a massa fresca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de magnésio em função do período cultivado. ** significativo p=0,0001

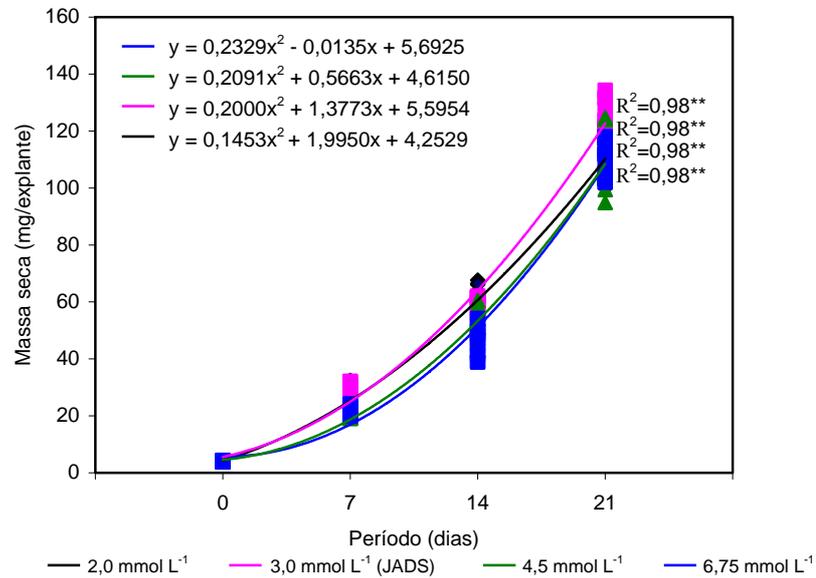


Figura 23 - Valores observados e funções ajustadas para a massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de magnésio em função do período cultivado. **significativo p=0,0001

Em todas as concentrações houve incrementos de massa fresca e massa seca ao longo do período de cultivo. Em 21 dias de cultivo, as massas fresca e seca aumentaram 18,4 e 27,6; 20,0 e 30,3; 17,7 e 26,6; 19,2 e 26,7 vezes em Mg₁, Mg₂, Mg₃ e Mg₄, respectivamente.

A concentração de magnésio Mg₂-JADS apresentou maior potencial para produção de massa fresca e seca, enquanto concentrações abaixo e superiores a Mg₂-JADS limitaram a produção das biomassas durante o ciclo de cultivo (Figuras 21; 22). Provavelmente a redução da concentração de magnésio para 2,0 mmol L⁻¹ foi insuficiente para manter o crescimento das brotações e a concentração superior de SO₄⁻² existente neste tratamento, em função da falta de ajuste iônico com relação à concentração existente no JADS (Anexo 5), pareceu não ter influenciado nas produções das massas fresca e seca.

Por outro lado, o aumento da concentração de magnésio favoreceu o estabelecimento de interações iônicas conforme a estimativa realizada pela especiação iônica, principalmente com o íon SO₄²⁻ (Tabela 9), provavelmente contribuindo para a limitação do crescimento. Um indicativo disto seria a tendência do desenvolvimento de brotações muito aglomeradas, pouco diferenciadas com redução da área foliar em função do aumento da concentração de magnésio (Tabela 12; Figura 4). Gomes e Shepherd (2000) observaram que plântulas de *Sinningia algophylla* cultivadas em meio de cultura MS com a presença ou ausência de magnésio apresentaram ótimo crescimento em 90 dias de cultivo, sugerindo que esta espécie apresenta eficiência na utilização de magnésio presente no meio de cultura MS e que a mesma utiliza os nutrientes armazenados em seus tecidos.

2.3.2.3.5.2 Porcentagem de massa seca

A aplicação da análise de variância da regressão para a porcentagem da massa seca obtida em meios de cultura suplementados com 2,0 (Mg₁); 3,0 (Mg₂-JADS); 4,5 (Mg₃) e 6,75 (Mg₄) mmol L⁻¹ de magnésio, em função do período de cultivo como variável independente, demonstrou que o modelo linear quadrático (p=0,0001) foi significativo para as concentrações Mg₁ e Mg₄, enquanto o modelo linear cúbico (p=0,0001) foi significativo para as concentrações Mg₂ e Mg₃ (Figura 24).

Comportamento similar entre os tratamentos de magnésio para aumentos de porcentagem de massa seca durante os primeiros 7 dias de cultivo e variações aos 14 dias, pouco

influenciou na porcentagem de massa seca ao final do cultivo. Tal comportamento poderia contribuir para maior homogeneidade de crescimento das brotações (Tabela 12; Figura 4).

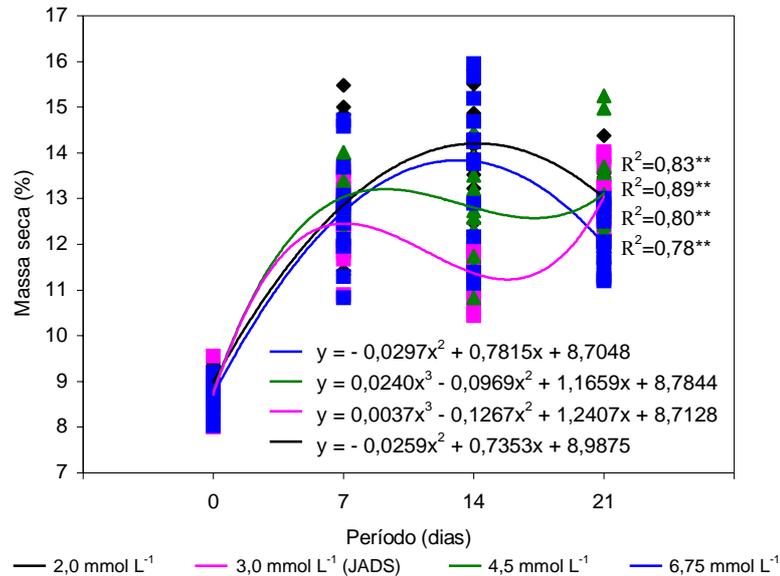


Figura 24 - Valores observados e funções ajustadas para a porcentagem de massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de magnésio em função do período cultivo. **significativo $p=0,0001$

2.3.2.3.5.3 Taxa de crescimento relativo

A aplicação da análise de variância da regressão para a taxa de crescimento relativo da massa seca obtida em meios de cultura suplementados com 2,0 (Mg₁); 3,0 (Mg₂ - JADS); 4,5 (Mg₃) e 6,75 (Mg₄) mmol L⁻¹ de magnésio, em função do período de cultivo como variável independente, demonstrou que o modelo linear cúbico ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações de magnésio (Figura 25).

Para todas as concentrações, maiores taxas de crescimento relativo foram obtidas entre 0-7 dias, as quais variaram de 22,7% em Mg₃ a 26,4% em Mg₁; no período seguinte (7-14 dias), os valores reduziram e variaram de 10,2% em Mg₂ a 13,4% em Mg₃; no último período (14-21 dias), os valores mantiveram-se entre 8,7% em Mg₁ a 12,3% em Mg₄ sugerindo redução da taxa de crescimento relativo em Mg₁ e estabilização desta taxa nos demais tratamentos.

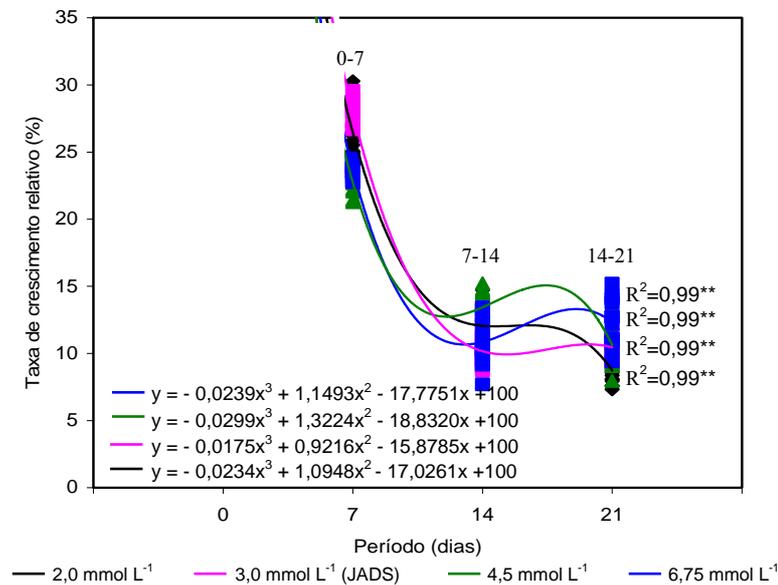


Figura 25 - Valores observados e funções ajustadas para a taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de magnésio em função do período cultivado. **significativo p=0,0001

2.3.2.3.6 Enxofre

2.3.2.3.6.1 Massa fresca e massa seca

A aplicação da análise de variância da regressão para a massa fresca (Figura 26) e massa seca (Figura 27) obtidas em meios de cultura suplementados com 2,29 (S₁); 3,29 (S₂-JADS); 4,79 (S₃) e 7,04 (S₄) mmol L⁻¹ de enxofre, em função do período de cultivo como variável independente, demonstrou que o modelo linear quadrático (p=0,0001) foi significativo para todas as concentrações de enxofre.

Em todas as concentrações, houve incrementos de massa fresca e massa seca ao longo do período de cultivo. Em 21 dias de cultivo, as massas fresca e seca aumentaram 25,4 e 28,4; 20,0 e 30,3; 23,8 e 33,6; 25,7 e 37,6 vezes em S₁, S₂, S₃ e S₄, respectivamente.

As concentrações de enxofre S₁, S₃ e S₄ apresentaram potencial para ganhos de massa fresca após 14 dias de cultivo, as quais corresponderam em maiores produções de massa seca, exceto para S₁, enquanto S₂ (JADS) pareceu manter uma constância de crescimento tanto para massa fresca quanto seca ao longo do período (Figuras 26; 27). Adicionalmente, este tratamento apresentou superioridade no padrão de crescimento das brotações quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 12; Figura 4). Esta resposta foi mais um indicativo deste estudo que a

obtenção de ganhos de massa fresca e seca, ou seja, crescimento máximo pode não corresponder em crescimento ótimo, desejável em qualquer sistema produtivo.

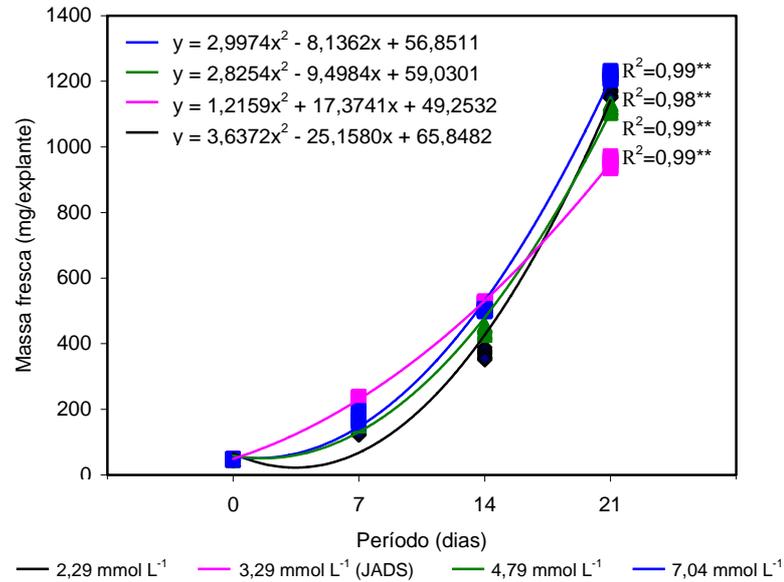


Figura 26 - Valores observados e funções ajustadas para a massa fresca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de enxofre em função do período cultivado. **significativo p=0,0001

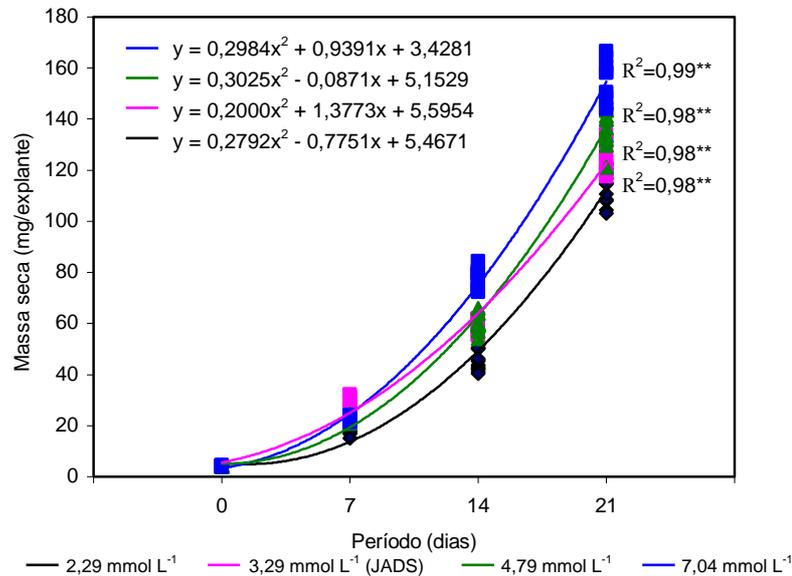


Figura 27 - Valores observados e funções ajustadas para a massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de enxofre em função do período cultivado. **significativo p=0,0001

2.3.2.3.6.2 Porcentagem de massa seca

A aplicação da análise de variância da regressão para a porcentagem da massa seca obtida em meios de cultura suplementados com 2,29 (S₁); 3,29 (S₂-JADS); 4,79 (S₃) e 7,04 (S₄) mmol L⁻¹ de enxofre, em função do período de cultivo como variável independente, demonstrou que o modelo linear quadrático (p=0,0001) foi significativo para as concentrações S₃ e S₄, enquanto o modelo linear cúbico (p=0,0001) foi significativo para as concentrações S₁ e S₂ (Figura 28).

As tendências observadas para ganhos de porcentagens de massa seca nas diferentes concentrações de enxofre, apesar de diferenciarem entre si, conduziram para similaridade de resposta aos 21 dias de cultivo em S₂, S₃ e S₄, em 21 dias de cultivo. Entretanto, S₁ após 7 dias de cultivo apresentou redução da porcentagem de massa seca até 21 dias de cultivo indicando ser este o tratamento com maior potencial para acumular água nas brotações. Exceto S₂, todos os tratamentos interferiram na qualidade de crescimento das brotações (Tabela 12; Figura 4).

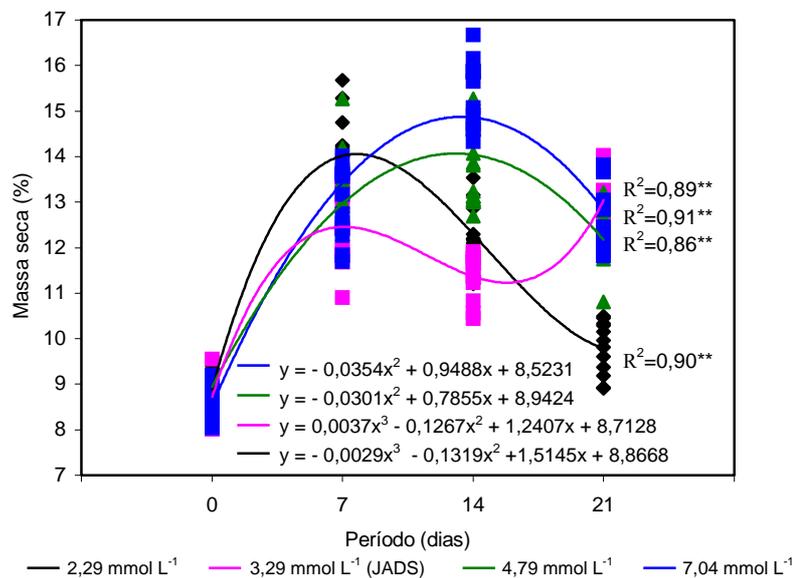


Figura 28 - Valores observados e funções ajustadas para a porcentagem de massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de enxofre em função do período cultivo. **significativo p=0,0001

2.3.2.3.6.3 Taxa de crescimento relativo

A aplicação da análise de variância da regressão para a taxa de crescimento relativo obtida em meios de cultura suplementados com 2,29 (S₁); 3,29 (S₂-JADS); 4,79 (S₃) e 7,04 (S₄) mmol L⁻¹ de enxofre, em função do período de cultivo como variável independente, demonstrou que o modelo linear (p=0,0001) foi significativo para a concentração S₄, enquanto o modelo linear quadrático (p=0,0001) foi significativo para as concentrações S₁, S₂ e S₃ (Figura 29).

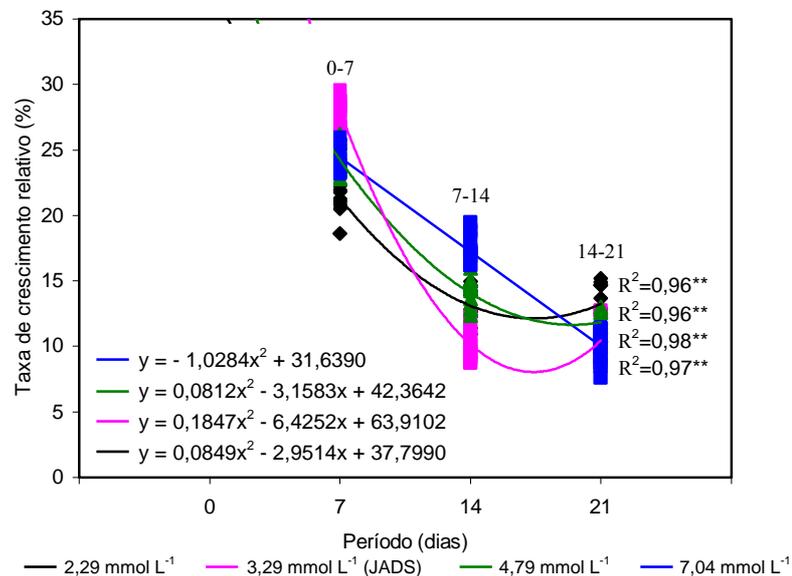


Figura 29 - Valores observados e funções ajustadas para a taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de enxofre em função do período cultivo. **significativo p=0,0001

Para todas as concentrações, maiores taxas de crescimento relativo foram obtidas entre 0-7 dias, as quais variaram de 21,3% em S₁ a 27,9% em S₂; no período seguinte (7-14 dias), os valores reduziram e variaram de 10,2% em S₂ a 17,5% em S₄ e no último período (14-21 dias), os valores mantiveram-se entre 9,8% em S₄ a 13,2% em S₁.

2.3.2.3.7 Considerações

As variações nos ganhos de massa fresca e seca ao longo do cultivo ocorreram em função do macronutriente e da sua concentração sendo possível também verificar visualmente diferenças na morfogênese das brotações em 21 dias de cultivo (Tabela 12; Figuras 3; 4).

Maiores taxas de crescimento relativo independente do tratamento, durante os primeiros 7 dias de cultivo, estão relacionadas à grande atividade de divisão celular, formação de novos meristemas, diferenciação de gemas e crescimento das brotações, conforme observado por Ramage e Williams (2003) na organogênese em discos foliares de tabaco durante a fase da morfogênese correspondente deste estudo. Este comportamento também foi verificado por Correia et al. (1995) em meio de cultura JADS, líquido e sólido, e Langer (2000) em meio de cultura JADS sólido, ambos cultivando híbridos de *Eucalyptus*, respectivamente. Basso et al. (2003) cultivando um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em meio de cultura GM obtiveram a mesma tendência. Tais respostas são influenciadas pelas atividades hormonais endógenas (SOUZA et al., 2003) e exógenas, bem como a disponibilidade e a absorção de nutrientes, de água e de carboidratos (LEIFERT; MURPHY; LUMSDEN, 1995; RAMAGE; WILLIAMS, 2002; 2003).

Este comportamento pode estar relacionado com aumento da velocidade de absorção dos nutrientes pelo explante, onde o meio de cultura encontra-se mais favorável ao transporte e trocas de íons; este período também corresponde a maior ocorrência de sítios de ligação livres na parede e estrutura celular que podem favorecer o crescimento inicial (MARSCHNER, 1995). No estudo conduzido por Langer (2000) foi verificado que durante os primeiros 14 dias de cultivo em meio de cultura JADS suplementado com diferentes concentrações de cálcio, explantes de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* apresentaram maiores porcentagens dos nutrientes totais analisados nos tecidos vegetais. Ingestad e Agren (1995) preconizaram que a velocidade de crescimento é diretamente proporcional à velocidade de absorção dos nutrientes; para o crescimento máximo, a absorção de nutrientes é dependente da temperatura, intensidade de luz e do genótipo. Esta fase também se caracteriza por intensa atividade enzimática e metabólica, síntese de proteínas e consumo de energia (LEIFERT; MURPHY; LUMSDEN, 1995).

2.3.3 Crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo

Os resultados da análise de variância para massa fresca, massa seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivados *in vitro* em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes, aos 21 dias de cultivo, encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 - Resumo das análises de variância para a massa fresca, massa seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo

Fonte de variação	GL.	Quadrados médios			
		Massa fresca (g/explante)	Massa seca ⁽¹⁾ (g/explante)	Massa seca ⁽²⁾ (%)	Taxa de crescimento relativo ⁽³⁾ (%)
Tratamentos	18	776611,89**	14,6479**	0,0632**	11181,7259**
Resíduo	551	96,82	0,0782	0,0004	60,1955
F		8021,13**	187,25**	135,17**	185,76**
CV (%)		2,96	2,50	1,97	2,93

** significativo pelo teste F, $p = 0,0001$; ⁽¹⁾ transformado em \sqrt{x} ; ⁽²⁾ transformado em $\log_{10}(x)$; ⁽³⁾ transformado em (x^2)

2.3.3.1 Massa fresca

Na Figura 30, observa-se que as maiores médias para produção de massa fresca foram obtidas em meios de cultura suplementados com maiores concentração de enxofre (S₄-1221,7 mg/explante) e nitrogênio (N₄-1214,8 mg/explante), as quais não foram significativas entre si. Adicionalmente, a concentração N₄ não apresentou diferença significativa da média alcançada em Ca₄ (1210,3 mg/explante). Enquanto, menor concentração de nitrogênio (N₁) promoveu menor média de produção de massa fresca (837,9 mg/explante) diferenciando significativamente dos demais tratamentos e expressando redução de 31,4% de produção de massa fresca em relação a maior média alcançada no nível S₄. Exceto fósforo, maiores concentrações de cada macronutriente apresentaram maiores produções de massa fresca entre as concentrações testadas. O meio de cultura JADS (concentração 2 em cada macronutriente) apresentou maior média para produção de massa fresca entre as concentrações de fósforo. Entre os macronutrientes, somente

em nitrogênio houve aumentos crescentes de massa fresca com a elevação das concentrações deste elemento.

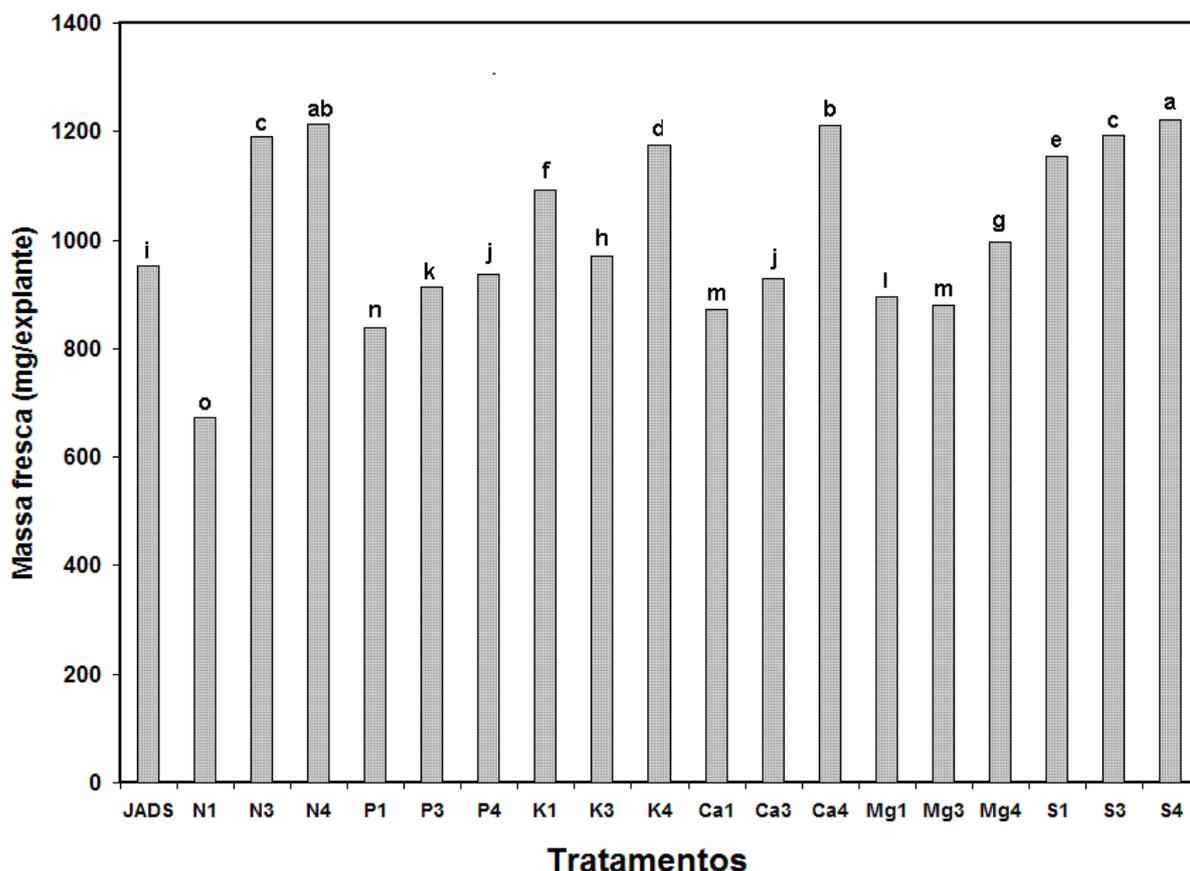


Figura 30 - Massa fresca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$)

(mmol L⁻¹: JADS [N₂ = 26,0; P₂ = 3,0; K₂ = 11,0; Ca₂ = 5,0; Mg₂ = 3,0; S₂ = 3,29]; N₁ = 17,3; N₃ = 39,0; N₄ = 58,5; P₁ = 2,0; P₃ = 4,5; P₄ = 6,75; K₁ = 7,3; K₃ = 16,5; K₄ = 24,75; Ca₁ = 3,3; Ca₃ = 7,5; Ca₄ = 11,25; Mg₁ = 2,0; Mg₃ = 4,5; Mg₄ = 6,75; S₁ = 2,29; S₃ = 4,79; S₄ = 7,04)

Maiores ganhos de massa fresca foram relacionados com as maiores concentrações de enxofre (S₄), nitrogênio (N₄) e Ca₄. Entretanto, o aspecto morfológico das brotações nestes tratamentos (Tabela 12; Figuras 3; 4; 5A,B) apesar de apresentarem características distintas entre si, em nenhum tratamento observou-se o padrão ideal de crescimento à multiplicação de brotações de *Eucalyptus in vitro*: aglomerados de brotações com folhas pequenas, verdes, vigorosas, compactas, com tamanho uniforme e homogêneo que proporcione alta rentabilidade no

estabelecimento de novos explantes no sistema comercial de micropropagação (CORREIA et al., 1995). Desta forma, pode-se inferir que os níveis utilizados destes elementos foram excessivos e favoreceram o estabelecimento de interações iônicas que limitaram a absorção de um ou mais nutrientes e/ou a ocorrência de desvios metabólicos conduzindo a distúrbios fisiológicos, que em 21 dias de cultivo causaram modificações passíveis de serem visualizadas como: redução do vigor, redução da maciez do tecido foliar, intumescimento das hastes e hiperhidria (WILLIAMS, 1995; RAMAGE; WILLIAMS, 2002; KEVERS et al., 2004).

Adicionalmente, além das concentrações mais elevadas e das interações com o ambiente de cultivo, a relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$, a elevação da concentração do íon Cl^- estabelecidas nestes meios em função do ajuste iônico dos mesmos, podem estar interferindo negativamente na qualidade do crescimento das brotações (WILLIAMS, 1995). Em S_4 ($7,04 \text{ mmol L}^{-1}$), o ajuste iônico para o enxofre foi complementado com a fonte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ estabelecendo a menor relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (2,35:1) entre as concentrações de enxofre (Anexo 6). Sarmiento et al. (1994) verificaram que o crescimento *in vitro* de oliveira em meio de cultura contendo 20 mmol L^{-1} de N utilizando a fonte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, apresentou deformações nas plântulas, redução do crescimento, aumento do teor de enxofre e redução do teor de potássio nos tecidos vegetais. A redução da relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ foi mais acentuada em N_4 , onde o equilíbrio iônico do meio deu-se somente com NH_4NO_3 na relação 1,89:1 (Anexo 1), similar a do meio de cultura MS (Tabela 1) e, considerada inadequada para o cultivo *in vitro* da maioria das plantas lenhosas (LEIFERT; MURPHY; LUMSDEN, 1995).

Por outro lado, o meio de cultura Ca_4 não difere da relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (5,5:1) estabelecida no meio de cultura JADS (Anexo 4). Entretanto, em função do equilíbrio iônico para o nível Ca_4 parcialmente definido com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, a concentração de Cl^- foi elevada para $12,502 \text{ mmol L}^{-1}$. Ressalta-se que a concentração de Cl^- ($5,9 \text{ mmol L}^{-1}$) existente no meio de cultura MS já foi considerada excessiva para o cultivo *in vitro* de *Passiflora edulis* (MONTEIRO et al., 2000) e *Aechmea blanchetiana* (KANASHIRO, 2005). O mesmo não foi observado por Langer (2000) no cultivo de um clone *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* *in vitro* onde para o ajuste iônico dos meios de cultura foi utilizado até 20 mmol L^{-1} de Cl^- .

A menor produção de massa fresca relaciona-se com menor concentração de nitrogênio. Concentrações de nitrogênio promoveram maiores variações de produção de massa fresca destacando a importância deste elemento (AGREN, 1985; EPSTEIN; BLOOM, 2005) para o crescimento e diferenciação de brotações e da definição de uma concentração ótima à fase de

multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis*. Neste sentido, apesar da produção de matéria fresca intermediária, destaca-se a concentração do nível 2 (JADS) por ter apresentado características de crescimento das brotações próximas ao desejável e consideradas ideais em um sistema de cultivo *in vitro* à fase correspondente (Tabela 12; Figuras 2; 3) A concentração Mg₄ também se destacou por apresentar esta característica morfológica, apesar de apresentarem folhas com expansão foliar reduzida. Provavelmente, esta característica esteja relacionada com o excesso de magnésio, alta relação NO₃⁻:NH₄⁺ (Anexo 5) e manutenção do pH mais elevado durante o período de cultivo (Tabela 11).

2.3.3.2 Massa seca

Na Figura 31, verifica-se que na maior concentração de enxofre (S₄) foi alcançada maior média para produção de massa seca (154,2 mg/explante) a qual não diferenciou significativamente dos valores obtidos de massa seca nas concentrações de enxofre (S₃-151,2) e de nitrogênio (N₃-149,9 mg/explante). Por outro lado, a massa seca produzida na menor concentração de potássio (K₁-145,7 mg/explante) não apresentou diferença significativa para aquelas obtidas em S₃ e N₃. Na concentração de cálcio (Ca₁) obteve-se menor produção de massa seca (98,5 mg/explante) o que representa uma redução de 36,1% de massa seca em relação ao alcançado em S₄. Incrementos de massa seca em função do aumento da concentração foram observados somente para as concentrações de enxofre e de nitrogênio para os níveis N₁, N₂ (JADS) e N₃.

Exceto em S₄, maiores massas frescas significativas não expressaram maiores produções de massa seca. Assim, concentrações mais elevadas de enxofre (S₄ e S₃) e N₃ acumularam as maiores massas secas seguida de K₁. Os meios de cultura S₄, S₃, N₃ e K₁ apresentaram potencial para produzir 15,4, 15,1, 14,9 e 14,5 g matéria seca L⁻¹, respectivamente, em 21 dias de cultivo. Entretanto, da mesma forma que em S₄ (Tabela 12; Figuras 4; 5B), as características de crescimento das brotações obtidas nestes meios de cultura não apresentaram o padrão ideal de crescimento à multiplicação de *Eucalyptus grandis*, mostrando-se excessivas para S₃ e N₃ (Tabela 12; Figuras 3; 4) ou menos adequado para K₁ para a morfogênese das brotações (Tabela 12; Figura 3) ou o material genético utilizado poderia ser mais eficiente à absorção de potássio como

observou Lima (2004) quando avaliou clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* às concentrações de potássio *in vitro*.

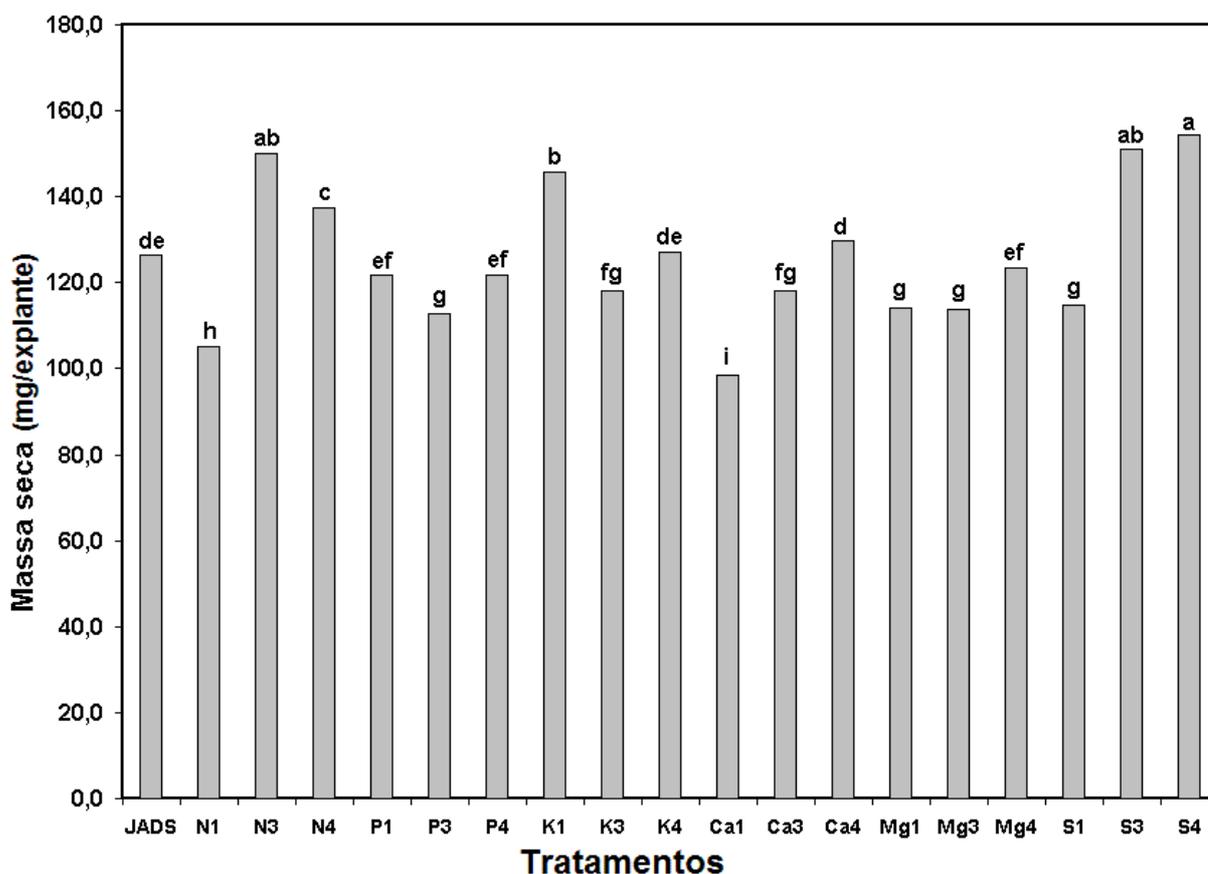


Figura 31 - Massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo. Dados transformados $=\sqrt{x}$; Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$) (mmol L⁻¹: JADS [N₂ = 26,0; P₂ = 3,0; K₂ = 11,0; Ca₂ = 5,0; Mg₂ = 3,0; S₂ = 3,29]; N₁ = 17,3; N₃ = 39,0; N₄ = 58,5; P₁ = 2,0; P₃ = 4,5; P₄ = 6,75; K₁ = 7,3; K₃ = 16,5; K₄ = 24,75; Ca₁ = 3,3; Ca₃ = 7,5; Ca₄ = 11,25; Mg₁ = 2,0; Mg₃ = 4,5; Mg₄ = 6,75; S₁ = 2,29; S₃ = 4,79; S₄ = 7,04)

O nível 2 (JADS) representou ganho de massa seca intermediário com relação aos demais tratamentos. Este se destacou pelas características adequadas de crescimento das brotações. Neste sentido, a organogênese alcançada pode ser considerada ótima e adequada à multiplicação de brotações no sistema da micropropagação de *Eucalyptus grandis*. Quanto ao crescimento máximo, objetivando a produção esperada em JADS (15 g de matéria seca L⁻¹ de meio de cultura), o mesmo não foi alcançado.

De acordo com o método escolhido (4 explantes por unidade experimental em 40 mL de meio líquido) foi possível obter a produção de 12,6 g matéria seca L⁻¹ de meio de cultura em JADS. Estudos conduzidos com a mesma metodologia por Correia et al. (1995) em meio sólido e líquido, e Lima (2004) em meio sólido, ambos cultivando clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, Higashi e Gonçalves (2006) em meio líquido com *Eucalyptus grandis*, obtiveram produções médias de 14,3, 12,2, 13,5 e 12,8 g de matéria seca L⁻¹ de meio de cultura, respectivamente. Além da variabilidade genética entre progênies ou clones e da presença ou ausência de agente geleificante encontradas nestes estudos, uma provável competição entre explantes por nutrientes pode ter inibido o crescimento como observado por Lumsden; Pryce; Leifert (1990) e Pryce et al. (1993) quando avaliaram a absorção de nutrientes e carboidratos disponíveis no meio de cultura MS em função do número de explantes (*Delphinium*) por frasco. A redução do número de explantes ou o fornecimento de um volume maior de meio de cultura em cada unidade experimental poderia contribuir para o aumento da biomassa. Todavia, a otimização do meio de cultura só pode ser validada se houver constância do padrão morfogênico e da taxa de crescimento ao longo dos subcultivos (WILLIAMS, 1995; GRIBBLE et al, 2002).

2.3.3.3 Porcentagem de massa seca das brotações

Pode-se observar na Figura 32 que as médias de porcentagem de massa seca variaram de 9,9% a 15,6%. Esta amplitude para acúmulo de massa seca e, conseqüentemente, quantidade de água nos tecidos vegetais (84,4% a 90,1%) pode ser considerada adequada ao desenvolvimento de plantas (EPSTEIN; BLOOM, 2005). Entretanto, a menor concentração de nitrogênio (N₁) apresentou a maior porcentagem de massa seca diferenciando significativamente dos demais tratamentos, seguida da menor concentração de fósforo (P₁-14,4%). Enquanto, a menor concentração de enxofre (S₁) destacou-se significativamente dos demais tratamentos obtendo a menor porcentagem de massa seca.

Variação do conteúdo de água na planta influencia a absorção de nutrientes minerais, transporte e metabolismo celular (AUER et al., 1992; WILLIAMS, 1995; RAMAGE; WILLIAMS, 2004; EPSTEIN; BLOOM, 2005). Neste sentido, ficou evidente a limitação do crescimento das brotações causada em meios com as menores concentrações de nitrogênio (N₁) e fósforo (P₁). Provavelmente, as deficiências de nitrogênio e fósforo, em função da baixa

concentração destes elementos e da importância destes elementos no crescimento e desenvolvimento de plantas, tenham restringido a divisão e expansão celular, disponibilidade de água e de outros nutrientes, formação e redistribuição de compostos orgânicos, atividades e síntese de hormônios envolvidos no crescimento e diferenciação celular conduzindo para um estresse e favorecendo o acúmulo de massa seca (TAIZ; ZEIGER, 2002).

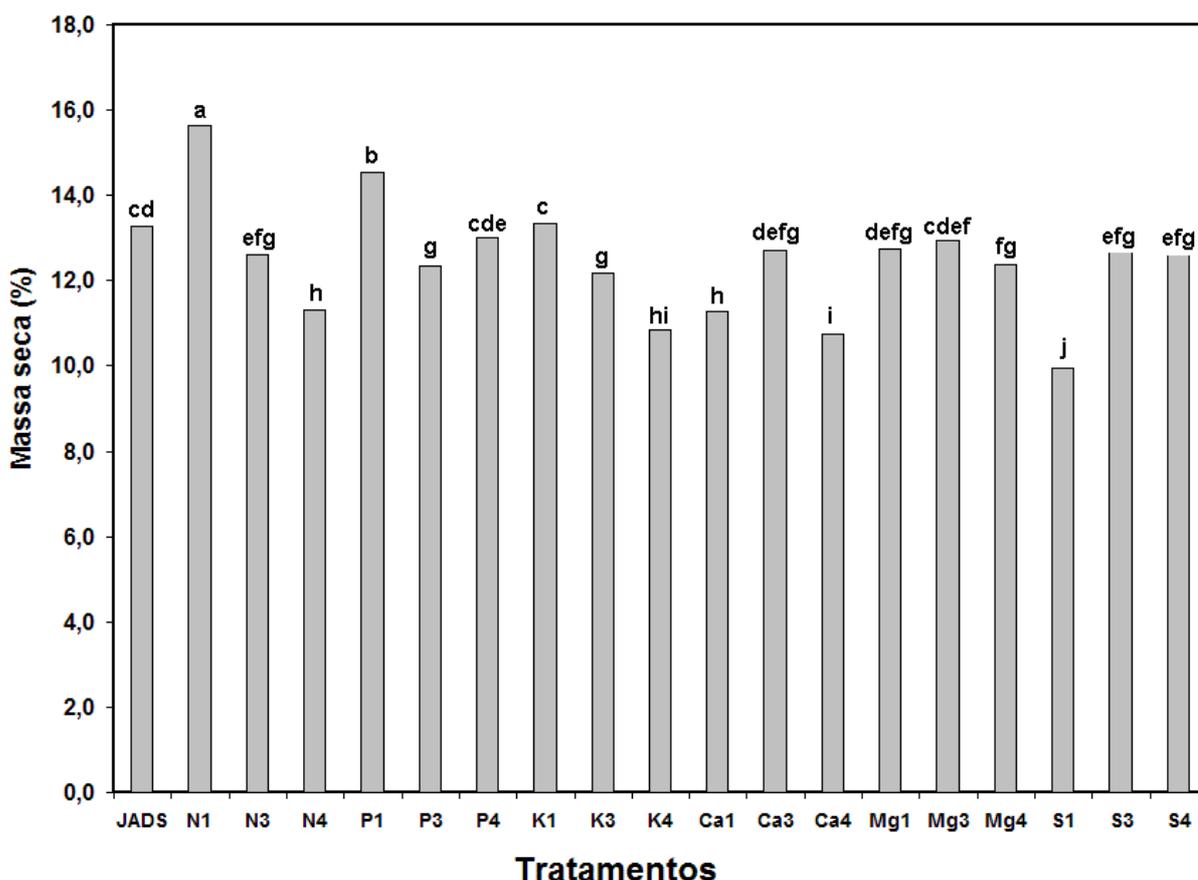


Figura 32 - Porcentagem de massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo. Dados transformados = $\log_{10}(x)$; Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$) (mmol L⁻¹: JADS [N₂ = 26,0; P₂ = 3,0; K₂ = 11,0; Ca₂ = 5,0; Mg₂ = 3,0; S₂ = 3,29]; N₁ = 17,3; N₃ = 39,0; N₄ = 58,5; P₁ = 2,0; P₃ = 4,5; P₄ = 6,75; K₁ = 7,3; K₃ = 16,5; K₄ = 24,75; Ca₁ = 3,3; Ca₃ = 7,5; Ca₄ = 11,25; Mg₁ = 2,0; Mg₃ = 4,5; Mg₄ = 6,75; S₁ = 2,29; S₃ = 4,79; S₄ = 7,04)

Enquanto a menor concentração de enxofre favoreceu maior acúmulo de água e conseqüentemente, a elevação da produção de massa fresca sugerindo que a redução da concentração de enxofre, relação NO₃⁻:NH₄⁺ mais elevada em S₁ (Anexo 6) e/ou menores

oscilações dos valores de pH ao longo do período de cultivo (Tabela 11) podem ter contribuído para a redução da porcentagem da massa seca aos 21 dias de cultivo.

Adicionalmente, observa-se na Figura 32 que entre os macronutrientes, as porcentagens de massa seca decresceram significativamente com o aumento das concentrações de nitrogênio indicando maior acúmulo de água ou produção de massa fresca com a elevação da concentração deste elemento e com a redução da relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (Anexo 1). Este resultado enfatiza a importância do nitrogênio no processo de crescimento das plantas (EPSTEIN; BLOOM, 2005), tanto quanto a necessidade de definir a concentração adequada observando a fonte de nutriente e a relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (WILLIAMS, 1995; AVILA; PEREYRA; ARGUELLO, 1998; RAMAGE; WILLIAMS, 2003; KINTZIOS; STAVROPOULOU; SKAMNELI, 2004), a fase do cultivo *in vitro* (RAMAGE; WILLIAMS, 2003) e exigências nutricionais da espécie (CORREIA et al., 1995).

2.3.3.4 Taxa de crescimento relativo das brotações

As taxas de crescimento relativo calculadas com a massa seca obtida no início do experimento (dia zero) e no 21º dia de cultivo podem ser observadas na Figura 33. As maiores taxas de crescimento relativo foram obtidas nas concentrações S_4 (17,3%), S_3 (17,2%) e N_3 (17,1%), as quais não diferenciaram significativamente. Adicionalmente, a taxa de crescimento relativo alcançada na menor concentração de potássio (K_1 –17,0%) não apresentou diferença significativa para aquelas obtidas em S_3 e N_3 . Na concentração de cálcio (Ca_1) obteve-se a menor taxa de crescimento relativo (15,1%) seguida da taxa de crescimento relativo alcançada na menor concentração de nitrogênio (N_1 –15,4%), ambas diferenciando significativamente entre si e dos demais tratamentos. Houve aumentos significativos nas taxas de crescimento relativo em função das elevações das concentrações de enxofre e de nitrogênio para os níveis N_1 , N_2 (JADS) e N_3 .

Este estudo foi conduzido com material oriundo de sementes (F_2), portanto possui variabilidade genética, o qual pode estar influenciando os resultados. Entretanto, verifica-se que concentrações elevadas de nitrogênio (N_3) e de enxofre (S_3 e S_4) favoreceram maiores ganhos de massa seca, enquanto as menores concentrações de cálcio (Ca_1) e nitrogênio (N_1) estão limitando o crescimento expresso em massa seca e, conseqüentemente, refletindo nas menores taxas de crescimento relativo. De acordo com Ingestad e Agred (1995), o crescimento é controlado por

fonte de carbono, nitrogênio e outros nutrientes minerais, água, luz, temperatura, material genético e estado nutricional da planta. Por outro lado, taxa de crescimento relativo elevada obtida na menor concentração de potássio (K_1) pode estar relacionada à eficiência do material genético quanto à absorção de potássio. Neste sentido, Ingestad e Agred (1995) destacam que as maiores taxas de crescimento relativo são obtidas em plantas que apresentam as melhores características genéticas para o seu crescimento.

Adicionalmente, o meio de cultura JADS e o meio com a concentração de cálcio (Ca_3) (Anexo 4) apresentaram maiores taxas de crescimento relativo do que no estudo conduzido por Langer (2000) com um clone de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em meio JADS (13,3%) e em JADS suplementado com 7,5 mmol L⁻¹ de cálcio (13,6%) em 21 dias de cultivo.

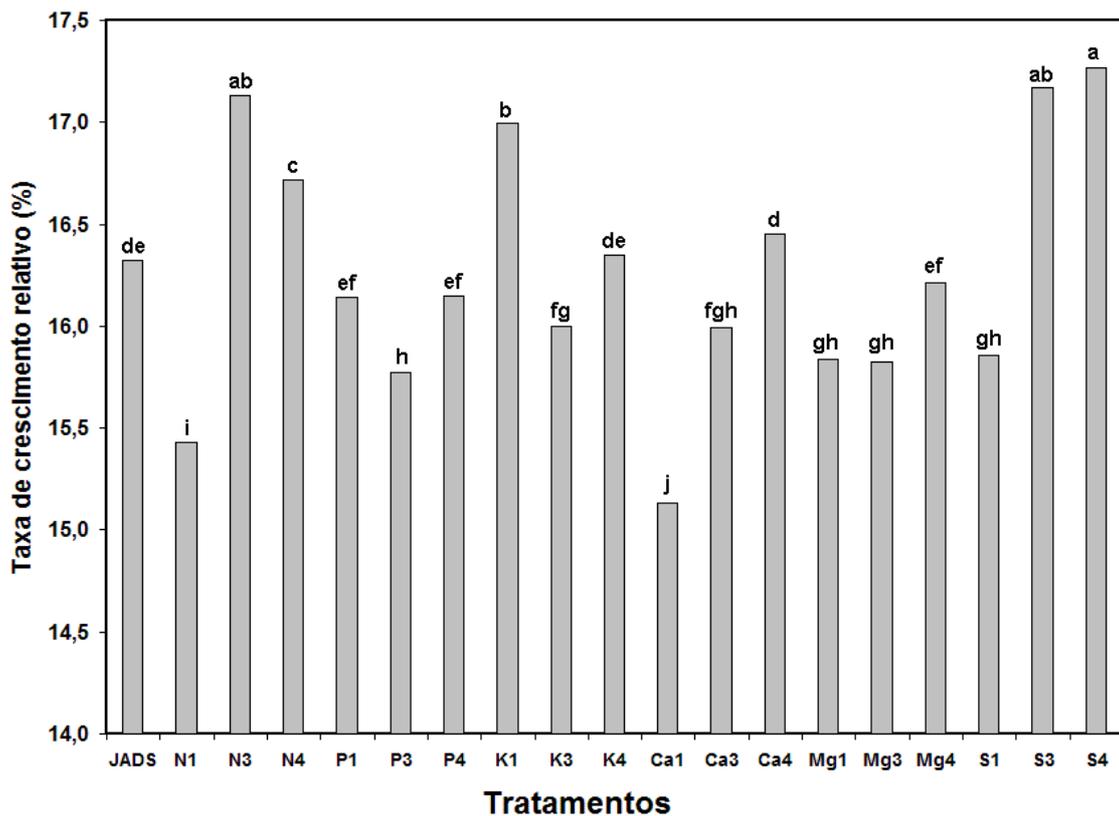


Figura 33 - Taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo. Dados transformados = (x^2); Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$) (mmol L⁻¹: JADS [$N_2 = 26,0$; $P_2 = 3,0$; $K_2 = 11,0$; $Ca_2 = 5,0$; $Mg_2 = 3,0$; $S_2 = 3,29$]; $N_1 = 17,3$; $N_3 = 39,0$; $N_4 = 58,5$; $P_1 = 2,0$; $P_3 = 4,5$; $P_4 = 6,75$; $K_1 = 7,3$; $K_3 = 16,5$; $K_4 = 24,75$; $Ca_1 = 3,3$; $Ca_3 = 7,5$; $Ca_4 = 11,25$; $Mg_1 = 2,0$; $Mg_3 = 4,5$; $Mg_4 = 6,75$; $S_1 = 2,29$; $S_3 = 4,79$; $S_4 = 7,04$)

2.3.4 Teores de nutrientes minerais em brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo

Os resultados das análises de variância quanto à significância do teste de F e respectivos coeficientes de variação, bem como os resultados do teste de comparação de médias para os teores de nutrientes minerais obtidos em brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes, aos em 21 dias de cultivo, encontram-se nas Tabelas 14, 15, 16 e 17.

2.3.4.1 Teores de macronutrientes e interações

2.3.4.1.1 Teor de nitrogênio e interações

Observa-se na Tabela 14 que o menor teor de nitrogênio ($24,23 \text{ g kg}^{-1}$) foi encontrado na menor concentração (N_1) enquanto o maior teor ($38,63 \text{ g kg}^{-1}$) refere-se à concentração de nitrogênio (N_4). Entretanto, não houve diferenças significativas entre N_4 e os teores obtidos em N_3 , K_1 , Ca_1 , Ca_4 , Mg_1 , S_1 , S_3 e S_4 . Da mesma forma, o menor teor (N_1) não apresentou diferenças significativas com relação aos teores correspondentes ao meio de cultura JADS, P_1 , P_3 , P_4 , K_3 , K_4 , Mg_3 , Mg_4 , S_3 e S_4 .

Considerando a faixa de teores adequados de nitrogênio ($30-40 \text{ g kg}^{-1}$) na massa seca de brotações de *Eucalyptus* cultivadas *in vitro*, aos 21 dias de cultivo, segundo Higashi e Gonçalves (2001), os valores obtidos nos diferentes tratamentos estão em concordância ou muito próximos ao limite inferior da faixa, exceto para N_1 , P_3 e P_4 onde os teores foram menores. Estudos conduzidos por Higashi e Gonçalves (2006) com *Eucalyptus grandis*, Langer (2000) com clone de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, Lima (2004) e Higashi (1996) com clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e Higashi (1996) com clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis* cultivados em meio de cultura JADS e, por Basso et al. (2003) cultivando clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em meio de cultura GM, também encontraram teores de nitrogênio, na maioria próximo ao limite inferior da faixa proposta.

A elevação da concentração de nitrogênio nos meios de cultura proporcionou aumentos dos teores de nitrogênio nas brotações (Tabela 14). Em cultivo *in vitro*, respostas similares foram alcançadas por Garcia et al. (1994) estudando o efeito de nitrogênio nas concentrações entre

$5 \leq N \leq 30$ mmol L⁻¹ em oliveira, por Avila; Pereyra; Arguello (1998) nas concentrações 30 e 60 mmol L⁻¹ de nitrogênio em *Solanum tuberosum* e Kanashiro (2005) entre $7,5 \leq N \leq 120$ mmol L⁻¹ em *Aechmea blanchetiana*. Enquanto Higashi (1996) e Higashi e Gonçalves (2006) demonstraram que a omissão seletiva de nitrogênio no meio de cultura JADS quando comparado ao completo, pode reduzir aproximadamente 57% do teor de nitrogênio em brotações de clones híbridos de *Eucalyptus* e 47% do teor de nitrogênio em brotações em *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro*, respectivamente.

Tabela 14 - Médias dos teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) nas brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo

Tratamentos Mmol L ⁻¹	N	P ⁽¹⁾ g kg ⁻¹	K ⁽²⁾
JADS *	29,53 cdef	6,23 cde	31,63 defgh
N ₁ 17,30	24,23 f	5,60 b	28,40 efg
N ₃ 39,00	34,40 abc	6,20 cde	30,63 defgh
N ₄ 58,50	38,63 a	6,40 cdef	24,67 gh
P ₁ 2,00	30,20 cdef	4,40 a	26,93 fgh
P ₃ 4,50	26,03 ef	8,13 gh	29,60 defgh
P ₄ 6,75	27,00 def	9,93 h	27,13 fgh
K ₁ 7,30	32,87 abcde	6,70 ef	20,60 h
K ₃ 16,50	31,07 bcdef	6,80 ef	44,47 ab
K ₄ 24,75	29,83 cdef	7,03 efg	49,23 a
Ca ₁ 3,30	37,10 ab	7,23 fg	41,07 bc
Ca ₃ 7,50	31,60 bcde	5,87 bc	35,87 cdef
Ca ₄ 11,25	32,40 abcde	5,90 bcd	38,03 bcd
Mg ₁ 2,00	33,13 abcd	6,60 def	35,17 cdefg
Mg ₃ 4,50	29,27 cdef	6,30 cde	35,13 cdefg
Mg ₄ 6,75	30,47 bcdef	6,43 cdef	37,30 bcde
S ₁ 2,29	35,00 abc	6,47 cdef	42,00 bc
S ₃ 4,79	32,33 abcdef	6,27 cde	36,57 cdef
S ₄ 7,04	31,90 abcdef	6,30 cde	31,37 defgh
F	7,61**	54,36**	17,70**
CV (%)	7,08	7,61	17,06

*(N₂ = 26,0; P₂ = 3,0; K₂ = 11,0; Ca₂ = 5,0; Mg₂ = 3,0; S₂ = 3,29 mmol L⁻¹)

**significativo pelo teste F, $\alpha = 0,0001$; ⁽¹⁾dados transformados = (x⁻²); ⁽²⁾dados transformados = (x²); Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$)

Brotações desenvolvidas em meio com a menor concentração de nitrogênio (N₁) apresentaram redução do teor de fósforo (Tabela 14) e aumento do teor de cálcio (Tabela 15), ambos significativos, redução do teor de enxofre o qual não diferenciou de N₂ (JADS) (Tabela 15) e redução do teor de zinco diferenciando apenas de N₄ (Tabela 17). Enquanto maiores

concentrações de nitrogênio (N₃ e N₄) estimularam o aumento do teor de enxofre nas brotações diferenciando dos teores encontrados nas menores concentrações de nitrogênio (Tabela 15).

Tabela 15 - Médias dos teores de cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) nas brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo

Tratamentos	Ca ⁽¹⁾	Mg	S
Mmol L ⁻¹		g kg ⁻¹	
JADS *	8,80 defg	4,03 cde	3,33 ghi
N ₁ 17,30	11,93 ab	4,03 cde	3,37 ghi
N ₃ 39,00	9,13 cdefg	3,77 cde	4,63 bcd
N ₄ 58,50	7,37 ghij	2,90 ef	4,87 bc
P ₁ 2,00	11,10 abc	4,17 cd	3,93 defg
P ₃ 4,50	8,40 defg	4,00 cde	3,63 fghi
P ₄ 6,75	6,67 hij	2,87 ef	3,57 fghi
K ₁ 7,30	9,93 abcde	3,80 cde	4,17 cdef
K ₃ 16,50	9,97 abcde	4,17 cd	4,13 cdef
K ₄ 24,75	8,67 defg	4,07 cde	3,83 efgh
Ca ₁ 3,30	5,93 j	3,27 def	3,73 fgh
Ca ₃ 7,50	12,30 a	4,23 cd	4,17 cdef
Ca ₄ 11,25	9,37 cdef	3,77 cde	4,57 bcde
Mg ₁ 2,00	7,93 fghi	2,50 f	5,17 b
Mg ₃ 4,50	9,47 cdef	6,10 b	3,70 fgh
Mg ₄ 6,75	9,70 bcdef	9,13 a	3,13 hi
S ₁ 2,29	10,23 abcd	4,83 c	2,93 i
S ₃ 4,79	8,13 efgh	4,00 cde	5,30 b
S ₄ 7,04	6,43 ij	3,40 def	6,23 a
F	22,28**	39,86**	34,02**
CV (%)	3,34	9,44	6,00

* (N₂ = 26,0; P₂ = 3,0; K₂ = 11,0; Ca₂ = 5,0; Mg₂ = 3,0; S₂ = 3,29 mmol L⁻¹)

**significativo pelo teste F, $\alpha=0,0001$; ⁽¹⁾ dados transformados = $\log_{10}(x)$; Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$)

Apesar de todas estas variações significativas de teores, os referidos valores para cada nutriente encontram-se dentro da faixa de teor sugerida por Higashi e Gonçalves (2001), exceto para os teores de enxofre (2-2,5 g kg⁻¹) e de zinco (40-80 mg kg⁻¹) que ficaram acima e abaixo, respectivamente, da faixa estabelecida.

Teores de nitrogênio mais elevados e próximos ao valor de N₄ encontrados em brotações cultivadas nos meios de cultura com menor concentração de cálcio (Ca₁) e enxofre (S₁) conforme observado na Tabela 14, provavelmente foram devidos ao fornecimento de N-NH₄⁺ e da redução de S-SO₄²⁻ com conseqüente aumento de N-NO₃⁻, respectivamente, vias as fontes fornecedoras de nutrientes necessárias para efetuar os ajustes iônicos em Ca₁ (Anexo 4) e S₁ (Anexo 6).

Tabela 16 - Médias dos teores de boro (B), cobre (Cu) e ferro (Fe) nas brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo

Tratamentos Mmol L ⁻¹	B	Cu mg kg ⁻¹	Fe ⁽¹⁾
JADS *	37,17 abcde	13,37 de	352,57 ab
N ₁ 17,30	36,23 abcdef	15,90 abcd	314,47 abcd
N ₃ 39,00	39,77 a	14,70 bcd	333,17 abc
N ₄ 58,50	38,20 abcd	15,10 abcd	287,77 abcd
P ₁ 2,00	39,50 ab	15,63 abcd	349,57 ab
P ₃ 4,50	33,93 abcdef	14,60 cde	295,10 abcd
P ₄ 6,75	39,13 abc	11,43 e	258,60 cde
K ₁ 7,30	36,97 abcde	16,53 abcd	380,87 a
K ₃ 16,50	29,03 abcdef	17,17 abc	320,43 abcd
K ₄ 24,75	30,13 abcdef	16,70 abc	372,60 ab
Ca ₁ 3,30	24,67 bcdef	16,23 abcd	322,73 abcd
Ca ₃ 7,50	22,87 ef	18,27 a	226,10 e
Ca ₄ 11,25	24,47 cdef	17,33 ab	218,93 e
Mg ₁ 2,00	23,53 def	15,33 abcd	287,97 abcd
Mg ₃ 4,50	24,97 abcdef	16,40 abcd	214,07 e
Mg ₄ 6,75	21,77 f	15,20 abcd	227,70 e
S ₁ 2,29	22,99 ef	16,90 abc	277,43 bcde
S ₃ 4,79	31,00 abcdef	3,93 f	249,93 cde
S ₄ 7,04	28,80 abcdef	2,93 f	239,87 de
F	5,57**	48,29**	10,82*
CV (%)	15,66	7,22	1,72

*(N₂ = 26,0; P₂ = 3,0; K₂ = 11,0; Ca₂ = 5,0; Mg₂ = 3,0; S₂ = 3,29 mmol L⁻¹)

* significativo pelo teste F, p = 0,001; ** significativo pelo teste F, p = 0,0001; ⁽¹⁾ dados transformados = log₁₀(x); Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (α=0,05)

2.3.4.1.2 Teor de fósforo e interações

Na Tabela 14, verifica-se que o maior teor de fósforo (9,93 g kg⁻¹) refere-se à concentração P₄, o qual não diferenciou significativamente do teor obtido em P₃. Entretanto, ambos os tratamentos diferenciaram dos demais tratamentos. Enquanto o menor teor (4,40 g kg⁻¹) encontrado na menor concentração fósforo (P₁) apresentou diferença significativa com relação aos demais tratamentos.

Exceto N₁, P₁, Ca₃ e Ca₄, os demais tratamentos apresentaram teores de fósforo na massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* acima da faixa (2-6 g kg⁻¹), aos 21 dias de cultivo, recomendada por Higashi e Gonçalves (2001). Resultados similares foram encontrados por Higashi (1996) cultivando clones híbridos de *Eucalyptus* e por Higashi e Gonçalves (2006) cultivando *Eucalyptus grandis*, ambos os estudos em meio de cultura JADS. Entretanto, teores de fósforo entre 2,28 a 3,32 g kg⁻¹ foram alcançados por Langer (2000) em um clone de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* e por Lima (2004) em clones de *Eucalyptus*

grandis x *Eucalyptus urophylla*, ambos os estudos também conduzidos em meio de cultura JADS. Enquanto Basso et al. (2003) obtiveram teor de fósforo equivalente a 3,84 g kg⁻¹ em brotações de um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* cultivado em meio de cultura GM. Considerando as diferenças nutricionais entre os meios de cultura GM e JADS (Tabela 1), com ênfase para o íon PO₄³⁻, JADS possui o dobro da concentração deste íon em relação ao GM e/ou variações na suplementação de reguladores de crescimento nos meios de cultura, pode-se inferir que os materiais genéticos utilizados nestes estudos diferem quanto à eficiência de utilização de fosfato.

Tabela 17 - Médias dos teores de manganês (Mn), zinco (Zn), cloro (Cl) e sódio (Na) nas brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo

Tratamentos mmol L ⁻¹	Mn	Zn mg kg ⁻¹	Cl ⁽¹⁾	Na
JADS *	112,63 abcde	36,17 gh	1500,00 def	3400,0 ab
N ₁ 17,30	115,20 abcd	36,90 efgh	2366,67 cde	3060,0 abc
N ₃ 39,00	116,77 abc	42,07 bcde	900,00 efgh	3145,0 abc
N ₄ 58,50	109,20 bcde	43,13 bcd	1433,33 def	3145,0 abc
P ₁ 2,00	123,87 ab	41,00 cdefg	2833,33 cd	3060,0 abc
P ₃ 4,50	92,57 fgh	36,43 fgh	1133,33 defg	3485,0 a
P ₄ 6,75	70,07 i	29,60 i	1366,67 def	3145,0 abc
K ₁ 7,30	117,97 ab	46,70 b	1033,33 efg	2720,0 bc
K ₃ 16,50	127,77 a	42,03 bcde	6533,33 b	2890,0 abc
K ₄ 24,75	115,00 abcd	41,77 bcdef	11366,67 a	2890,0 abc
Ca ₁ 3,30	99,00 cdefg	46,17 bc	300,00 gh	2890,0 abc
Ca ₃ 7,50	86,90 ghi	38,20 defg	4766,67 bc	2805,0 abc
Ca ₄ 11,25	95,53 efg	39,37 defg	2700,00 cd	2975,0 abc
Mg ₁ 2,00	76,60 hi	41,67 bcdef	333,33 fgh	2635,0 c
Mg ₃ 4,50	97,00 defg	36,97 efgh	100,00 h	2635,0 c
Mg ₄ 6,75	91,80 fgh	32,03 hi	1033,33 efg	2465,0 c
S ₁ 2,29	105,67 bcdef	40,27 defg	700,00 fgh	2975,0 abc
S ₃ 4,79	83,87 ghi	60,23 a	100,00 h	2975,0 abc
S ₄ 7,04	71,00 i	64,27 a	300,00 gh	3060,0 abc
F	25,75**	69,84**	48,09**	3,31*
CV (%)	5,96	4,15	17,20	8,13

* (N₂ = 26,0; P₂ = 3,0; K₂ = 11,0; Ca₂ = 5,0; Mg₂ = 3,0; S₂ = 3,29 mmol L⁻¹)

** significativo pelo teste F, p=0,001; ** significativo pelo teste F, p=0,0001; ⁽¹⁾ dados transformados = \sqrt{x} ; Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$)

Aumentos nas concentrações de fosfato nos meios de cultura proporcionaram elevações dos teores de fósforo nas brotações (Tabela 14). Em cultivo *in vitro*, respostas similares foram alcançadas por Elliott; Smith; Bridgen (1993) avaliando o efeito de fósforo entre 0 ≤ P ≤ 2,5 mmol

L⁻¹ em *Alstroemeria* e Kanashiro (2005) entre $0,15 \leq P \leq 2,5$ mmol L⁻¹ em *Aechmea blanchetiana*. Nos estudos conduzidos *in vitro* por Higashi (1996) com clones híbridos de *Eucalyptus* e Higashi e Gonçalves (2006) com *Eucalyptus grandis* foi possível constatar que a omissão seletiva de fosfato no meio de cultura JADS quando comparado ao completo reduz cerca de 72% e 80% do teor de fósforo nas brotações, respectivamente.

Adicionalmente, com a elevação da concentração de fosfato houve redução dos teores de cálcio (Tabela 15). Isto pode ser explicado por meio da modelagem feita pelo software GEOCHEM onde foi observada uma redução do Ca²⁺ livre e conseqüente aumento de Ca²⁺ ligado ao PO₄²⁻ (Tabela 6), espécie iônica insolúvel e não disponível às brotações. Kanashiro (2005) cultivando *Aechmea blanchetiana* em meio de cultura MS modificado em $0,15 \leq P \leq 2,5$ mmol L⁻¹ também verificou redução do teor de cálcio em função do aumento da concentração de fosfato.

A concentração mais elevada de fósforo (P₄) reduziu os teores de magnésio (Tabela 15), cobre e ferro (Tabela 16) contudo esses valores se encontram dentro da faixa de teores adequados: Mg (2-4 g kg⁻¹), Cu (8-15 mg kg⁻¹) e Fe (100-350 mg kg⁻¹) recomendada por Higashi e Gonçalves (2001). De acordo com Bear (1964), altos níveis de fósforo podem diminuir o teor de ferro no meio em função da formação de precipitados insolúveis. Isto está em concordância com a especiação iônica realizada via GEOCHEM, onde a estimativa indicou a redução de Fe²⁺ livre e aumento da espécie Fe²⁺ ligado ao PO₄³⁻ (Tabela 7). Ademais, segundo Malavolta; Vitti; Oliveira (1997) a absorção de fósforo é máxima na presença de magnésio, o qual exerce a função de carregador de fósforo onde o magnésio participa na ativação de ATPases da membrana envolvidas na absorção iônica.

Por outro lado, as reduções dos teores de manganês e zinco observadas nas maiores concentrações de fósforo foram significativas entre P₃ e P₄ e encontram-se abaixo da faixa adequada para teor de Mn (100-300 mg kg⁻¹) e Zn (40-80 mg kg⁻¹) sugerida por Higashi e Gonçalves (2001). Neste caso, a simulação estabelecida via GEOCHEM sugere que com a elevação da concentração de fósforo no meio de cultura houve redução do Mn²⁺ livre e aumento de Mn²⁺ ligado ao EDTA (Tabela 8) sendo esta espécie iônica absorvida mais lentamente pelas brotações. De acordo com Klein e Manos (1960) apud Diniz et al. (1999b), a disponibilidade do manganês pode ser afetada pela coprecipitação com sais de fosfato, como também, segundo Malavolta; Vitti; Oliveira (1997) por altas concentrações de potássio, cálcio, magnésio, cobre, zinco e sódio.

Adicionalmente, altos níveis de fósforo no meio causam diminuição da absorção de zinco onde o fósforo inibe não competitivamente a absorção de zinco e/ou o fósforo insolubiliza o zinco no xilema diminuindo o transporte para a parte aérea (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). Neste estudo, entretanto, a especiação iônica não constatou nas estimativas prováveis formações da espécie Zn^{2+} ligado ao PO_4^{2-} . Neste sentido Williams (1995) salienta que interações envolvendo micronutrientes são de difíceis interpretações, pois um excesso de manganês pode levar a uma deficiência de ferro, enquanto um excesso de ferro ou EDTA pode reduzir a absorção de zinco.

2.3.4.1.3 Teor de potássio e interações

Na Tabela 14, pode-se observar que os teores de potássio na massa seca nas brotações variaram de 20,60 a 49,23 g kg⁻¹ em função das concentrações de macronutrientes nos meios de cultura. O menor teor refere-se a menor concentração de potássio (K₁) enquanto o maior teor correspondeu à concentração K₄. Não houve diferenças significativas entre K₄ e K₃, como também entre K₃ e Ca₁, Ca₄, Mg₄ e S₁. Da mesma forma, o menor teor (K₁) não apresentou diferenças significativas em relação aos teores correspondentes às concentrações de nitrogênio, fósforo e S₄ caracterizando redução na absorção de potássio nestes tratamentos.

Verifica-se na Tabela 14 que brotações cultivadas em meios de cultura com as maiores concentrações de potássio (K₃ e K₄), enxofre (S₁ e S₃), cálcio e magnésio, exceto Ca₂ e Mg₂ (JADS) apresentaram teores de potássio, aos 21 dias de cultivo, acima ou próximo ao limite superior da faixa de teores de potássio (15-35 g kg⁻¹) recomendada por Higashi e Gonçalves (2001). Estudos conduzidos em meio de cultura JADS por Langer (2000) com clone de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, Lima (2004) com clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e Higashi e Gonçalves (2006) com *Eucalyptus grandis* e, por Basso et al. (2003) cultivando clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em meio de cultura GM, também encontraram valores para teor de potássio acima da faixa sugerida.

Os teores de potássio nas brotações aumentaram em função da elevação da concentração de potássio no meio de cultura estabelecendo diferença significativa entre as menores e as maiores concentrações (Tabela 14). Lima (2004) cultivando *in vitro* três clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* sob diferentes concentrações de potássio (1,37; 2,75; 5,5, 11,0 e

22,0 mmol L⁻¹) verificou aumento de teor de potássio nas brotações com a elevação da concentração. Este comportamento também foi observado no cultivo *in vitro* de oliveira entre os níveis de potássio $0 \leq K \leq 20$ mmol L⁻¹ (SARMIENTO et al., 1994), *Musa* sp. entre $5 \leq K \leq 30$ mmol L⁻¹ (ZAIDAN et al., 1999), *Gypsophila paniculata* entre $0 \leq K \leq 80$ mmol L⁻¹ (GRIBBLE et al., 2002) e *Aechmea blanchetiana* entre $2,5 \leq K \leq 40$ mmol L⁻¹ (KANASHIRO, 2005). Enquanto a omissão seletiva de potássio no meio de cultura JADS quando comparado ao completo reduziu cerca de 55% e 70% do teor de potássio nas brotações em clones híbridos de *Eucalyptus* (HIGASHI, 1996) e em *Eucalyptus grandis*, respectivamente.

Entre as concentrações de potássio (Tabela 14), K₂ (JADS) apresentou menor teor de cobre o qual não diferenciou do valor encontrado em K₁ (Tabela 16), como também menor teor de zinco (Tabela 17). Neste caso, para K₂ (JADS), o teor de cobre encontra-se em concordância com a faixa (8-15 mg kg⁻¹) proposta por Higashi e Gonçalves (2001) enquanto para as demais concentrações de potássio os teores de cobre encontram-se acima da faixa; para o teor de zinco, observou-se o inverso, conforme a faixa (40-80 mg kg⁻¹) recomendada pelos mesmos autores.

Independente da concentração de potássio, todos os teores de fósforo (Tabela 14) e de enxofre (Tabela 15) ficaram acima das faixas (2-6 g kg⁻¹ P e 2-2,5 g kg⁻¹ S) recomendadas por Higashi e Gonçalves (2001). Provavelmente, concentrações mais elevadas de PO₄³⁻ e SO₄²⁻ existentes na formulação do meio de cultura JADS (Tabela 1) tenham favorecido maior absorção destes nutrientes. Concentração de Mg²⁺ e Fe²⁺ também são maiores JADS, entretanto apenas em K₃, o teor de magnésio (Tabela 15) ficou um pouco acima da faixa recomendada (2-4 g kg⁻¹), como também detectou-se o único teor de ferro (Tabela 16) dentro da faixa (100 a 350 mg kg⁻¹) recomendada segundo Higashi e Gonçalves (2001).

Aumento significativo dos teores de cloro (Tabela 17) nas duas maiores concentrações de potássio explica-se pelo uso de KCl, como fonte de nutriente, para o ajuste iônico dos meios de cultura nas concentrações K₃ e K₄ (Anexo 3).

2.3.4.1.4 Teor de cálcio e interações

Observa-se na Tabela 15 que o menor teor (5,93 g kg⁻¹) foi encontrado na menor concentração de cálcio (Ca₁) enquanto o maior teor (12,30 g kg⁻¹) refere-se à concentração de cálcio (Ca₃). Entretanto, não houve diferenças significativas entre o maior teor (Ca₃) e os teores

obtidos em N₁, P₁, K₁, K₃, Ca₃ e S₁. Da mesma forma, o menor teor (Ca₁) não apresentou diferenças significativas com relação aos teores correspondentes em N₄, P₄, Ca₄ e S₄.

Segundo Higashi e Gonçalves (2001) a faixa de teores adequados de cálcio para o cultivo *in vitro* de brotações de *Eucalyptus*, aos 21 dias de cultivo, varia entre 7,5 a 15 g kg⁻¹. Desta forma, os teores de cálcio obtidos na massa seca das brotações de *Eucalyptus grandis* nos diferentes tratamentos encontram-se dentro da faixa prevista, exceto N₄, P₄, Ca₁ e S₄ que encontram-se abaixo (Tabela 15). Langer (2002) multiplicando *in vitro* *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em meio JADS, correspondente ao nível de Ca₂ deste estudo, também obteve teor de cálcio dentro da faixa indicada. Enquanto Basso et al. (2003) cultivando clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em meio de cultura GM verificaram valor (2,48 g kg⁻¹ Ca) muito abaixo da faixa de teores recomendada. Além das diferenças entre os materiais genéticos destes estudos, a concentração de cálcio existente no meio de cultura GM é cinco vezes menor que a disponível em JADS (Tabela 1), contribuindo para menor disponibilidade desse elemento no meio de cultura.

O efeito das concentrações de cálcio sobre o teor de cálcio nas brotações foi linear até a concentração de 7,5 mmol L⁻¹ (Ca₃). Na maior concentração de cálcio (Ca₄) houve redução do teor de cálcio em torno de 24% com relação a Ca₃ (Tabela 15). Langer (2000) avaliando a multiplicação de brotações *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* *in vitro*, aos 21 dias de cultivo, em meio JADS suplementado com 0,0 ≤ Ca ≤ 15,0 mmol L⁻¹ verificou redução do teor de cálcio a partir de 5,0 mmol L⁻¹. Para *Aechmea blanchetiana*, teor de cálcio nas folhas aumentou com a elevação da concentração de cálcio (1,5 ≤ Ca ≤ 12,0 mmol L⁻¹) em meio de cultura MS modificado segundo modelo quadrático, alcançando o ponto máximo na concentração em 12 mmol L⁻¹ (KANASHIRO, 2005). Enquanto Gribble et al. (2002) observaram que o teor de cálcio aumentou em plântulas de *Gypsophila paniculata* cultivadas em meio de cultura quando a concentração de cálcio foi crescente (0 ≤ Ca ≤ 20 mmol L⁻¹). Da mesma forma, para *Vriesea* sp. foram observadas elevações do teor de cálcio nas folhas em função do aumento da concentração de cálcio (1,5 ≤ Ca ≤ 12 mmol L⁻¹) nos meios de culturas. Por outro lado, a omissão seletiva de cálcio em meio de cultura JADS quando comparado ao completo, reduziu em torno de 76% o teor de cálcio em brotações de clones híbridos de *Eucalyptus* (HIGASHI, 1996) e de 86% o teor de cálcio em *Eucalyptus grandis* (HIGASHI; GONÇALVES, 2006) evidenciando a importância do elemento no crescimento e diferenciação de brotações de *Eucalyptus*.

Aumentos nas concentrações de cálcio nos meios de cultura proporcionaram reduções dos teores de fósforo nas brotações (Tabela 14). Conforme a simulação feita pelo software GEOCHEM, a redução de teor de fósforo deveu-se principalmente pela formação de PO_4^{2-} ligado ao Ca^{2+} (Tabela 10), espécie iônica insolúvel e indisponível às brotações. Conseqüentemente, isto também contribui para explicar a ocorrência do maior teor de fósforo em Ca_1 , o qual diferenciou dos demais tratamentos como também, o deixou acima da faixa adequada para teor de fósforo ($2-6 \text{ g kg}^{-1}$) definida por Higashi e Gonçalves (2001); da mesma forma que explica, em Ca_3 e Ca_4 , a ocorrência de teores de fósforo menores e em conformidade com a faixa estabelecida pelos mesmos autores.

Adicionalmente, maiores teores de nitrogênio, fósforo e potássio (Tabela 14) observados em Ca_1 relacionam-se à menor produção de massa seca que resultou na concentração do elemento em menor unidade de massa. Em Ca_1 também foi observado maior teor de zinco e menor teor de cloro (Tabela 17) os quais diferenciaram dos demais tratamentos. Marschner (1995) destaca que o aumento da concentração de um nutriente específico pode estimular o crescimento de células e tecidos, mas ao mesmo tempo pode levar a processos de deficiência devido aos efeitos de diluição.

As concentrações Ca_3 e Ca_4 influenciaram significativamente as reduções dos teores de ferro (Tabela 16) e a elevação dos teores de cloro (Tabela 17). De acordo com Malavolta; Vitti; Oliveira (1997), a absorção de ferro pode ser influenciada por outros cátions como potássio, cálcio e magnésio, bem como cobre, zinco e manganês, por inibição competitiva. A redução do teor de ferro em Ca_3 pode estar relacionada também ao pH do meio de cultura que permaneceu mais elevado durante o período de cultivo (Tabela 11). Segundo Bear (1964), a elevação de uma unidade no pH faz com que a concentração do ferro diminua 1000 vezes. Enquanto, a utilização de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como fonte de nutriente, para o ajuste iônico dos meios de cultura nas concentrações Ca_3 e Ca_4 (Anexo 4) disponibilizou mais cloro nestes meios, contribuindo assim, para o aumento do teor de cloro na massa seca das brotações.

Em todas as concentrações de cálcio, os teores de enxofre (Tabela 15) encontrados ficaram acima da faixa ($2-2,5 \text{ g kg}^{-1}$) estabelecida por Higashi e Gonçalves (2001); o mesmo foi observado para os teores de potássio (Tabela 14), exceto para Ca_2 (JADS) onde a faixa de teores corresponde a $15-30 \text{ g kg}^{-1} \text{ K}$ de acordo com os mesmos autores. Entre os micronutrientes, os teores de boro (Tabela 16) e manganês, exceto na concentração Ca_2 (Tabela 17) e em teores de

zinco, exceto em Ca₁ (Tabela 17), todos os teores encontram-se abaixo das faixas (25-50 mg kg⁻¹ B; 100-300 mg kg⁻¹ Mn; 40-80 mg kg⁻¹ Zn) recomendadas por Higashi e Gonçalves (2001). Enquanto, os teores de cobre, exceto em Ca₂ (JADS) (Tabela 16), encontram-se acima da faixa (8-15 mg kg⁻¹) recomendada.

Muitos estudos têm demonstrado que a redução dos teores de boro pode estar relacionada ao aumento no suplemento de cálcio (TANAKA, 1967; SOTIROPOULOS; THERIOS; DIMASSI, 1999); outros enfatizam que as interações cálcio e boro parecem ocorrer ao nível de membrana e parede celular (YAMAUCHI; HARA; SONODA, 1986; TEASDALE; RICHARDS, 1990). Neste estudo, entretanto, o boro não foi afetado pelo aumento de cálcio ($\alpha=0,05$).

2.3.4.1.5 Teor de magnésio e interações

Na Tabela 15, verifica-se que o maior teor (9,13 g kg⁻¹) refere-se à concentração de magnésio (Mg₄), o qual diferenciou significativamente dos demais tratamentos. Enquanto, o menor teor (2,50 g kg⁻¹) obtido na menor concentração de magnésio (Mg₁) não apresentou diferença significativa com relação aos teores encontrados nas concentrações N₄, P₄, Ca₁ e S₄.

Exceto para as maiores concentrações de magnésio (Mg₃ e Mg₄), os teores de magnésio encontrados nos demais tratamentos (Tabela 15) estão em concordância ou muito próximos ao limite superior da faixa de teores (2-4 g kg⁻¹) para magnésio proposta por Higashi e Gonçalves (2001). Estudos conduzidos em meio de cultura JADS com *Eucalyptus grandis* (HIGASHI; GONÇALVES, 2006) e clones híbridos de *Eucalyptus in vitro* (HIGASHI, 1996), também obtiveram respostas similares para teores de magnésio. Enquanto para clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (LANGER, 2000) e *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (LIMA, 2004), os valores alcançados ficaram acima da faixa e, para *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* cultivado em meio de cultura GM, o teor de magnésio ficou abaixo faixa (BASSO et al, 2003). Além das diferenças entre genótipos, concentração mais elevada deste elemento no meio de cultura JADS do que em GM (Tabela 1) podem estar contribuindo para estas respostas.

O aumento da concentração de magnésio promoveu elevações significativas nos teores de magnésio (Tabela 15). Por outro lado, a omissão seletiva de magnésio em meio de cultura JADS quando comparado ao completo, reduziu em 81% o teor de magnésio em brotações de

clones híbridos de *Eucalyptus* (HIGASHI, 1996) e em 87% o teor de magnésio em *Eucalyptus grandis* (HIGASHI; GONÇALVES, 2006).

Entre as concentrações de magnésio, todos os teores de fósforo, potássio (exceto K_2 - JADS) (Tabela 14) e enxofre (Tabela 15) encontram-se acima das faixas correspondentes, P (2-6 $g\ kg^{-1}$); K (15-35 $g\ kg^{-1}$) e S (2-2,5 $g\ kg^{-1}$) indicadas por Higashi e Gonçalves (2001). Maior teor de enxofre encontrado em Mg_1 (Tabela 15) foi devido a aplicação de SO_4^{2-} (5,29 $mmol\ L^{-1}$) do que a estabelecida no meio de cultura JADS (3,29 $mmol\ L^{-1}$) (Anexo 5).

Os teores de ferro (Tabela 16) reduziram-se sensivelmente nas concentrações Mg_3 e Mg_4 . Adicionalmente, estes meios apresentaram elevação do pH a partir do 7º dia de cultivo chegando a valores maiores que 6,0 (Tabela 11) aos 21 dias de cultivo, o que pode ter influenciado na redução da absorção de ferro (BEAR, 1964). Diniz et al. (1999b) verificaram que maior absorção de ferro no cultivo *in vitro* de bananeira pode ter sido causada pelo pH do meio, o qual permaneceu em torno de 4,0 do 5º dia até 60 dias de cultivo. Veliky; Rose; Zink (1976) cultivando células em suspensão de *Ipomoea* sp. observaram que a absorção de magnésio se elevou com o aumento da suplementação deste elemento ao meio de cultura e com o aumento do pH do meio de cultura. Segundo Marschner (1995) a absorção de magnésio para o crescimento de plantas em condições de campo também é influenciada pelo pH e disponibilidade de cálcio no solo.

A menor concentração de magnésio (Mg_1) pode ter favorecido a absorção de zinco (Tabela 17) a qual apresenta teor de zinco dentro da faixa (40-80 $mg\ kg^{-1}$) recomendada por Higashi e Gonçalves (2001) embora não diferindo do teor encontrado em Mg_3 sendo este menor e encontra-se fora da faixa, da mesma forma que os teores obtidos em Mg_2 (JADS) e Mg_4 .

Em Mg_2 (JADS), outras interações iônicas devem ter influenciado para a redução do teor de cobre (Tabela 16) e elevações dos teores boro (Tabela 16) e manganês (Tabela 17) onde os teores destes elementos encontram-se dentro das faixas Cu (8-15 $mg\ kg^{-1}$), B (25-80 $mg\ kg^{-1}$) e Mn (100-300 $mg\ kg^{-1}$) definidas por Higashi e Gonçalves (2001); nas demais concentrações, o teor de cobre ficou acima da faixa, enquanto boro e manganês, abaixo.

Também em Mg_2 (JADS) observou-se efeito significativo sobre as demais concentrações de magnésio quanto ao teor de sódio (Tabela 17). Segundo Malavolta; Vitti; Oliveira (1997), o sódio favorece a absorção de potássio principalmente quando este está em

baixa concentração, porém em JADS, o teor de potássio encontra-se na faixa recomendada por Higashi e Gonçalves (2001).

Teores de sódio encontrados em brotações de *Eucalyptus in vitro* apresentam valores divergentes. Aos 21 dias de cultivo, em meio de cultura JADS, Higashi e Gonçalves (2006) e Higashi (1996) obtiveram teor médio de sódio igual a 712,0 mg kg⁻¹ em brotações de *Eucalyptus grandis* e de 1666,6 mg kg⁻¹ em brotações de clones híbridos de *Eucalyptus*; aos 20 dias de cultivo, em meio de cultura GM, Basso et al. (2003) verificaram teor de sódio igual a 1679,0 mg kg⁻¹ em brotações de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e aos 28 dias de cultivo, em meio de cultura SEM e MEM, os teores de sódio corresponderam a 2200,0 mg kg⁻¹ e 1500,0 mg kg⁻¹, respectivamente, em brotações de clone híbrido de *Eucalyptus* (GRIBBLE et al., 2002).

2.3.4.1.6 Teor de enxofre e interações

Observa-se na Tabela 15 que o maior teor (6,23 g kg⁻¹) obtido na maior concentração enxofre (S₄) diferenciou significativamente dos demais tratamentos. Enquanto o menor teor (2,93 g kg⁻¹) alcançado na menor concentração de enxofre (S₁) não apresentou diferença significativa com relação aos teores encontrados no meio de cultura JADS e nas concentrações N₁, P₃, P₄ e Mg₄.

De acordo com Higashi e Gonçalves (2001) a faixa de teores adequados para enxofre corresponde a 2-2,5 g kg⁻¹ em brotações de *Eucalyptus* cultivados *in vitro*, aos 21 dias de cultivo. Higashi (1996) e Higashi e Gonçalves (2006) demonstraram que a omissão seletiva de enxofre no meio de cultura JADS quando comparado ao completo, reduziu aproximadamente 83% do teor de enxofre em brotações de clones híbridos de *Eucalyptus* e 63% do teor de enxofre em brotações em *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro*, respectivamente.

Adicionalmente, entre as concentrações de enxofre houve aumentos dos teores com a elevação das concentrações de enxofre, sendo estes não significativos entre S₁ e S₂ (JADS) e significativos entre S₃ e S₄. Tal resposta sugere que o meio de cultura JADS suplementado a partir de 2,0 mmol L⁻¹ de enxofre já tem potencial para obter teores de enxofre de acordo com a faixa recomendada. Alguns estudos conduzidos com *Eucalyptus in vitro*, também apresentaram teores de enxofre acima da faixa recomendada tanto em meio JADS, aos 21 dias de cultivo (HIGASHI, 1996; LANGER, 2000; LIMA, 2004; HIGASHI; GONÇALVES, 2006) quanto nos

meios de cultura SEM e MEM, aos 28 dias de cultivo (GRIBBLE et al., 2002). Somente utilizando o meio de cultura GM, onde a suplementação de enxofre corresponde a $1,12 \text{ mmol L}^{-1}$, foi possível encontrar valores para teores de enxofre correspondentes à faixa adequada, em avaliações realizadas a cada 4 dias, durante 28 dias de cultivo (BASSO et al., 2003).

Segundo Diniz et al. (1999a), maior teor de enxofre verificado em tecidos de *Musa* sp, sendo estes maiores durante os primeiros 20 dias de cultivo, deveu-se provavelmente a sua baixa mobilidade dentro da planta e acúmulos de compostos orgânicos que contém enxofre (proteínas e aminoácidos), como também pela maior concentração deste nutriente no meio de cultura durante os primeiros dias de cultivo, favorecendo a absorção e sugeriram que a concentração de enxofre ($1,7 \text{ mmol L}^{-1}$) no meio de cultura utilizado (MS) foi suficiente para manter o cultivo por 60 dias.

Nas concentrações de enxofre, todos os teores de fósforo (Tabela 14) ficaram acima da faixa ($2-6 \text{ g kg}^{-1}$) estabelecida por Higashi e Gonçalves (2001).

Com a elevação da concentração de enxofre houve significativa redução do teor de cálcio (Tabela 15). Na maior concentração de enxofre (S_4), o teor de cálcio ficou abaixo da faixa adequada ($7,5-15 \text{ g kg}^{-1}$) recomendada por Higashi e Gonçalves (2001). Com a redução do Ca^{2+} livre, provavelmente tenha ocorrido formação de Ca^{2+} ligado ao SO_4^{2-} (espécie iônica insolúvel e não disponível às brotações) de acordo com a simulação da especiação iônica realizada pelo software GEOCHEM (Tabela 6).

As concentrações de enxofre reduziram significativamente os teores de cobre (Tabela 16) onde em S_3 e S_4 , o declínio foi mais acentuado e não significativo entre eles, levando a valores bem abaixo da faixa adequada ($8-15 \text{ mg g}^{-1}$) recomendada por Higashi e Gonçalves (2001). Enquanto para teores de zinco (Tabela 17) ocorreu o inverso, observando-se os maiores teores em S_3 e S_4 , porém com valores compatíveis à faixa adequada ($40-80 \text{ mg g}^{-1}$). Segundo Malavolta; Vitti; Oliveira (1997), o cálcio em baixa concentração favorece a absorção de zinco, sendo este efeito mais acentuado pelo magnésio. Por outro lado, e enxofre em excesso na planta pode se acumular na forma de aminoácidos, imobilizando nitrogênio; também se acumular na forma reduzida S_2^- , podendo assim, imobilizar micronutrientes. Neste caso, o cobre poderia ser um destes micronutrientes a ser imobilizado por questões de afinidade sendo um dos micronutrientes com maior força para quelar (Comunicação pessoal¹).

¹ MALAVOLTA, E. Centro de Energia Nuclear na Agricultura/Universidade de São Paulo.

Os teores de manganês reduziram significativamente para valores abaixo da faixa adequada (100-300 mg g⁻¹) conforme Higashi e Gonçalves (2001) em S₃ e S₄.

2.3.4.2 Teores de micronutrientes

2.3.4.2.1 Teor de boro

Na Tabela 16, observa-se que os teores de boro nas brotações variaram de 21,77 a 39,77 mg kg⁻¹ em função das concentrações de macronutrientes nos meios de cultura. Verifica-se que os teores encontrados em todas as concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio, como também em Mg₃, S₃ e S₄ não diferenciam significativamente do maior teor de boro obtido em N₃. Enquanto, o menor teor de boro observado em Mg₄ não apresentou diferença significativa quando comparado aos teores relacionados às concentrações de cálcio, magnésio e enxofre, exceto o nível 2 (JADS) em cada um destes macronutrientes, como também de N₁, P₃, K₃ e K₄.

Considerando a faixa de teores adequados de boro (25-50 mg kg⁻¹) na massa seca de brotações de *Eucalyptus* cultivadas *in vitro*, aos 21 dias de cultivo, segundo Higashi e Gonçalves (2001), os valores obtidos somente para concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio, S₃ e S₄ estão em concordância com a recomendação, enquanto os teores de boro relativo às concentrações de cálcio e magnésio, exceto o nível 2 (JADS) para ambos os elementos e S₁, encontram-se abaixo da faixa recomendada (Tabela 16). Estudos conduzidos por Langer (2000) com *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* e Lima (2004) com dois clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, em meio de cultura JADS, aos 21 dias de cultivo, também obtiveram teores de boro de acordo com a faixa proposta. Enquanto, Higashi e Gonçalves (2006) cultivando *Eucalyptus grandis* e Lima (2004) cultivando o clone (A) de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, ambos os estudos conduzidos em meio de cultura JADS e, Basso et al. (2003) cultivando *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em meio de cultura GM, verificaram valores superiores com relação aqueles recomendados como adequados.

2.3.4.2.2 Teor de cobre

Os teores de cobre nas brotações variaram de 2,93 a 18,27 mg kg⁻¹ em função das concentrações de macronutrientes nos meios de cultura (Tabela 16). O maior valor deste intervalo foi encontrado na concentração Ca₃, o qual não apresentou diferença significativa para os valores

obtidos nas concentrações de potássio, cálcio, magnésio, exceto para o nível 2 (JADS) correspondente a cada um destes macronutrientes; também não diferenciou significativamente para N₁, N₄, P₁ e S₁. Os menores teores obtidos em S₄ e S₃ não diferenciaram entre si, mas ambos diferenciaram significativamente com relação aos teores de cobre dos demais tratamentos. O valor médio dos menores teores representa uma redução de cobre equivalente a 81,2% com relação ao maior valor encontrado em Ca₃, sugerindo que as maiores concentrações enxofre testadas favoreceram o bloqueio do mecanismo de absorção de cobre.

De acordo com Higashi e Gonçalves (2001), a faixa de teores adequados de cobre para o cultivo *in vitro* de brotações de *Eucalyptus*, aos 21 dias de cultivo, varia entre 8-15 mg kg⁻¹. Desta forma, os teores de cobre encontrados nas concentrações de potássio, cálcio e magnésio, exceto o nível 2 (JADS) destes tratamentos, e N₁, N₄, P₁ e S₁ encontram-se acima da faixa proposta, enquanto em S₃ e S₄, estão bem abaixo do proposto e somente JADS, N₃, P₃ e P₄ encontram-se em concordância à faixa (Tabela 16). Langer (2000) e Lima (2004) multiplicando *in vitro* *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* e dois clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, respectivamente, em meio de cultura JADS, aos 21 dias de cultivo, alcançaram teores de cobre de acordo com a faixa proposta. Enquanto, em meio de cultura JADS, Higashi (1996) cultivando clones de híbridos de *Eucalyptus*, Lima (2004) multiplicando o clone (B) de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e Higashi e Gonçalves (2006) cultivando *Eucalyptus grandis* obtiveram valores de teores de cobre superiores a faixa proposta. Basso et al. (2003) multiplicando *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, em meio de cultura GM, verificaram valor inferior à faixa recomendada.

2.3.4.2.3 Teor de ferro

Verifica-se na Tabela 16 que os teores de ferro nas brotações variaram de 214,07 a 380,87 mg kg⁻¹ em função das concentrações de macronutrientes nos meios de cultura. O maior teor obtido na menor concentração de potássio (K₁) não diferenciou significativamente dos teores alcançados nas concentrações de nitrogênio, potássio, fósforo (exceto P₄), Ca₁ e Mg₁. Enquanto, o menor teor (214,07 mg kg⁻¹) alcançado na concentração Mg₃ não apresentou diferença significativa com relação aos teores encontrados em Mg₄, Ca₃, Ca₄, P₄ e concentrações de enxofre, exceto S₂ (JADS).

Conforme a faixa de teores adequados para ferro (100-350 mg kg⁻¹) na massa seca de brotações de *Eucalyptus* cultivadas *in vitro*, aos 21 dias de cultivo, sugerida por Higashi e Gonçalves (2001), os valores obtidos nas concentrações de nitrogênio, fósforo, cálcio, magnésio e enxofre, exceto o nível 2 (JADS) destes tratamentos, e K₃ estão em concordância com a faixa recomendada. Valores acima desta faixa correspondem ao JADS, K₁ e K₄ (Tabela 16). Langer (2000) e Lima (2004), cultivando *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* e dois clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, respectivamente, em meio de cultura JADS, aos 21 dias de cultivo, alcançaram teores de ferro de acordo com a faixa proposta. Enquanto, em meio de cultura JADS, Higashi (1996) multiplicando clones de híbridos de *Eucalyptus*, Lima (2004) multiplicando o clone (B) de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, Higashi e Gonçalves (2006) cultivando *Eucalyptus grandis* e, em meio de cultura GM, Basso et al. (2003) cultivando *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* verificaram valores superiores à faixa recomendada.

2.3.4.10 Teor de manganês

Na Tabela 17, pode-se observar que os teores de manganês nas brotações variaram de 70,07 a 127,77 mg kg⁻¹ em função das concentrações de macronutrientes nos meios de cultura. O maior valor deste intervalo foi encontrado na concentração K₃, o qual não apresentou diferença significativa para os valores obtidos nas concentrações de potássio, nitrogênio (exceto para N₄), e P₁. O menor teor alcançado na concentração P₄ não mostrou diferença significativa para os teores obtidos em Ca₃, Mg₁, S₃ e S₄. Os teores de manganês nas brotações diminuíram com o aumento das concentrações de fósforo, não havendo diferença significativa apenas entre os teores obtidos em P₁ e P₂ (JADS).

Considerando a faixa de teores adequados de manganês (100-300 mg kg⁻¹) na massa seca de brotações de *Eucalyptus* cultivadas *in vitro*, aos 21 dias de cultivo, segundo Higashi e Gonçalves (2001), os valores obtidos somente para concentrações de nitrogênio, potássio, P₁ e S₁ estão em concordância com a recomendação, enquanto os teores de manganês encontrados nas concentrações de cálcio e magnésio, exceto o nível 2 (JADS) para ambos os elementos, S₃ e S₄ encontram-se abaixo da faixa recomendada (Tabela 17). Estudos conduzidos em meio de cultura JADS cultivando durante 21 dias clones de híbridos de *Eucalyptus* (HIGASHI, 1996; LANGER, 2000; LIMA, 2004) e *Eucalyptus grandis* (HIGASHI; GONÇALVES, 2006) obtiveram teores de manganês de acordo com a faixa recomendada; enquanto Basso et al. (2003) cultivando

Eucalyptus grandis x *Eucalyptus urophylla* em meio de cultura GM obtiveram teor de manganês abaixo da faixa considerada como adequada.

2.3.4.2.4 Teor de zinco

Verifica-se na Tabela 17 que os teores de zinco nas brotações variaram de 29,60 a 64,27 mg kg⁻¹ em função das concentrações de macronutrientes nos meios de cultura. O valor máximo deste intervalo foi encontrado na concentração S₄, o qual não diferenciou significativamente de S₃. Enquanto, o menor teor de zinco obtido em P₄ (29,60 mg kg⁻¹) não apresentou diferença significativa com relação ao teor encontrado em Mg₄. O valor médio dos maiores teores médios de zinco obtidos em S₃ e S₄ representa um aumento de 52,5% de zinco com relação ao menor teor obtido em P₄, sugerindo que as maiores concentrações de enxofre favorecem a absorção de zinco ou que algum mecanismo fisiológico foi boqueado contribuindo para o acúmulo de zinco e a limitação da absorção de cobre.

De acordo com Higashi e Gonçalves (2001), a faixa de teores adequados de zinco para o cultivo *in vitro* de brotações de *Eucalyptus*, aos 21 dias de cultivo, varia entre 40-80 mg kg⁻¹. Assim, os teores de zinco encontrados nas concentrações de fósforo, cálcio e magnésio, exceto o nível 1 destes macronutrientes e N₁ encontram-se abaixo da faixa proposta, enquanto para os demais tratamentos houve concordância com a faixa proposta (Tabela 17). Lima (2004) e Higashi e Gonçalves (2006) cultivando clones híbridos de *Eucalyptus* em meio de cultura JADS e Basso et al. (2003) multiplicando um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, em meio de cultura GM obtiveram teores de zinco de acordo com a faixa proposta. Enquanto, em meio de cultura JADS, Higashi (1996) cultivando clones de híbridos de *Eucalyptus* obteve teores de zinco superiores com relação à faixa recomendada e, teores inferiores foram obtidos por Lima (2004) multiplicando o clone (C) de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, como também no estudo conduzido por Langer (2000) cultivando *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

2.3.4.2.5 Teor de cloro

Observa-se na Tabela 17 que os teores de cloro nas brotações variaram de 100,0 a 11.366,67 mg kg⁻¹ em função das concentrações de macronutrientes nos meios de cultura. O maior valor deste intervalo refere-se à concentração K₄, o qual diferenciou significativamente dos

demais tratamentos. Enquanto, o menor teor de cloro ($100,0 \text{ mg kg}^{-1}$) foi obtido nas concentrações Mg_3 e S_3 , respectivamente, o qual não apresentou diferença significativa em relação às concentrações obtidas em Ca_1 , Mg_1 , S_1 , S_3 e S_4 .

Foram observados aumentos significativos para os teores de cloro, com as elevações das concentrações de potássio e de cálcio, exceto para o nível Ca_4 , o que pode ser justificado pelo uso de fontes de potássio (Anexo 3) e de cálcio (Anexo 4) para o ajuste iônico nas concentrações mais elevadas destes macronutrientes. Na maior concentração de cálcio (Ca_4), o ajuste iônico estabelecido com $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($6,25 \text{ mmol L}^{-1}$) reduziu a absorção de cálcio (Tabela 17) tanto quanto a de cloro quando comparado aos teores destes elementos em Ca_3 .

2.3.4.2.6 Teor de sódio

Na Tabela 17, verifica-se que os teores de sódio nas brotações variaram de 2.465,0 e 3.485,0 mg kg^{-1} obtidos nas concentrações de magnésio (Mg_4) e fósforo (P_3), respectivamente, em função das concentrações de macronutrientes nos meios de cultura. O maior teor de sódio (P_3) não diferenciou significativamente dos teores obtidos nas concentrações de nitrogênio, fósforo, cálcio, enxofre e potássio (exceto para K_1) e de magnésio (exceto Mg_2 -JADS). Adicionalmente, menor teor de sódio (Mg_4) não estabeleceu diferença significativa para os teores de sódio encontrados nas diferentes concentrações de macronutrientes, exceto para o nível 2 (JADS) correspondente a cada macronutriente.

Não existe recomendação para teores de sódio em brotações de *Eucalyptus* cultivadas *in vitro*. Alguns estudos conduzidos com *Eucalyptus*, onde foi avaliado o teor de sódio nas brotações cultivadas *in vitro* apresentaram valores entre 712,0 a 2200,0 mg kg^{-1} (Tabela 3). Neste estudo, os valores encontrados em todos os tratamentos encontram-se acima deste intervalo. Entretanto, para o crescimento de *Eucalyptus grandis* na África do Sul, Herbert (1996) recomenda como teor mínimo (1100 mg kg^{-1}), adequado (3200 mg kg^{-1}) e máximo (4600 mg kg^{-1}).

2.3.5 Teores bioquímicos nas brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo

Os resultados das análises de variância quanto à significância do teste de F e respectivos coeficientes de variação, bem como os resultados do teste de comparação de médias para os teores de carboidratos não-estruturais solúveis totais, proteínas solúveis totais e prolina obtidos em brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes, aos em 21 dias de cultivo, encontram-se na Tabela 18.

2.3.5.1 Teor de carboidratos não-estruturais solúveis totais

Observa-se na Tabela 18 que os teores de carboidratos não-estruturais solúveis totais nas brotações variaram de 5,50 a 14,90 mg g⁻¹ de massa fresca em função das concentrações de macronutrientes nos meios de cultura. Este intervalo corresponde a uma variação de 63,1% em relação ao maior teor de carboidratos. O menor teor foi encontrado na maior concentração de nitrogênio (N₄) enquanto o teor mais elevado refere-se a maior concentração de enxofre (S₄). Entretanto, não houve diferenças significativas entre o maior teor (S₄) e os teores obtidos em S₃, Mg₃, Mg₁ e Ca₃. Da mesma forma, o menor teor (N₄) não apresentou diferença significativa com relação aos teores correspondentes às concentrações N₃ e K₃.

Os teores de carboidratos não-estruturais solúveis totais nas brotações diminuíram entre as concentrações de nitrogênio N₁ e N₃. Foi observada similaridade de resposta entre as concentrações de potássio. Verificou-se menor variação de teores de carboidratos não-estruturais solúveis totais nas brotações entre as concentrações de fósforo, as quais não diferenciaram significativamente entre si.

Os teores de carboidratos não-estruturais solúveis totais em brotações de *Eucalyptus grandis* variaram em função da concentração do macronutriente. Nota-se que as variações apresentaram relação com o crescimento alcançado aos 21 dias de cultivo. Os teores de carboidratos não-estruturais solúveis totais equivalentes aos tratamentos com fósforo não diferenciaram e mostraram pouca variação para o crescimento das brotações. Enquanto, para enxofre (S₃ e S₄), teores mais elevados correspondem em maiores acúmulos de biomassa. Isso sugere que as características do enxofre, como constituintes de vários compostos orgânicos

essenciais ao metabolismo celular versus a concentração de enxofre utilizada propiciem tanto a obtenção de maior teor de carboidratos quanto maior acúmulo de biomassa.

Neste estudo, o teor de carboidratos não-estruturais solúveis totais encontrados em meio de cultura JADS foi similar ao teor (8 mg g^{-1} matéria fresca) alcançado por Higashi e Gonçalves (2006) em brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas em JADS, aos 21 dias de cultivo. Stefanuto (2002) e Cantarelli (2002) utilizando mesmo meio de cultura, espécie e tempo de cultivo observaram teores de carboidratos não-estruturais solúveis totais correspondentes a $7,0 \text{ mg g}^{-1}$ matéria fresca e $5,8 \text{ mg g}^{-1}$ matéria fresca, respectivamente.

Tabela 18 - Médias dos teores carboidratos não-estruturais solúveis totais, proteínas solúveis totais e prolina nas brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo

Tratamentos mmol L	Carboidratos não-estruturais solúveis totais ⁽¹⁾ (mg g^{-1} de massa fresca)	Proteínas solúveis totais (mg g^{-1} de massa fresca) ⁽²⁾	Prolina ⁽¹⁾ ($\mu\text{g g}^{-1}$ de massa fresca)
JADS *	8,20 ef	12,10 ef	60,91 cde
N ₁ 17,30	10,80 bcd	11,20 def	80,09 bc
N ₃ 39,00	5,50 h	13,20 f	104,65 ab
N ₄ 58,50	6,20 gh	7,50 ab	52,59 def
P ₁ 2,00	7,90 ef	10,50 def	43,60 fg
P ₃ 4,50	7,80 efg	11,00 def	72,16 cd
P ₄ 6,75	8,10 ef	10,10 def	35,14 gh
K ₁ 7,30	11,80 bc	7,30 ab	28,14 hi
K ₃ 16,50	6,70 fgh	6,40 a	21,87 ij
K ₄ 24,75	7,30 fg	7,80 bc	18,31 j
Ca ₁ 3,30	10,80 bcd	10,90 def	56,29 def
Ca ₃ 7,50	13,40 ab	9,30 cd	62,35 cde
Ca ₄ 11,25	7,00 fg	9,40 cde	63,36 cde
Mg ₁ 2,00	13,20 ab	11,70 def	106,54 ab
Mg ₃ 4,50	11,90 abc	10,90 def	56,85 def
Mg ₄ 6,75	9,20 de	10,00 de	29,95 hi
S ₁ 2,29	9,70 cde	10,10 def	58,19 cdef
S ₃ 4,79	12,30 ab	10,00 de	47,85 efg
S ₄ 7,04	14,90 a	10,10 def	112,20 a
F	45,09**	21,76**	68,77**
CV (%)	3,36	7,38	2,71

* ($\text{N}_2 = 26,0$; $\text{P}_2 = 3,0$; $\text{K}_2 = 11,0$; $\text{Ca}_2 = 5,0$; $\text{Mg}_2 = 3,0$; $\text{S}_2 = 3,29 \text{ mmol L}^{-1}$)

** significativo pelo teste F, $p=0,0001$; ⁽¹⁾ dados transformados = $\log_{10}(x)$; ⁽²⁾ dados transformados = (x^{-1}) ; Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$)

Souza e Cardoso (2003) encontraram teores mais baixos, próximos de $3,75 \text{ mg g}^{-1}$ matéria fresca em plântulas de *Eucalyptus grandis* desenvolvidas em meio JADS, aos 20 dias de cultivo.

Em cultura de calos de *Eucalyptus urophylla* cultivados em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) suplementado com $0 \leq \text{Ca} \leq 12,12 \text{ mmol L}^{-1}$ aos 20 dias de cultivo, Arruda et al. (2000) encontraram teores de carboidratos (7,5 a 37 mg g^{-1} de massa fresca), os quais tenderam aumentar em função da elevação da concentração de cálcio. Enquanto Trevisan (2001) avaliou calos de *Eucalyptus urophylla* cultivados em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) suplementado com diferentes concentrações de boro $0 \leq \text{B} \leq 200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e obteve teores de carboidratos não-estruturais solúveis totais entre 6,9 a 11,7 mg g^{-1} de massa fresca, aos 21 dias de cultivo. Em outro estudo em cultura calos de *Eucalyptus urophylla*, Trevisan (2005) avaliou a interação entre boro ($0 \leq \text{B} \leq 200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e cálcio $0 \leq \text{Ca} \leq 12,12 \text{ mmol L}^{-1}$ cultivados em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985), aos 21 e 31 dias de cultivo e observou que os teores de carboidratos não-estruturais solúveis totais variaram de 2,2 a 12,2 mg g^{-1} de massa fresca em função da interação entre os elementos e do tempo de cultivo.

2.3.5.2 Teor de proteínas solúveis totais

Na Tabela 18, verifica-se que os teores de proteínas solúveis totais nas brotações variaram de 6,40 a 13,20 mg g^{-1} de massa fresca em função das concentrações de macronutrientes nos meios de cultura. Esta variação representa 51,51% em relação ao maior teor de proteínas. O maior teor foi obtido na concentração de nitrogênio (N₃), o qual não diferenciou significativamente dos teores encontrados nas concentrações de fósforo, N₁, JADS, Ca₁, Mg₁ a Mg₃, S₁, e S₄. Enquanto, o menor teor obtido na concentração de potássio (K₃) não apresentou diferença significativa com relação às concentrações K₁ e N₄. Menor variação de teores de proteínas solúveis totais nas brotações foi observada entre as concentrações de fósforo, as quais não diferenciaram significativamente entre si.

O acúmulo de proteínas solúveis totais em brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas em meios de cultura suplementado com diferentes concentrações de macronutrientes foi pouco influenciado pelos tratamentos. Entre os tratamentos, aqueles contendo as diferentes concentrações de potássio, exceto K₂ (JADS), como também N₄, Ca₃ e Ca₄ destacam-se por apresentar menores teores de proteínas solúveis totais, sugerindo que, com a redução da síntese de proteína tenha havido redução da taxa de crescimento ou de outro fator limitante ao crescimento. Neste sentido, N₄ apresentou capacidade de produção de biomassa, entretanto a relação $\text{NO}_3^-:\text{NO}_4^+$ reduzida e/ou o excesso de nitrogênio (Anexo 1) devem ter afetado o

metabolismo celular. Em K₁ houve um crescimento excessivo das brotações e, em K₃, K₄ (Anexo 3) e Ca₃, Ca₄ (Anexo 4), além das concentrações que podem ter sido excessivas, o uso de Cl⁻ para o ajuste iônico destes tratamentos pode ter contribuído para desequilíbrios fisiológicos (MONTEIRO et al., 2000; KANASHIRO, 2005).

O valor encontrado neste estudo, em meio de cultura JADS, para teor de proteínas solúveis totais (Tabela 18) foi aproximado ao obtido por Higashi e Gonçalves (2006) que correspondeu a 14,3 mg g⁻¹ de matéria fresca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivados em JADS, aos 21 dias de cultivo.

Stefanuto (2002) em condições experimentais similares a este estudo, como também, ao conduzido por Higashi e Gonçalves (2006), obteve valor inferior equivalente a 3,5 mg proteínas g⁻¹ de matéria fresca. Da mesma forma que no estudo realizado por Basso et al. (2003) em brotações de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* cultivadas em meio GM, o teor encontrado foi de aproximadamente 1,75 mg proteína g⁻¹ de matéria fresca.

Em plântulas de *Eucalyptus grandis* desenvolvidas em meio JADS, aos 20 dias de cultivo, Souza e Cardoso (2003) encontraram valores para teores de proteínas solúveis totais próximos de 40 mg g⁻¹ de matéria fresca.

Arruda et al. (2001) em cultura de calos de *Eucalyptus urophylla* cultivados em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) suplementado com as concentrações de cálcio, 0 ≤ Ca ≤ 12,12 mmol L⁻¹ verificaram que concentrações crescentes de cálcio determinaram aumento dos teores de proteínas solúveis totais, os quais variaram de 42 a 100 mg g⁻¹ de massa fresca, aos 20 dias de cultivo. Trevisan (2001) analisou calos de *Eucalyptus urophylla* cultivados em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) em diferentes concentrações de boro 0 ≤ B ≤ 200 μmmol L⁻¹ e obteve teores de proteínas solúveis totais entre 10,4 e 11,01 mg g⁻¹ de massa fresca, aos 21 dias de cultivo, sem haver relação direta com o acúmulo de proteínas. Este estudo foi complementado por Trevisan (2005), o qual verificou a interação entre boro (0 ≤ B ≤ 200 μmmol L⁻¹) e cálcio 0 ≤ Ca ≤ 12,12 mmol L⁻¹ cultivados em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) aos 21 e 31 dias de cultivo, onde os teores de proteínas solúveis totais variaram entre 9,2 e 16,6 mg g⁻¹ de massa fresca em função da interação entre os elementos e do tempo de cultivo.

2.3.5.3 Teor de prolina

Na Tabela 18, pode-se observar que os teores de prolina nas brotações variaram de 18,30 a 112,20 $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa fresca em função das concentrações de macronutrientes nos meios de cultura. Esta variação representa 83,7% em relação ao maior teor de prolina. Maior teor refere-se à concentração de enxofre (S₄), o qual não apresentou diferença significativa em relação aos teores encontrados em Mg₁ e N₃. Enquanto, menor teor foi encontrado na maior concentração de potássio (K₄), o qual não diferenciou significativamente da concentração K₃. Nota-se que os teores de prolina nas brotações diminuíram significativamente de acordo com a elevação das concentrações de magnésio nos meios de cultura.

Os tratamentos envolvendo as diferentes concentrações de cálcio, bem como, aqueles com potássio, exceto K₂ (JADS) foram os mais estáveis quanto ao acúmulo de prolina. Adicionalmente, K₁, K₃ e K₄ apresentaram os menores teores de prolina. Maiores teores de prolina estão relacionados aos tratamentos S₄, Mg₁ e N₃, entretanto por questões distintas. S₄ e Mg₁ apresentam maiores concentrações de SO₄²⁻ em seus meios de cultura e, provavelmente, estejam contribuindo para o acúmulo de prolina sugerindo que *Eucalyptus grandis* cultivado em meio de cultura JADS suplementado com concentrações de enxofre $\geq 5,29 \text{ mmol L}^{-1}$ de SO₄²⁻ tende a acumular prolina. Enquanto em N₃, o acúmulo esteja ocorrendo para contribuir com a taxa de crescimento favorecendo maior produção de massa seca em N₃ do que em N₄.

Entretanto, teores de prolina em *Eucalyptus* citados na literatura são divergentes. Neste estudo, o valor para teor deste soluto orgânico em meio de cultura JADS correspondeu a 60,91 $\mu\text{g g}^{-1}$ de prolina de massa fresca de brotações de *Eucalyptus grandis*. Higashi e Gonçalves (2006) utilizando o mesmo material genético e meio de cultura obtiveram 38,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de prolina de massa fresca. Por outro lado, Stefanuto (2002) e Cantarelli (2002) utilizando o mesmo clone de *Eucalyptus grandis*, meio de cultura e tempo de cultivo obtiveram teores de prolina igual a 20 e 69,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de matéria fresca, respectivamente. Souza et al. (2004) cultivando brotações de *Eucalyptus grandis in vitro*, em meio de cultura JADS, obtiveram teores de prolina próximos a 26 e 38 $\mu\text{g g}^{-1}$ de matéria fresca, aos 20 dias de cultivo.

Em plântulas de *Eucalyptus grandis*, Souza e Cardoso (2003) encontraram valores de prolina em torno de 250 $\mu\text{g g}^{-1}$ de matéria fresca, cultivadas em meio de cultura JADS, aos 20 dias de cultivo.

Em cultura de calos de *Eucalyptus urophylla* cultivados em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985) em concentrações de boro $0 \leq B \leq 200 \mu\text{mmol L}^{-1}$, Trevisan (2001) obteve teores de prolina entre 27,7 e 85,0 mg g⁻¹ de massa fresca, aos 21 dias de cultivo. Posteriormente, Trevisan (2005) em cultura de calos de *Eucalyptus urophylla* avaliou a interação entre boro ($0 \leq B \leq 200 \mu\text{mmol L}^{-1}$) e cálcio $0 \leq Ca \leq 12,12 \text{ mmol L}^{-1}$ cultivados em meio de cultura N7 (SIMOLA, 1985), aos 21 e 31 dias de cultivo e observou que os teores de prolina variaram de 59,7 a 215,8 mg g⁻¹ de massa fresca em função da interação entre os elementos e do tempo de cultivo.

2.3.6 Análise multivariada por componentes principais ‘biplot’

A aplicação de uma análise multivariada pressupõe a existência de correlação entre as variáveis aleatórias. No Anexo 19 encontra-se o resultado da análise de correlação (coeficiente de correlação de Pearson) entre as variáveis. Pode-se observar uma frequência elevada de correlações significativas ($p < 0,05$). Desta forma, optou-se pela aplicação de uma análise multivariada por componentes principais e sua representação pelo gráfico ‘biplot’ (GABRIEL, 1971), onde além do agrupamento dos tratamentos em poucos componentes que auxiliam a interpretação dos resultados representados graficamente, acrescentam ao gráfico, em função da proximidade ou dispersão, as correlações existentes entre tratamentos, entre variáveis, como também entre tratamentos e variáveis.

A análise multivariada por componentes principais ‘biplot’ aplicada às brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* mostrou que a informação relativa ao crescimento, aspectos nutricionais e bioquímicos nas brotações resume-se em quatro componentes principais, os quais explicam 70,04% da variabilidade no crescimento e diferenciação das brotações (Tabela 19).

Para determinar a importância das características das brotações nos componentes principais foi utilizado no contraste um valor maior a 0,65 nos elementos dos auto-vetores (Tabela 19), permitindo estabelecer que:

- no componente principal 1, as variáveis massa seca, enxofre, zinco e cobre foram estatisticamente significativas e explicam 24,75% da variabilidade total dos dados;

- no componente principal 2, as variáveis porcentagem de massa seca, boro e potássio foram estatisticamente significativas e explicam 17,83% da variabilidade total dos dados;
- no componente principal 3, não houve nenhuma variável significativa, mas sua composição contribui para explicar 16,3 % da variabilidade total dos dados;
- no componente principal 4, a variável fósforo foi significativa e explica 11,16% da variabilidade total dos dados.

Tabela 19 - Estrutura de correlação (auto-valores e auto-vetores) da análise multivariada para definição dos componentes principais

Características das brotações	Variáveis aleatórias	Número de componentes			
		1	2	3	4
Crescimento	Massa fresca	0,556	-0,417	0,570	0,013
	Massa seca	0,663*	0,060	0,450	0,300
	Porcentagem de massa seca	-0,131	0,754*	-0,340	0,387
Nutrição mineral	Nitrogênio	0,380	-0,411	0,379	0,100
	Fósforo	0,060	-0,021	0,014	-0,884*
	Potássio	-0,201	-0,761*	0,018	-0,101
	Cálcio	-0,622	0,078	-0,141	0,613
	Magnésio	-0,393	-0,361	-0,362	0,222
	Enxofre	0,855*	-0,023	0,139	0,261
	Boro	-0,004	0,827*	0,501	-0,050
	Cobre	-0,809*	-0,170	0,060	0,026
	Ferro	-0,309	0,403	0,615	0,105
	Manganês	-0,595	0,172	0,579	0,398
	Zinco	0,789*	-0,115	0,207	0,371
	Cloro	-0,465	-0,315	0,466	0,083
	Sódio	0,112	0,629	0,356	-0,379
	Bioquímica	Proteínas solúveis totais	0,140	0,469	-0,515
Carboidratos não- estruturais solúveis totais		0,443	-0,125	-0,620	0,319
Prolina		0,551	0,325	-0,370	0,074
Auto-valores		4,70	3,38	3,09	2,12
Auto-vetores		4,70	8,08	11,17	13,29
Variância (%)		24,75	17,83	16,3	11,16
Variância Acumulada (%)		24,75	42,58	58,88	70,04

* significativo para valor > 0,65 nos elementos dos auto-vetores

Considerando o grau de participação e importância das variáveis que compõem os três componentes onde houve significância, pode-se interpretar que:

- O componente principal 1 correlaciona-se com alta massa seca, altos teores de enxofre e de zinco e, baixo teor de cobre nas brotações, os quais encontram-se envolvidos diretamente nos processos metabólicos que favoreceram ganhos de massa seca e aumento do teor de enxofre e de zinco e a limitação da absorção de cobre nas brotações nas concentrações mais elevadas de enxofre. Na correlação em pares (Pairwise correlations) pode-se observar que enxofre correlaciona-se positivamente com a massa seca ($r^2 = 0,6592$; $p=0,0021$) e com zinco ($r^2 = 0,7724$; $p=0,0001$), o zinco com a massa seca ($r^2 = 0,6050$; $p=0,0061$) e o cobre correlaciona-se negativamente com a massa seca ($r^2 = -0,5986$; $p=0,0068$), com o enxofre ($r^2 = -0,5983$; $p=0,0068$) e com o zinco ($r^2 = -0,7003$; $p=0,0008$), (Anexo 20).

- O componente principal 2 correlaciona-se com alta porcentagem de massa seca e boro e, baixo potássio nas brotações. Na correlação em pares (Pairwise correlations) pode-se observar que a porcentagem de massa seca correlaciona-se positivamente com boro ($r^2 = 0,4868$; $p=0,0346$) e negativamente com potássio ($r^2 = -0,5930$; $p=0,0075$), enquanto o boro apresenta correlação negativa com potássio ($r^2 = -0,6766$; $p=0,0015$), (Anexo 20).

- O componente principal 4 correlaciona-se com fósforo, o qual está influenciando negativamente nas brotações, provavelmente em decorrência da interação iônica com Ca^{2+} (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997) conforme os resultados da especiação iônica indicados nas Tabelas 6 e 10, como também nas análises de especiação iônica em meios de cultura conduzidos por Higashi (1996) e Langer (2000). Adicionalmente, na análise de correlação em pares (Pairwise correlations), o fósforo correlaciona-se negativamente com o cálcio ($r^2 = -0,5568$; $p=0,0114$), (Anexo 20).

No gráfico ‘biplot’ (Figura 34) estabelecido tridimensionalmente em função dos três componentes com variáveis significativas foi possível visualizar que:

- os tratamentos N₁, P₁ e JADS correlacionam-se com porcentagem da massa seca; P₁, JADS, P₃, P₄, N₃, N₄ e K₁ com boro, sódio, ferro e manganês; N₃, N₄, S₃ e S₄ com massa fresca e massa seca, K₃ e K₄ com cloro; Ca₄, S₃ e S₄ com enxofre e zinco; S₁ e Ca₁ com potássio; Ca₃, Mg₁, Mg₃ e Mg₄ com carboidratos não-estruturais solúveis totais e prolina.

- Os pares das variáveis massa fresca e massa seca, nitrogênio e massa fresca, enxofre e massa fresca, enxofre e massa seca, boro e porcentagem de massa seca, cobre e cálcio, ferro e boro, manganês e cálcio, manganês e cobre, manganês e ferro, zinco e massa seca, zinco e enxofre, cloro e potássio, sódio e boro, carboidratos não-estruturais solúveis totais e zinco, prolina e enxofre e, prolina e proteínas solúveis totais correlacionam-se positivamente em um nível de significância no máximo $p < 0,05$ (Anexo 20).

- Os pares das variáveis porcentagem de massa seca e massa fresca, nitrogênio e porcentagem de massa seca, potássio e porcentagem de massa seca, cálcio e fósforo, enxofre e magnésio, boro e potássio, cobre e massa seca, cobre e enxofre, zinco e cobre, sódio e magnésio, proteínas solúveis totais e cloro, carboidratos não-estruturais solúveis totais e boro, carboidratos não-estruturais solúveis totais e manganês, prolina e cloro correlacionam-se negativamente em um nível de significância no máximo $p < 0,05$ (Anexo 20).

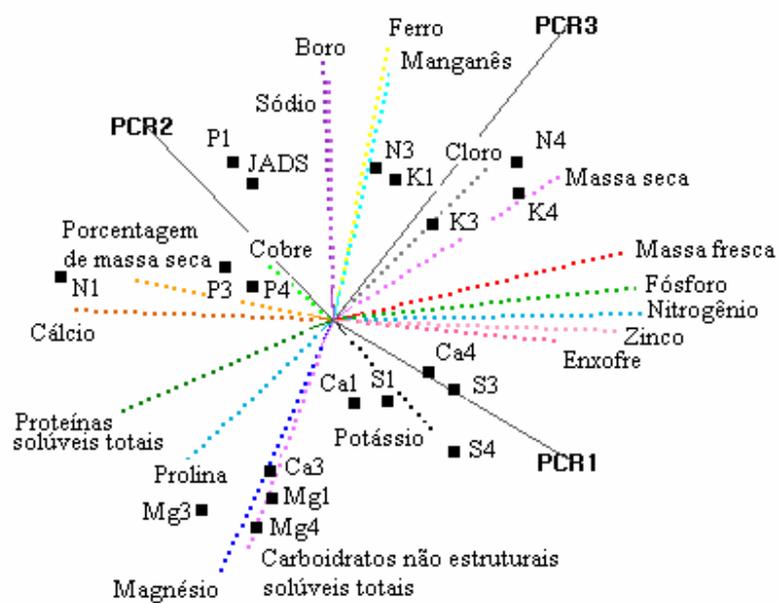


Figura 34 – Representação gráfica das correlações estabelecidas na análise multivariada por componentes principais 'biplot'

3 CONCLUSÕES

- O equilíbrio iônico dos meios de cultura apresentou alterações em função do macronutriente e da concentração utilizada.
- A morfogênese e as características de crescimento das brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* foram afetadas pelo macronutriente e concentração utilizada. Concentrações a partir de 39,0 mmol L⁻¹ de nitrogênio, 4,5 mmol L⁻¹ de fósforo, 16,5 mmol L⁻¹ de potássio, 7,5 mmol L⁻¹ de cálcio, 6,75 mmol L⁻¹ de magnésio e 4,79 mmol L⁻¹ de enxofre intensificaram mudanças morfológicas. O meio de cultura JADS contendo, em mmol L⁻¹, 26,0 (N), 3,0 (P), 11,0 (K), 5,0 (Ca), 3,0 (Mg) e 3,0 (S) apresentou crescimento das brotações considerado ótimo, porém, não foi máximo.
- As produções de massa fresca e seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo de *Eucalyptus grandis* foram influenciadas pelo macronutriente, concentração utilizada e interações durante 21 dias de cultivo *in vitro*.
- Variações das concentrações de macronutrientes em meios de cultura promoveram respostas diferenciadas para teores de macronutrientes e de micronutrientes na massa seca de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro*.
- Teores de carboidratos não-estruturais solúveis totais variaram de 5,5 a 14,9 mg g⁻¹ da matéria fresca das brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro*, aos 21 dias de cultivo, em função do macronutriente e da concentração utilizada.
- Teores de proteínas solúveis totais variaram de 6,4 a 13,2 mg g⁻¹ da matéria fresca das brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro*, aos 21 dias de cultivo, em função do macronutriente e da concentração utilizada.
- Teores de prolina variaram de 18,3 a 112,2 µg g⁻¹ da matéria fresca das brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro*, aos 21 dias de cultivo, em função do macronutriente e da concentração utilizada.

REFERÊNCIAS

- AGREN, G.I Theory for growth of plants derives from the nitrogen productivity concept. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 64, n. 1, p. 17-28, 1985.
- ALVES, E.C.S.C.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 421-430, mai., 2004.
- AMIRI, M.E. Mineral uptake by banana (*Musa acuminata* L.) explant *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 529, p. 387-389, 2000.
- AMARAL, A.F.C. **Comportamento *in vitro* de explantes de matrizes de cenoura (*Daucus carota* L.) tratadas com variáveis níveis de potássio**. 2003. 103 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- ASCOUGH, G.D.; FENNELL, C.W. The regulation of plant growth and development in liquid culture. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 70, n. 2, p. 181-190, 2004.
- ARANDA-PERES, A. N. **Cultura *in vitro* de bromélias da Mata Atlântica: micropropagação, avaliação nutricional e substratos para aclimação**. 2005, 124 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- ARRUDA, S.C.C.; SOUZA, G.M.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A.N. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n. 2, p. 143-154, 2001.
- AUER, C.A.; LALOUE, M.; COHEN, J.D.; COOKE, T.J. Uptake and metabolism of benzyladenine during shot organogenesis in petunia leaf explants. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 11, p. 105-114, 1992.
- AVILA, A.L.; PEREYRA, S.M.; ARGUELLO, J.A. Nitrogen concentration and proportion of NH_4^+ -N affect potato cultivar response in solid and liquid media. **HortScience**, St. Joseph, v. 33, n. 2, p. 336-338, 1998.
- BANOWETZ, G.M. The effects of endogenous cytokinin content on benzyladenine-enhanced nitrate reductase induction. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 86, p. 341-348, 1992.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação Agrícola**. 3 ed. Jaboticabal: Funep, 1995, 247 p.
- BARRUETO CID, L.P.; MACHADO, A.C.M.G.; CARVALHEIRA, S.B.R.C.; BRASILEIRO, A.C.M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 56, p. 17-23, 1999.

BASSO, L.H.M.; GONÇALVES, A.N.; SILVEIRA, L.V.A.; LIMA, G.P.P. Efeito do alumínio no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* *in vitro*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 63, p. 167-77, jun., 2003.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.E.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 39, p. 205-207, 1973.

BRAVO, C.D.V. **Controle genético e histogênese na regeneração de progênies de *Eucalyptus grandis***. 2005. 80 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BEAR, F.E. **Chemistry of the soil**. 2nd ed. New York: Reinhold Publishers, 1964. 515 p.

BENNETT, I.J.; MCDAVID, D.A.J.; McCOMB, J.A. The influence of ammonium nitrate, pH and indole butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated *Eucalyptus globulus*. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 47, n. 3, p. 355-360, 2003/4.

BLOMSTEDT, C.; MAMERON, J.; WHITEMAN, P.; CHANDLER, S.F. Micropropagation of juvenile *Eucalyptus regnans* (mountain ash). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 39, n. 2, p. 179-126, 1993.

BORGATTO, F.; DIAS, C.T. dos S.; AMARAL, A.F.C.; MELO, M. Calcium, potassium and magnesium treatment of *Chrysanthemum morifolium* cv. "Bi Time" and callogenesis *in vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 4, p. 689-693, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

CANTARELLI, M.M.C. **Influência de diferentes concentrações de cálcio na homeostase de brotações de *Eucalyptis grandis* Hill (ex Maiden) submetidas a diferentes temperaturas *in vitro***. 2002. 71 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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

CASTRO, D.R.; GONZÁLES, J.O. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. **Agricultura Técnica**, Santiago, v. 62, n. 1, p. 68-78, 2002.

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

CHANG, S.H.; DONALD, D.G.M.; JACOBS, G. Micropropagation of *Eucalyptus radiata* sp. *radiata* using explant from mature and coppice material. **South African Forestry Journal**, Witwatersrand, n. 162, p. 43-47, 1992.

CHEN, D.M.; KEIPER, F.J.; FILIPPIS, L.F. Physiological changes accompanying the induction of salt tolerance in *Eucalyptus microcorys* shoots in tissue culture. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 152, p. 555-563, 1998.

CHEN, Z.Z.; TSAY, J.Y.; CHUNG, J.D. Callus culture of *Eucalyptus grandis* x *urophylla* and preliminary studies on organogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation. **Taiwan Journal Forestry Science**, Kampala, v. 11, p. 43-52, 1996.

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

COZZA, R.; TURCO, D.; BATI, C. B.; BITONTI, M. B. Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, p. 215-223, 1997.

CRESSWELL, R.; NITSCH, C. Organ culture of *Eucalyptus grandis* L. **Planta**, Berlin, v. 125, n. 1, p. 87-90, 1975.

CRESSWELL, R.D.; NITSCH, C. Factors influencing the regeneration of *Eucalyptus grandis* by organ culture. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 78, p. 149-55, 1977.

CRESSWELL, R.J.; FOSSARD, R.A. de. Organ culture of *Eucalyptus grandis*. **Australian Forestry**, Armidale, v. 37, n. 1, p. 55-69, 1974.

DALTON, C.C.; IQBAL, K.; TURNER, D.A. Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 57, p. 472-476, 1983.

DANTAS, A.K.; MAJADA, J.P.; FERNANDEZ, B.; CAÑAL, M.J. Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 33, p. 237-243, 2001.

DAS, T.; MITRA, G.C. Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 22, n. 2, p. 95-103, 1990.

DE FOSSARD, R.A. Tissue culture of *Eucalyptus*. **Australian Forest**, Armidale, v. 37, p. 43-54, 1974.

- DE FOSSARD, R.A.; BARKER, P.K.; BOURME, R.A. The organ culture of nodes of four species of *Eucalyptus*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 78, p. 157-165, 1977.
- DELAUNEY, A.; VERMA, D. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **Plant Journal**, London, v. 4, p. 215-223, 1993.
- DINIZ, J.D.N.; GONÇALVES, A.N.; HERNANDEZ, F.F.F.; TORRES, A.C.T. Absorção de macronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 7, p. 1201-1209, 1999a.
- DINIZ, J.D.N.; GONÇALVES, A.N.; HERNANDEZ, F.F.F.; TORRES, A.C.T. Absorção de micronutrientes por explantes de bananeira *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 7, p. 1201-1209, 1999b.
- DONALD, D.G.M.; NEWTON, D.J. *In vitro* propagation of *Eucalyptus radiata*. **South African Forestry Journal**, Witwatersrand, v. 157, p. 66-68, 1991.
- DONATO, V. M. T.S.; ANDRADE, A.G.; SOUZA, E.S.; FRANÇA, J.G.E. Metabolismo de plantas de cana de açúcar cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1373-1379, 2003.
- DRIVER, J.A.; KUNIYUKI, A.H. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. **HortScience**, St. Joseph, v. 19, p. 507-509, 1984.
- EL BADAOU, H.; MORARD, P.; HENRY, M. Stimulation of the growth and solamargine production by *Solanum paludosum* multiple shoot cultures using a new culture medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v. 45, p. 153-158, 1996.
- ELLIOTT, G. C.; SMITH, M.A.; BRIDGEN, M.P. Growth response of *Alstroemeria* 'Parigro Pink' to phosphate supply *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 32, p. 199-204, 1993.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. 400 p.
- EVANS, N.E. A preliminary study on the effects of nitrogen supply on the growth *in vitro* of nine potato genotypes (*Solanum* spp.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 261, p. 837-841, 1993.
- EYMAR, E.; ALEGRE, J.; TORIBIO, M.; LOPEZ-VELA, D. Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, p. 57-65, 2000.

FULCHERI, C.; MORARD, P.; HENRY, M. Stimulation of the growth and the triterpenoid saponin accumulation of *Saponaria officinalis* cell and *Gypsophila paniculata* root suspension cultures by improvement of the mineral composition of the media. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, v. 46, p. 2055-2061, 1998.

FURZE, M.I.; CRESSWELL, C.F. Micropropagation of *Eucalyptus grandis* and *nitens* using tissue culture techniques. **South African Forestry Journal**, Witwatersrand, v. 135, p. 20-23, 1985.

GABRIEL, K.R. Biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. **Biometrika**, Great Britain, v. 5, n. 3, p. 453-469, 1971.

GARCIA, J.L.; SARMIENTO, R.; TRONCOSO, A.; MAZUELOS, C. Effects of the nitrogen source and concentration on N fractions in olive seedlings. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 356, p. 193-197, 1994.

GEORGE, E.F.; PUTTOCK, D.J.M.; GEORGE, H.J. **Plant culture media**. Westbury: The Technology Exegetics, 1987. 700 p. v. 1 - Formulations and uses.

GILL, R.I.S.; GILL, S.S. *In vitro* exudation of phenols in *Eucalyptus*. **Indian Forester**, Dehra Dun, v. 120, n. 6, p. 504-509, 1994.

GOMES, F.; CANHOTO, J.M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (shining gum). **In vitro Cell Development Biology Plant**, Oxon, v. 39, p. 316-321, 2003.

GOMES, M.A.N.; SHEPHERD, S.L.K. Estudo de nutrição mineral *in vitro* relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições do cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 153-159, 2000.

GONÇALVES, A.N. Reversion to juvenility and cloning of *Eucalyptus urophylla* S.T.Blake. In: SIMPÓSIO E IUFRO EM MELHORAMENTO GENÉTICO E PRODUTIVIDADE DE FLORESTAS DE RÁPIDO CRESCIMENTO, 1980, Águas de São Pedro. **Anais...** Águas de São Pedro, São Paulo, 1980. p. 25-30.

GONZÁLEZ, E.R.; ANDRADE, A.; BERTOLO, A.L.; LACERDA, G.C.; CARNEIRO, R.T.; DEFÁVARI, V.A.P.; LABATE, M.T.V.; LABATE, C.A. Proction of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using the sonification-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 29, p. 97-102, 2002.

GRIBBLE, K.; CONROY, J.P.; HOLFORD, P.; MILHAM, P.J. *In vitro* uptake of mineral by *Gypsophila paniculata* and hybrid eucalypt, and relevance to media mineral formulation. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 50, p. 713-723, 2002.

HAKULINEN, J. Nitrogen-induced reduction in leaf phenolic level is not accompanied by increased rust frequency in a compatible willow (*Salix myrsinifolia*) – *Melampsora* rust interaction. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 102, p. 101-110. 1998.

HARE, P.D.; CRESS, W.A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 21, p. 79-102, 1997.

HERBERT, M.A. Fertilizers and eucalypt plantations in South Africa. In: ATTIWILL, P.A.; ADANS, M.A. (Ed.). **Nutrition of Eucalypts**. Collingwood: CSIRO, 1996. p. 303-326.

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

HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N. Avaliação nutricional de *Eucalyptus* cultivados *in vitro*. Piracicaba: IPEF, 2001. 11 p. (IPEF Notícias, 154).

HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N. **Omissão dos nutrientes minerais na produção de matéria seca, aspectos nutricionais e bioquímicos em *Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden) cultivados *in vitro***. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Ciências Florestais, Laboratório de Fisiologia das Árvores, 2006. 73 p.

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

HUNT, R. **Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis**. London: Edward Arnold, 1982. 242 p.

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

IPEF. Clipping de Notícias. Disponível em <http://www.ipef.br>. Acessado em: 7 dez. 2005.

ITO, K.; DOI, K.; TATEMACHI, Y.; SHIBATA, M. Plant regeneration of eucalyptus from rotating nodule cultures. **Plant Cell Reports**, New York, v. 16, n. 1/2, p. 42-45, 1996.

INGESTAD, T.; AGREN, G. I. Plant nutrition and growth: basic principles. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 168/169, p. 15-20, 1995.

JANIC, J. **Horticultural Science**. 3th ed. New York: W. H. Freeman, 1986. 240 p.

JONES, M.B.; VAN STADEN, J. Micropropagation and establishment of *Eucalyptus grandis* hybrids. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 60, p. 123-126, 1994.

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

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

KAUL, K.; HOFFMAN, S.A. Ammonium ion inhibition of *Pinus strobes* L. callus growth. **Plant Science**. Limerick, v. 88, n. 2, p. 169-173, 1993.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R.J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrech, v. 77, p. 181-191, 2004.

KINTZIOS, S.; STAVROPOULOU, E.; SKAMNELI, S. Accumulation of selected macronutrients and carbohydrates in melon tissue cultures: association with pathways of *in vitro* dedifferentiation and differentiation (organogenesis, somatic embryogenesis). **Plant Science**. Limerick, v. 167, p. 655-664, 2004.

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

LANGER, M. **Estudos e análises dos efeitos do cálcio sobre o crescimento inicial do híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* *in vitro***. 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

LARDET, L.; BES, M.; ENJALRIC, F.; CARRON, M. P. Mineral imbalance in *Hevea brasiliensis* cuttings: relation with *in vitro* multiplication and acclimatization. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 17, n. 12, p. 2135-2150, 1994.

LEIFERT, C.; MURPHY, K.P.; LUMSDEN, P.J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 14, n. 2, p. 83-109, 1995.

LEIFERT, C.; PRYCE, S.; LUMSDEN, P.J.; MURPHY, K.P. Effects of mineral nutrition on growth of tissue cultured plants. In: GOULDING, KH. (Ed.). **Horticultural exploitation of recent biological development**. Preston: Lancashire, 1991. p. 43-57.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. 2 .ed., São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.

LIMA M.L. **Respostas de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* a dose de potássio *in vitro***. 2004. 73 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

LIMA, M.M.; GONÇALVES, A.N. Efeito do thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis*. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, v. 53, p. 49-56, jun., 1998.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Southold, v. 30, p. 421-427, 1981.

LUBRANO, L. Micropropagation of *Eucalyptus grandis*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 300, p. 89-94, 1991.

LUMSDEN, P.J.; PRYCE, S.; LEIFERT, C. Effect of mineral nutrition on the growth and multiplication of *in vitro* cultured plants. In.: NIJKAMP, H.J.J.; PLAS, L.H.W.; ARTRIJK, J. (Ed.). **Progress in plant cellular and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990, p. 108-114.

MACRAE, S.; VAN STADEN, J. *In vitro* culture of *Eucalyptus grandis*: effect of gelling agents on propagation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 137, n. 2, p. 249-251, 1990.

MADAN, S.; NAINAWATEE, H.S.; JAN,R.K.; CHOWDHURY, J.B. The vacuolar membrane protein – TIP creates water selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 76, p. 51-57, 1995.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.

MATTIGOD, S.V.; SPOSITO, G. Chemical modeling of trace metal equilibria in contaminated soil solutions using the computer program GEOCHEM. **American Chemical Society**, Washington, v. 93, p. 837-856, 1979.

MENGEL, K; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. 5th ed. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 2001. 849 p.

MEZZETTI, B.; ROSATI, P.; CASALICCHIO, G. *Actinidia deliciosa* C.F. Liang *in vitro*. I Growth and mineral uptake by explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 25, p. 91-98, 1991.

MINOCHA, S. PH of the medium and the growth and metabolism of cells in culture. In.: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry: general principles and biotechnology**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p. 125-141.

MOKOTEDI, M.E.O.; WATT, M.P.; PAMMENTER, N.W.; BLAKEWAL, F.C. *In vitro* rooting and subsequent survival of two clones of a cold-tolerant *Eucalyptus grandis* x *E. nitens* hybrid. **HortScience**, St. Joseph, v. 35, n. 6, p. 1163-1165, oct. 2000.

MONTEIRO, A.C.B.A.; HIGASHI, E.H.; GONÇALVES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. F. *flaviacarpa* Deg.). **In Vitro Cell Development Biology Plant**, Oxon, v. 36, p. 527-531, 2000.

MORARD, P.; HENRY, M. Otimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 21, n. 8, p. 1565-1576, 1998.

MOURA, A; GARCIA, C.H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. São Paulo: SBS, 2000. 112 p.

MOURA, V.P.G.; GUIMARÃES, D.P. **Produção de mudas de *Eucalyptus* para o estabelecimento de plantios florestais**. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 2003. 9 p. (EMBRAPA-CNPQ – Comunicado Técnico, 85).

MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A review medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-493, 1962.

NANJO, T.; KOBAYASHI, M.; YOSHIBA, Y.; SANADA, Y.; WADA, K.; TSUKAYA, H.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Biological functions of praline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 185-193, 1999.

OLSEN, S.R. Micronutrient interaction. In: MORTVEDT, J.J.; GIORDANO, P.M.; LINDSAY, W.L. (Ed.). **Micronutrients in agriculture**. Madison: Soil Science Society of America, 1972. p. 253-269.

PACKER, D.R.; NORVELL, W.A.; CHANEY, R.L. GEOCHEM-PC: a chemical speciation program for IBM and compatible personal computers. In: LOEPPERT, R.H.; SCHWAB, AP.; GOLDBERG, S. (Ed.). **Chemical equilibrium and reaction models**. Madison: Soil Science Society of America, 1995. p. 253-269.

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

PINTO JÚNIOR, J.E. **Reml/Blup para a análise de múltiplos experimentos, no melhoramento genético de *Eucalyptus grandis* W. Hill Ex Maiden**. 2004. 113 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PORTER, J.R.; LAWLOR, D.W. **Plant growth: interactions with nutrition and environment**. Cambridge: University of Cambridge Press, 1991. 284 p.

PRYCE, S.; LUMSDEN, P.J.; BERGER, F.; LEIFERT, C. Effect of plant density and macronutrient nutrition on *Delphinium* shoot culture. **Journal of Horticultural Science**, Budapest, v. 68, n. 5, p. 807-813, 1993.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Oxon, v. 38, p. 115-124, 2002.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Inorganic nitrogen requirements during shoot organogenesis in tobacco leaf discs. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 373, p. 1437-1443, 2002.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral uptake in tobacco leaf discs during different developmental stages of shoot organogenesis. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, p. 1047-1053, 2003.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Cytokinin-induced abnormal shoot organogenesis is associated with elevated *Knotted1*-type homeobox gene expression in tobacco. **Plant Cell Reports**, New York, v. 22, p. 919-924, 2004.

RAO, K.S.; VENKATESWARA, R. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Eucalyptus grandis* L. **Plant Science**, Limerick, v. 40, n. 1, p. 51-55, ago. 1985.

RESENDE, R.M.S.; GRAÇA, M.E.C. Efeito de citocininas na multiplicação e no enraizamento de brotações de clones de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden cultivados *in vitro*. In: CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO, 1.; CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7., 1993, Curitiba. **Anais...** Curitiba: SBS/SBEF, 1993. p. 116-119.

ROUX, J.J.; VAN STADEN, J. Micropropagation of *Eucalyptus* Species. **HortScience**, St. Joseph, v. 26, n. 2, p. 199-200, feb. 1991.

RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 1, p. 57-63. 2003.

RUZIC, D.; SARIC, M.; CEROVIC, R.; CULAFIC, L. Changes in macroelement content of the media and in sweet cherry Inmil GM 9 shoots during *in vitro* culture. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 76, n. 3, p. 295-299, 2001.

SAMUELSON, M.E.; CAMPBELL, W.H.; LARSSON, C.M. The influence of cytokinins in nitrate regulation of nitrate reductase activity and expression in barley. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 93, p. 533-539, 1995.

SARADHI, P.; ALIA, P.; ARORA, S; PRASAD, K.V.S.K. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Orlando, v. 209, p. 1-5, 1995.

SARMIENTO, R.; GARCIA, J.L.; MAZUELOS, C.; LINAN, J.; TRONCOSO, A. Effect of the form and concentration of N on the growth and mineral compositions of olive seedlings. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 356, p. 156-161, 1994.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT[®] user guide: vertion 6.08. Carrey, 1997. v. 2. 846 p.

SCHENK, N.; HSIAO, K.C.; BORNMAN, C.H. Avoidance of precipitation and carbohydrate breakdown in autoclaved plant tissue culture media. **Plant Cell Reports**, New York, v. 10, p. 115-119, 1991.

SCHOBERT, B.; TSCHESCHE, H. Unusual solution properties of praline and its interactions with proteins. **Biochemistry Biophysics Acta**, Amsterdam, v. 541, p. 270-277, 1978.

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

SIMOLA, L.K. Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula purpurea*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 77-85, 1985.

SINGHA, S.; OBERLY, G.H.; TOWNSEND, E.C. Changes in nutrient composition and pH the culture medium during *in vitro* shoot proliferation of crabapple and per. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrech, v. 11, p. 209-220, 1987.

SILVA, L.L.; TEIXEIRA, S.L. Influência da associação de diferentes formulações de macronutrientes com diferentes formulações de vitaminas, sobre a propagação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, a partir de gemas epicórmicas. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 41, n. 237, p. 528-536, 1994.

SILVEIRA, R.L.V.A.; HIGASHI, E.N. **Nutrição e adubação de *Eucalyptus***. Piracicaba: RR Agroflorestral, 2002. 210 p.

SHIN, K-S.; CHAKRABARTY, D.; KO, J-Y.; HAN, S.S.; PAEK, K-Y. Sucrose utilization and mineral nutrient uptake during hairy root growth of red beet (*Beta vulgaris* L.) in liquid culture. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 39, p. 187-193, 2003.

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

SOTIROPOULOS, T.E.; THERIOS, I.N.; DIMASSI, K.N. Calcium application as a means to improve tolerance of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* L.) to boron toxicity. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 81, p. 443-449, 1999.

SOUZA, G.M.; CARDOSO, V.J.M.; GONÇALVES, A.N. Efeitos da salinidade e subnutrição em plantas de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro*. **Naturalia**, São Paulo, v. 27, p. 95-105, 2002.

SOUZA, B.M.; KRAUS, J.E.; ENDRES, L.; MERCIER, H. Relationships between endogenous hormonal levels and axillary bud development of *Ananas comosus* nodal segments. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi v. 41, p. 733-739, 2003.

SOUZA, G.M.; CARDOSO, V.J.M. Toward a hierarchical concept pf plant stress. **Israel Journal of Plant Science**, Jerusalém, v. 51, n. 1, p. 29-37, 2003.

SOUZA, G.M.; CARDOSO, V.J.M.; GONÇALVES, A.N. Proline content and protein patterns in *Eucalyptus grandis* shoots submitted to high and low temperature shocks. **Brasilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 3, p. 355-362, 2004.

SPOSITO, G.; MATTIGOD, S.V. Geochemp: a computer program for the calculation of chemical equilibria in soil solutions and other natural water systems. **Kearney Foundation of Soil Science**, Riverside: University of California, 1980. 107 p.

SRISKANDARAJAH, S.; SKIRVIN, R.M.; ABU-QAOD, H. The effect of some macronutrients on adventitious root development on scion apple cultivars *in vitro*. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrech, v. 21, p. 185-189, 1990.

STEFANUTO, V.A. **Efeito do cálcio no homeostase de brotações de um clone de *Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden) sob condições de deficiência hídrica induzida *in vitro***. 2002. 65 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3rd ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2002. 690 p.

TAKEDA, T.; KITAGAWA, T.; TAKEUCHI, Y. Metabolic responses of plant cell culture to hydrodynamic stress. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, Ottawa, v. 76, n. 4, p. 267-275, 1998.

TAKEI, K.; SAKAKIBARA, H.; TANIGUCHI, M.; SYGIYAMA, T. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulators. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 42, p. 85-93, 2001.

TANAKA, H. Boron absorption by crop plants as affected by other nutrients of the medium. **Soil Science Plant Nutrition**, Tokyo, v. 13, p. 41-44, 1967.

TEASDALE, R. D.; RICHARDS, D. K. Boron deficiency in cultured pine cells – quantitative studies of the interations with Ca and Mg. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, p. 1071-1077, 1990.

TERRER, J.C.; TOMAS, D.F. Determination of macronutrients to be included in *in vitro* culture media according to leaf concentrations. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 76, n. 4, p. 484-488, 2001.

TING, I.P. **Plant Physiology**. Riverside: Addison-Wesley, University of California, 1982. 642 p.

TREVIZAM, R. **Atuação de concentrações de boro na morfogênese de *Eucalyptus urophylla* cultivados *in vitro***. 2001. 65 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

TREVIZAM, R. **Análise histológica e bioquímica em calos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake cultivados *in vitro* sob interação nutricional de boro e cálcio.** 2005. 166 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

VELIKY, I.A.; ROSE, D.; ZINK, M.W. Uptake of magnesium by suspension cultures of plants cells (*Ipomoea* sp.) **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 55, p. 1143-1147; 1976.

VILLEGAS, A.; MAZUELOS, C.; TRONCOSO, A. Influence of N-NO₃ and N-NH₄ on the mineral composition of grape-vine root stocks cultured *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 300, p. 119-121, 1991.

WACHIRA, F. *In vitro* shoot multiplication of *Eucalyptus grandis*. **African Crop Science Journal**, Kampala, v. 5, p. 239-251, 1997.

WARRAG, E.; LESNEY, M.S.; ROCKWOOD, D.J. Micropropagation of field tested superior *Eucalyptus grandis* hybrids. **New Forest**, Netherlands, v. 4, p. 67-79, 1990.

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

WATT, M.P.; GAUNTLETT, B.A.; BLAKEWAY, F.C. Effect of anti-jungal agents of *in vitro* cultures of *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, Witwatersrand, v. 175, p. 23-27, 1996.

WATT, M.P.; BLAKEWAY, F.; CRESSWELL, C.F.; HERMAN, B. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, Witwatersrand, n. 157, p. 59-65, jun. 1991.

WERNER, J.E.; FINKELSTEIN, R.R. *Arabidopsis mutants* with reduced response to NaCl and osmotic stress. **Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 34, p. 913-922, 1995.

WHITE, P.R. **The cultivation of animal and plant cells.** New York: Ronald Press, 1954. 250 p.

WILLIAMS, R.R. Towards a model of mineral nutrition *in vitro*. In: KURATA, K.; KOZAI, T. eds. **Transplant production systems.** Dordrecht: Kluwer Academic, 1992. p. 213-229.

WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition *in vitro* a mechanistic approach. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 41, n. 2, p. 237-251, 1993.

WILLIAMS, R.R. The chemical micro-environment. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M.A.L. (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture.** Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 405-439.

WILLIAMS, R.R.; TAJI, A.M.; WINNEY, K.A. The effect of *Ptilotus* plant tissue on pH of *in vitro* media. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrech, v. 22, p. 153-158, 1991.

YAMAUCHI, T.; HARA, T.; SONODA, Y. Distributions of calcium and boron in the pectin fractions of tomato leaf cell wall. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 27, p. 729-732, 1986.

YANG, J.C.; CHUNG, J.D.; CHEN, Z.Z. Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* x *urophylla* and comparison of growth between micropropagated plantlets and rooted cuttings. **Plant Cell Reports**, New York, v. 15, p. 170-173, 1995.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v. 57, p. 508-515, 1954.

ZAIDAN, H.A.; OLIVEIRA, E.T.; GALLO, L.A.; CROCOMO, O.J. Comportamento fisiológico in vitro de bananeira (*Musa* sp.) AAA e AAB cvs. Nanica e Prata Anã: influência de diferentes níveis de potássio. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 2, p. 397-406, 1999.

ZAMANI, Z.; VAHDATI, K. Influence of carbohydrate form and nitrogen source on growth of persian walnut shoots *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 544, p. 537-541, 2001.

ZIV, M The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 393, p. 25-35, 2001.

XAVIER, A.; ANDRADE, H.B.; OLIVEIRA, M.L.; WENDLING, I. Desempenho do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 403-411, 2001.

ANEXOS

Anexo 1 - Concentrações de íons nos meios de cultura suplementados com concentrações de nitrogênio (17,3; 26,0; 39,0 e 58,5 mmol L⁻¹)

Íons	Fontes de nutrientes	Meios de cultura (mmol L ⁻¹ N total)			
		17,3	26,0 (JADS)	39,0	58,5
NH ₄ ⁺	[NH ₄ NO ₃]	-	4,0	10,5	20,25
NO ₃ ⁻	[NH ₄ NO ₃]	-	4,0	10,5	20,25
NO ₃ ⁻	[KNO ₃]	7,3	8,0	8,0	8,0
NO ₃ ⁻	[Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O]	10,0	10,0	10,0	10,0
N total		17,3	26,0	39,0	58,5
PO ₄ ³⁻	[KH ₂ PO ₄]	3,0	3,0	3,0	3,0
K ⁺	[KNO ₃]	7,3	8,0	8,0	8,0
K ⁺	[KH ₂ PO ₄]	3,0	3,0	3,0	3,0
K ⁺	[KCl]	0,7	-	-	-
K⁺ total		11,0	11,0	11,0	11,0
Ca ²⁺	[Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O]	5,0	5,0	5,0	5,0
Mg ²⁺	[MgSO ₄ .7H ₂ O]	3,0	3,0	3,0	3,0
SO ₄ ²⁻	[MgSO ₄ .7H ₂ O]	3,0	3,0	3,0	3,0
SO ₄ ²⁻	[FeSO ₄ .7H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
SO ₄ ²⁻	[MnSO ₄ .4H ₂ O]	0,07	0,07	0,07	0,07
SO ₄ ²⁻	[ZnSO ₄ .7H ₂ O]	0,015	0,015	0,015	0,015
SO ₄ ²⁻	[CuSO ₄ .5H ₂ O]	0,005	0,005	0,005	0,005
SO₄²⁻ total		3,29	3,29	3,29	3,29
EDTA	[Na ₂ EDTA.2H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
Fe ²⁺	[FeSO ₄ .7H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
BO ₃ ³⁻	[H ₃ BO ₃]	0,05	0,05	0,05	0,05
Mn ²⁺	[MnSO ₄ .4H ₂ O]	0,07	0,07	0,07	0,07
Zn ²⁺	[ZnSO ₄ .7H ₂ O]	0,015	0,015	0,015	0,015
MoO ₄ ²⁻	[Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O]	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006
Cu ²⁺	[CuSO ₄ .5H ₂ O]	0,005	0,005	0,005	0,005
Co ²⁺	[CoCl ₂ .6H ₂ O]	0,001	0,001	0,001	0,001
Cl ⁻	[KCl]	0,7	-	-	-
Cl ⁻	[CoCl ₂ .6H ₂ O]	0,002	0,002	0,002	0,002
Cl⁻ total		0,702	0,002	0,002	0,002
Na ⁺	[Na ₂ EDTA.2H ₂ O]	0,4	0,4	0,4	0,4
Na ⁺	[Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O]	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012
Na⁺ total		0,4012	0,4012	0,4012	0,4012
NO₃⁻:NH₄⁺		-	5,5:1	2,71:1	1,89:1

Anexo 2 – Concentrações de íons nos meios de cultura suplementados com concentrações de fósforo (2,0; 3,0; 4,5 e 6,75 mmol L⁻¹)

Íons	Fontes de nutrientes	Meios de cultura (mmol L ⁻¹ PO ₄ ³⁻ total)			
		2,0	3,0 (JADS)	4,5	6,75
NH ₄ ⁺	[NH ₄ NO ₃]	4,0	4,0	4,75	5,875
NO ₃ ⁻	[NH ₄ NO ₃]	4,0	4,0	4,75	5,875
NO ₃ ⁻	[KNO ₃]	8,0	8,0	6,5	4,25
NO ₃ ⁻	[Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O]	10,0	10,0	10,0	10,0
N total		26,0	26,0	26,0	26,0
PO₄³⁻	[KH₂PO₄]	2,0	3,0	4,5	6,75
K ⁺	[KNO ₃]	8,0	8,0	6,5	4,25
K ⁺	[KH ₂ PO ₄]	2,0	3,0	4,5	6,75
K ⁺	[KCl]	1,0	-	-	-
K ⁺ total		11,0	11,0	11,0	11,0
Ca ²⁺	[Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O]	5,0	5,0	5,0	5,0
Mg ²⁺	[MgSO ₄ .7H ₂ O]	3,0	3,0	3,0	3,0
SO ₄ ²⁻	[MgSO ₄ .7H ₂ O]	3,0	3,0	3,0	3,0
SO ₄ ²⁻	[FeSO ₄ .7H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
SO ₄ ²⁻	[MnSO ₄ .4H ₂ O]	0,07	0,07	0,07	0,07
SO ₄ ²⁻	[ZnSO ₄ .7H ₂ O]	0,015	0,015	0,015	0,015
SO ₄ ²⁻	[CuSO ₄ .5H ₂ O]	0,005	0,005	0,005	0,005
SO ₄ ²⁻ total		3,29	3,29	3,29	3,29
EDTA	[Na ₂ EDTA.2H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
Fe ²⁺	[FeSO ₄ .7H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
BO ₃ ³⁻	[H ₃ BO ₃]	0,05	0,05	0,05	0,05
Mn ²⁺	[MnSO ₄ .4H ₂ O]	0,07	0,07	0,07	0,07
Zn ²⁺	[ZnSO ₄ .7H ₂ O]	0,015	0,015	0,015	0,015
MoO ₄ ²⁻	[Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O]	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006
Cu ²⁺	[CuSO ₄ .5H ₂ O]	0,005	0,005	0,005	0,005
Co ²⁺	[CoCl ₂ .6H ₂ O]	0,001	0,001	0,001	0,001
Cl ⁻	[KCl]	1,0	-	-	-
Cl ⁻	[CoCl ₂ .6H ₂ O]	0,002	0,002	0,002	0,002
Cl ⁻ total		1,002	0,002	0,002	0,002
Na ⁺	[Na ₂ EDTA.2H ₂ O]	0,4	0,4	0,4	0,4
Na ⁺	[Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O]	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012
Na ⁺ total		0,4012	0,4012	0,4012	0,4012
NO ₃ ⁻ :NH ₄ ⁺		5,5:1	5,5:1	4,47:1	3,43:1

Anexo 3 - Concentrações de íons nos meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de potássio (7,3; 11,0; 16,5 e 24,75 mmol L⁻¹)

Íons	Fontes de nutrientes	Meios de cultura (mmol L ⁻¹ K ⁺ total)			
		7,3	11,0 (JADS)	16,5	24,75
NH ₄ ⁺	[NH ₄ NO ₃]	5,85	4,0	4,0	4,0
NO ₃ ⁻	[NH ₄ NO ₃]	5,85	4,0	4,0	4,0
NO ₃ ⁻	[KNO ₃]	4,3	8,0	8,0	8,0
NO ₃ ⁻	[Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O]	10,0	10,0	10,0	10,0
N total		26,0	26,0	26,0	26,0
PO ₄ ³⁻	[KH ₂ PO ₄]	3,0	3,0	3,0	3,0
K ⁺	[KNO ₃]	4,3	8,0	8,0	8,0
K ⁺	[KH ₂ PO ₄]	3,0	3,0	3,0	3,0
K ⁺	[KCl]	-	-	5,5	13,75
K⁺ total		7,3	11,0	16,5	24,75
Ca ²⁺	[Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O]	5,0	5,0	5,0	5,0
Mg ²⁺	[MgSO ₄ .7H ₂ O]	3,0	3,0	3,0	3,0
SO ₄ ²⁻	[MgSO ₄ .7H ₂ O]	3,0	3,0	3,0	3,0
SO ₄ ²⁻	[FeSO ₄ .7H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
SO ₄ ²⁻	[MnSO ₄ .4H ₂ O]	0,07	0,07	0,07	0,07
SO ₄ ²⁻	[ZnSO ₄ .7H ₂ O]	0,015	0,015	0,015	0,015
SO ₄ ²⁻	[CuSO ₄ .5H ₂ O]	0,005	0,005	0,005	0,005
SO ₄ ²⁻ total		3,29	3,29	3,29	3,29
EDTA	[Na ₂ EDTA.2H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
Fe ²⁺	[FeSO ₄ .7H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
BO ₃ ³⁻	[H ₃ BO ₃]	0,05	0,05	0,05	0,05
Mn ²⁺	[MnSO ₄ .4H ₂ O]	0,07	0,07	0,07	0,07
Zn ²⁺	[ZnSO ₄ .7H ₂ O]	0,015	0,015	0,015	0,015
MoO ₄ ²⁻	[Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O]	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006
Cu ²⁺	[CuSO ₄ .5H ₂ O]	0,005	0,005	0,005	0,005
Co ²⁺	[CoCl ₂ .6H ₂ O]	0,001	0,001	0,001	0,001
Cl ⁻	[KCl]	-	-	5,5	13,75
Cl ⁻	[CoCl ₂ .6H ₂ O]	0,002	0,002	0,002	0,002
Cl ⁻ total		0,002	0,002	5,502	13,752
Na ⁺	[Na ₂ EDTA.2H ₂ O]	0,4	0,4	0,4	0,4
Na ⁺	[Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O]	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012
Na ⁺ total		0,4012	0,4012	0,4012	0,4012
NO ₃ ⁻ :NH ₄ ⁺		3,44:1	5,5:1	5,5:1	5,5:1

Anexo 4 – Concentrações de íons nos meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de cálcio (3,3; 5,0; 7,5 e 11,25 mmol L⁻¹)

Íons	Fontes de nutrientes	Meios de cultura (mmol L ⁻¹ Ca ⁺² total)			
		3,3	5,0 (JADS)	7,5	11,25
NH ₄ ⁺	[NH ₄ NO ₃]	5,7	4,0	4,0	4,0
NO ₃ ⁻	[NH ₄ NO ₃]	5,7	4,0	4,0	4,0
NO ₃ ⁻	[KNO ₃]	8,0	8,0	8,0	8,0
NO ₃ ⁻	[Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O]	6,6	10,0	10,0	10,0
N total		26,0	26,0	26,0	26,0
PO ₄ ³⁻	[KH ₂ PO ₄]	3,0	3,0	3,0	3,0
K ⁺	[KNO ₃]	8,0	8,0	8,0	8,0
K ⁺	[KH ₂ PO ₄]	3,0	3,0	3,0	3,0
K ⁺ total		11,0	11,0	11,0	11,0
Ca ²⁺	[Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O]	3,3	5,0	5,0	5,0
Ca ²⁺	[CaCl ₂ .2H ₂ O]	-	-	2,5	6,25
Ca²⁺ total		3,3	5,0	7,5	11,25
Mg ²⁺	[MgSO ₄ .7H ₂ O]	3,0	3,0	3,0	3,0
SO ₄ ²⁻	[MgSO ₄ .7H ₂ O]	3,0	3,0	3,0	3,0
SO ₄ ²⁻	[FeSO ₄ .7H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
SO ₄ ²⁻	[MnSO ₄ .4H ₂ O]	0,07	0,07	0,07	0,07
SO ₄ ²⁻	[ZnSO ₄ .7H ₂ O]	0,015	0,015	0,015	0,015
SO ₄ ²⁻	[CuSO ₄ .5H ₂ O]	0,005	0,005	0,005	0,005
SO ₄ ²⁻ total		3,29	3,29	3,29	3,29
EDTA	[Na ₂ EDTA.2H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
Fe ²⁺	[FeSO ₄ .7H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
BO ₃ ³⁻	[H ₃ BO ₃]	0,05	0,05	0,05	0,05
Mn ²⁺	[MnSO ₄ .4H ₂ O]	0,07	0,07	0,07	0,07
Zn ²⁺	[ZnSO ₄ .7H ₂ O]	0,015	0,015	0,015	0,015
MoO ₄ ²⁻	[Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O]	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006
Cu ²⁺	[CuSO ₄ .5H ₂ O]	0,005	0,005	0,005	0,005
Co ²⁺	[CoCl ₂ .6H ₂ O]	0,001	0,001	0,001	0,001
Cl ⁻	[CaCl ₂ .2H ₂ O]	-	-	5,0	12,5
Cl ⁻	[CoCl ₂ .6H ₂ O]	0,002	0,002	0,002	0,002
Cl ⁻ total		0,002	0,002	5,002	12,502
Na ⁺	[Na ₂ EDTA.2H ₂ O]	0,4	0,4	0,4	0,4
Na ⁺	[Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O]	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012
Na ⁺ total		0,4012	0,4012	0,4012	0,4012
NO ₃ ⁻ :NH ₄ ⁺		3,56:1	5,5:1	5,5:1	5,5:1

Anexo 5 - Concentrações de íons nos meios de cultura suplementados com concentrações de magnésio (2,0; 3,0; 4,5 e 6,75 mmol L⁻¹)

Íons	Fontes de nutrientes	Meios de cultura (mmol L ⁻¹ Mg ²⁺ total)			
		2,0	3,0 (JADS)	4,5	6,75
NH ₄ ⁺	[(NH ₄) ₂ SO ₄]	6,0	-	-	-
NH ₄ ⁺	[NH ₄ NO ₃]	1,0	4,0	2,5	0,25
NO ₃ ⁻	[NH ₄ NO ₃]	1,0	4,0	2,5	0,25
NO ₃ ⁻	[KNO ₃]	8,0	8,0	8,0	8,0
NO ₃ ⁻	[Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O]	10,0	10,0	10,0	10,0
NO ₃ ⁻	[Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O]	-	-	3,0	7,5
N total		26,0	26,0	26,0	26,0
PO ₄ ³⁻	[KH ₂ PO ₄]	3,0	3,0	3,0	3,0
K ⁺	[KNO ₃]	8,0	8,0	8,0	8,0
K ⁺	[KH ₂ PO ₄]	3,0	3,0	3,0	3,0
K ⁺ total		11,0	11,0	11,0	11,0
Ca ²⁺	[Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O]	5,0	5,0	5,0	5,0
Mg ²⁺	[MgSO ₄ .7H ₂ O]	2,0	3,0	3,0	3,0
Mg ²⁺	[Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O]	-	-	1,5	3,75
Mg²⁺ total		2,0	3,0	4,5	6,75
SO ₄ ²⁻	[MgSO ₄ .7H ₂ O]	2,0	3,0	3,0	3,0
SO ₄ ²⁻	[FeSO ₄ .7H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
SO ₄ ²⁻	[MnSO ₄ .4H ₂ O]	0,07	0,07	0,07	0,07
SO ₄ ²⁻	[ZnSO ₄ .7H ₂ O]	0,015	0,015	0,015	0,015
SO ₄ ²⁻	[CuSO ₄ .5H ₂ O]	0,005	0,005	0,005	0,005
SO ₄ ²⁻	[(NH ₄) ₂ SO ₄]	3,0	-	-	-
SO ₄ ²⁻ total		5,29	3,29	3,29	3,29
EDTA	[Na ₂ EDTA.2H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
Fe ²⁺	[FeSO ₄ .7H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
BO ₃ ³⁻	[H ₃ BO ₃]	0,05	0,05	0,05	0,05
Mn ²⁺	[MnSO ₄ .4H ₂ O]	0,07	0,07	0,07	0,07
Zn ²⁺	[ZnSO ₄ .7H ₂ O]	0,015	0,015	0,015	0,015
MoO ₄ ²⁻	[Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O]	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006
Cu ²⁺	[CuSO ₄ .5H ₂ O]	0,005	0,005	0,005	0,005
Co ²⁺	[CoCl ₂ .6H ₂ O]	0,001	0,001	0,001	0,001
Cl ⁻	[CoCl ₂ .6H ₂ O]	0,002	0,002	0,002	0,002
Na ⁺	[Na ₂ EDTA.2H ₂ O]	0,4	0,4	0,4	0,4
Na ⁺	[Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O]	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012
Na ⁺ total		0,4012	0,4012	0,4012	0,4012
NO ₃ ⁻ :NH ₄ ⁺		2,71:1	5,5:1	9,4:1	103,0:1

Anexo 6 – Concentrações de íons nos meios de cultura suplementados com concentrações de enxofre (2,29; 3,29; 4,79 e 7,04 mmol L⁻¹)

Íons	Fontes de nutrientes	Meios de cultura (mmol L ⁻¹ SO ₄ ²⁻ total)			
		2,29	3,29 (JADS))	4,79	7,04
NH ₄ ⁺	[(NH ₄) ₂ SO ₄]	-	-	3,0	7,5
NH ₄ ⁺	[NH ₄ NO ₃]	3,0	4,0	2,5	0,25
NO ₃ ⁻	[NH ₄ NO ₃]	3,0	4,0	2,5	0,25
NO ₃ ⁻	[KNO ₃]	8,0	8,0	8,0	8,0
NO ₃ ⁻	[Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O]	10,0	10,0	10,0	10,0
NO ₃ ⁻	[Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O]	2,0	-	-	-
N total		26,0	26,0	26,0	26,0
PO ₄ ³⁻	[KH ₂ PO ₄]	3,0	3,0	3,0	3,0
K ⁺	[KNO ₃]	8,0	8,0	8,0	8,0
K ⁺	[KH ₂ PO ₄]	3,0	3,0	3,0	3,0
K ⁺ total		11,0	11,0	11,0	11,0
Ca ²⁺	[Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O]	5,0	5,0	5,0	5,0
Mg ²⁺	[MgSO ₄ .7H ₂ O]	2,0	3,0	3,0	3,0
Mg ²⁺	[Mg(NO ₃) ₂ .6H ₂ O]	1,0	-	-	-
Mg ²⁺ total		3,0	3,0	3,0	3,0
SO ₄ ²⁻	[MgSO ₄ .7H ₂ O]	2,0	3,0	3,0	3,0
SO ₄ ²⁻	[FeSO ₄ .7H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
SO ₄ ²⁻	[MnSO ₄ .4H ₂ O]	0,07	0,07	0,07	0,07
SO ₄ ²⁻	[ZnSO ₄ .7H ₂ O]	0,015	0,015	0,015	0,015
SO ₄ ²⁻	[CuSO ₄ .5H ₂ O]	0,005	0,005	0,005	0,005
SO ₄ ²⁻	[(NH ₄) ₂ SO ₄]	-	-	1,5	3,75
SO₄²⁻ total		2,29	3,29	4,79	7,04
EDTA	[Na ₂ EDTA.2H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
Fe ²⁺	[FeSO ₄ .7H ₂ O]	0,2	0,2	0,2	0,2
BO ₃ ³⁻	[H ₃ BO ₃]	0,05	0,05	0,05	0,05
Mn ²⁺	[MnSO ₄ .4H ₂ O]	0,07	0,07	0,07	0,07
Zn ²⁺	[ZnSO ₄ .7H ₂ O]	0,015	0,015	0,015	0,015
MoO ₄ ²⁻	[Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O]	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006
Cu ²⁺	[CuSO ₄ .5H ₂ O]	0,005	0,005	0,005	0,005
Co ²⁺	[CoCl ₂ .6H ₂ O]	0,001	0,001	0,001	0,001
Cl ⁻	[CoCl ₂ .6H ₂ O]	0,002	0,002	0,002	0,002
Na ⁺	[Na ₂ EDTA.2H ₂ O]	0,4	0,4	0,4	0,4
Na ⁺	[Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O]	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012
Na ⁺ total		0,4012	0,4012	0,4012	0,4012
NO ₃ ⁻ :NH ₄ ⁺		7,67:1	5,5:1	3,73:1	2,35:1

Anexo 7 – Distribuição das espécies (metais) estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) nos meios de cultura suplementados com concentrações de nitrogênio

Metais	Meios de Cultura			
	N ₁	N ₂ (JADS) (% do total)	N ₃	N ₄
Ca ²⁺ livre	85,62	86,21	86,88	87,78
com SO ₄ ²⁻	10,19	9,73	9,28	8,55
com PO ₄ ³⁻	4,10	3,98	3,75	3,58
com EDTA ₄ ⁻	0,08	0,08	0,08	0,08
Mg ²⁺ livre	89,99	90,56	91,04	91,78
com SO ₄ ²⁻	8,51	8,11	7,72	7,10
com PO ₄ ³⁻	1,46	1,31	1,22	1,09
com Cl ⁻	0,03			
com NO ₃ ⁻		0,01	0,02	0,03
K ⁺ livre	99,03	99,07	99,08	99,12
com SO ₄ ²⁻	0,96	0,93	0,92	0,88
Na ⁺ livre	99,34	99,41	99,42	99,44
com SO ₄ ²⁻	0,61	0,59	0,58	0,56
com Cl ⁻	0,05			
Fe ²⁺ livre	17,06	17,25	17,64	17,96
com SO ₄ ²⁻	1,61	1,55	1,50	1,39
com PO ₄ ³⁻	14,21	13,99	13,41	13,01
com EDTA ₄ ⁻	66,89	66,93	67,08	67,17
com NO ₃ ⁻	0,24	0,29	0,37	0,47
Mn ²⁺ livre	37,24	37,57	38,10	38,60
com SO ₄ ²⁻	4,43	4,24	4,07	3,76
com EDTA ₄ ⁻	58,28	58,19	57,83	57,63
com Cl ⁻	0,05			
Cu ²⁺ com EDTA ₄ ⁻	100,00	100,00	100,00	100,00
Zn ²⁺ livre	0,16	0,16	0,17	0,17
com SO ₄ ²⁻	0,02	0,02	0,02	0,02
com PO ₄ ³⁻	0,02	0,02	0,01	0,01
com EDTA ₄ ⁻	99,80	99,81	99,80	99,79
Co ²⁺ livre	0,16	0,16	0,17	0,17
com SO ₄ ²⁻	0,02	0,02	0,02	0,02
com EDTA ₄ ⁻	99,80	99,81	99,80	99,80
pH	5,41	5,38	5,37	5,36

N₁ = 17,3 mmol L⁻¹; N₂ (JADS) = 26,0 mmol L⁻¹; N₃ = 39,0 mmol L⁻¹; N₄ = 58,5 mmol L⁻¹

Anexo 8 – Distribuição das espécies (ligantes) estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) nos meios de cultura suplementados com concentrações de nitrogênio

Ligantes	Meios de cultura			
	N ₁	N ₂ (JADS) (% do total)	N ₃	N ₄
CO ₃ ²⁻ com H ⁺ com H ⁺ (forma sólida)	0,12 99,87	0,12 99,88	0,12 99,88	0,12 99,88
SO ₄ ²⁻ livre com Ca ²⁺ com Mg ²⁺ com K ⁺ com Na ⁺ com Fe ²⁺ com Mn ²⁺ com H ⁺	73,37 15,42 7,76 3,17 0,07 0,10 0,09 0,02	74,53 14,72 7,40 3,08 0,07 0,09 0,09 0,02	75,60 14,04 7,04 3,05 0,07 0,09 0,09 0,02	77,41 12,95 6,48 2,92 0,07 0,08 0,08 0,02
Cl ⁻ livre com Ca ²⁺ com Mg ²⁺ com K ⁺ com Na ⁺	99,67 0,02 0,13 0,15 0,03	99,68 0,02 0,12 0,15 0,03	99,68 0,02 0,12 0,15 0,03	99,69 0,02 0,11 0,14 0,03
NH ₃ ⁻ livre com H ⁺		0,03 99,98	0,02 99,98	0,02 99,98
PO ₄ ³⁻ com Ca ²⁺ com Mg ²⁺ com Fe ²⁺ com H ⁺	6,81 1,46 0,94 90,79	6,60 1,31 0,92 91,17	6,23 1,22 0,89 91,66	5,95 1,09 0,86 92,11
EDTA ₄ ⁻ com Ca ²⁺ com Mg ²⁺ com Fe ²⁺ com Mn ²⁺ com Cu ²⁺ com Zn ²⁺ com Co ²⁺	2,12 0,02 66,89 20,68 2,51 7,57 0,20	2,12 0,02 66,93 20,65 2,51 7,57 0,20	2,09 0,02 67,08 20,52 2,51 7,57 0,20	2,08 0,02 67,17 20,45 2,51 7,57 0,20
B(OH) ₄ ²⁻ livre com H ⁺	0,02 99,98	0,02 99,98	0,02 99,98	0,02 99,98
MoO ₄ ²⁻ livre com H ⁺	95,57 4,43	95,44 4,56	95,44 4,56	95,44 4,56
NO ₃ ⁻ livre	99,99	99,99	99,99	99,99
pH	5,41	5,38	5,37	5,36

N₁ = 17,3 mmol L⁻¹; N₂ (JADS) = 26,0 mmol L⁻¹; N₃ = 39,0 mmol L⁻¹; N₄ = 58,5 mmol L⁻¹

Anexo 9 – Distribuição das espécies (metais) estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) nos meios de cultura suplementados com concentrações de fósforo

Metais	Meios de cultura			
	P ₁	P ₂ (JADS) (% do total)	P ₃	P ₄
Ca ²⁺ livre	87,50	86,21	84,56	82,54
com SO ₄ ²⁻	9,84	9,73	9,57	9,38
com PO ₄ ³⁻	2,58	3,98	5,77	7,98
com EDTA ₄ ⁻	0,08	0,08	0,09	0,11
Mg ²⁺ livre	91,02	90,56	89,81	89,11
com SO ₄ ²⁻	8,13	8,11	8,08	8,11
com PO ₄ ³⁻	0,79	1,31	2,10	1,96
com Cl ⁻	0,04			
com NO ₃ ⁻	0,01	0,01	0,01	
K ⁺ livre	99,06	99,07	99,07	99,06
com SO ₄ ²⁻	0,93	0,93	0,93	0,94
com Cl ⁻	0,01			
Na ⁺ livre	99,34	99,41	99,41	99,41
com SO ₄ ²⁻	0,59	0,59	0,59	0,59
com Cl ⁻	0,07			
Fe ²⁺ livre	19,60	17,25	14,99	12,53
com SO ₄ ²⁻	1,75	1,55	1,35	1,13
com PO ₄ ³⁻	10,23	13,99	17,75	22,11
com EDTA ₄ ⁻	68,09	66,93	65,67	64,04
com NO ₃ ⁻	0,33	0,29	0,24	0,19
Mn ²⁺ livre	39,97	37,57	34,95	31,69
com SO ₄ ²⁻	4,50	4,24	3,96	3,60
com EDTA ₄ ⁻	55,46	58,19	61,09	64,71
com Cl ⁻	0,08			
Cu ²⁺ com EDTA ₄ ⁻	100,00	100,00	100,00	100,00
Zn ²⁺ livre	0,18	0,16	0,14	0,12
com SO ₄ ²⁻	0,02	0,02	0,02	0,01
com PO ₄ ³⁻	0,01	0,02	0,02	0,02
com EDTA ₄ ⁻	99,78	99,81	99,82	99,84
Co ²⁺ livre	0,18	0,16	0,14	0,12
com SO ₄ ²⁻	0,03	0,02	0,02	0,02
com PO ₄ ³⁻			0,02	0,01
com EDTA ₄ ⁻	99,78	99,81	99,82	99,84
pH	5,34	5,38	5,43	5,20

P₁ = 2,0 mmol L⁻¹; P₂ (JADS) = 3,0 mmol L⁻¹; P₃ = 4,5 mmol L⁻¹; P₄ = 6,75 mmol L⁻¹

Anexo 10 – Distribuição das espécies (ligantes) estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) nos meios de cultura suplementados com concentrações de fósforo

Ligantes		Meios de cultura			
		P ₁	P ₂ (JADS) (% do total)	P ₃	P ₄
CO ₃ ⁻	com H ⁺	0,12	0,12	0,13	0,12
	com H ⁺ (forma sólida)	99,88	99,88	99,87	99,88
SO ₄ ²⁻	livre	74,32	74,53	74,80	75,06
	com Ca ²⁺	14,90	14,72	14,49	14,19
	com Mg ²⁺	7,42	7,40	7,37	7,40
	com K ⁺	3,07	3,08	3,09	3,10
	com Na ⁺	0,07	0,07	0,07	0,07
	com Fe ²⁺	0,11	0,09	0,08	0,07
	com Mn ²⁺	0,10	0,09	0,08	0,08
	com H ⁺	0,02	0,02	0,02	0,03
Cl ⁻	livre	99,67	99,68	99,68	99,68
	com Ca ²	0,02	0,02	0,02	0,02
	com Mg ²⁺	0,12	0,12	0,12	0,12
	com K ⁺	0,15	0,15	0,15	0,15
	com Na ⁺	0,03	0,03	0,03	0,03
NH ₃ ⁻	livre	0,02	0,03	0,02	0,01
	com H ⁺	99,98	99,98	99,98	99,99
PO ₄ ³⁻	com Ca ²	6,48	6,60	6,47	5,92
	com Mg ²⁺	1,20	1,31	1,42	0,88
	com Fe ²⁺	1,02	0,92	0,79	0,65
	com H ⁺	91,29	91,17	91,42	92,56
EDTA ₄ ⁻	com Ca ²	1,92	2,12	2,34	2,67
	com Mg ²⁺	0,02	0,02	0,02	0,03
	com Fe ²⁺	68,09	66,93	65,67	64,04
	com Mn ²⁺	19,68	20,65	21,68	22,96
	com Cu ²⁺	2,51	2,51	2,51	2,51
	com Zn ²⁺	7,57	7,57	7,57	7,57
	com Co ²⁺	0,20	0,20	0,20	0,20
B(OH) ₄ ²⁻	livre	0,02	0,02	0,02	0,01
	com H ⁺	99,98	99,98	99,98	99,99
MoO ₄ ²⁻	livre	95,02	95,44	95,91	93,24
	com H ⁺	4,98	4,56	4,09	6,76
NO ₃ ⁻	livre	99,99	99,99	99,99	100,00
pH		5,34	5,38	5,43	5,20

P₁ = 2,0 mmol L⁻¹; P₂ (JADS) = 3,0 mmol L⁻¹; P₃ = 4,5 mmol L⁻¹; P₄ = 6,75 mmol L⁻¹

Anexo 11 – Distribuição das espécies (metais) estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) nos meios de cultura suplementados com concentrações de potássio

Metais	Meios de cultura			
	K ₁	K ₂ (JADS) (% do total)	K ₃	K ₄
Ca ²⁺ livre	85,80	86,21	86,87	87,80
com SO ₄ ²⁻	10,14	9,73	9,14	8,40
com PO ₄ ³⁻	3,98	3,98	3,89	3,65
com Cl ⁻			0,02	0,06
com EDTA ₄ ⁻	0,08	0,08	0,08	0,08
Mg ²⁺ livre	90,19	90,56	90,82	91,43
com SO ₄ ²⁻	8,47	8,11	7,59	6,95
com PO ₄ ³⁻	1,34	1,31	1,36	1,09
com Cl ⁻			0,22	0,52
com NO ₃ ⁻		0,01	0,01	0,01
K ⁺ livre	99,05	99,07	99,02	98,96
com SO ₄ ²⁻	0,95	0,93	0,91	0,86
com Cl ⁻			0,07	0,18
Na ⁺ livre	99,40	99,41	99,05	98,54
com SO ₄ ²⁻	0,60	0,59	0,57	0,54
com Cl ⁻			0,38	0,92
Fe ²⁺ livre	17,20	17,25	17,52	17,87
com SO ₄ ²⁻	1,61	1,55	1,46	1,36
com PO ₄ ³⁻	13,97	13,99	13,66	13,23
com EDTA ₄ ⁻	66,95	66,93	67,08	67,27
com NO ₃ ⁻	0,27	0,29	0,28	0,28
Mn ²⁺ livre	37,43	37,57	37,83	38,12
com SO ₄ ²⁻	4,42	4,24	3,98	3,65
com EDTA ₄ ⁻	58,15	58,19	57,81	57,30
com Cl ⁻			0,39	0,93
Cu ²⁺ com EDTA ₄ ⁻	100,00	100,00	100,00	100,00
Zn ²⁺ livre	0,16	0,16	0,16	0,17
com SO ₄ ²⁻	0,02	0,02	0,02	0,02
com PO ₄ ³⁻	0,02	0,02	0,02	0,01
com EDTA ₄ ⁻	99,81	99,81	99,80	99,80
Co ²⁺ livre	0,16	0,16	0,16	0,17
com SO ₄ ²⁻	0,02	0,02	0,02	0,02
com EDTA ₄ ⁻	99,81	99,81	99,80	99,80
pH	5,40	5,38	5,42	5,33

K₁ = 7,3 mmol L⁻¹; K₂ (JADS) = 11,0 mmol L⁻¹; K₃ = 16,5 mmol L⁻¹; K₄ = 24,75 mmol L⁻¹

Anexo 12 – Distribuição das espécies (ligantes) estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) nos meios de cultura suplementados com concentrações de potássio

Ligantes	Meios de cultura			
	K ₁	K ₂ (JADS) (% do total)	K ₃	K ₄
CO ₃ ⁻ com H ⁺	0,12	0,12	0,12	0,12
com H ⁺ (forma sólida)	99,88	99,88	99,87	99,88
SO ₄ ²⁻ livre	74,57	74,53	74,45	74,29
com Ca ²⁺	15,35	14,72	13,83	12,72
com Mg ²⁺	7,72	7,40	6,92	6,34
com K ⁺	2,08	3,08	4,55	6,40
com Na ⁺	0,07	0,07	0,07	0,07
com Fe ²⁺	0,10	0,09	0,09	0,08
com Mn ²⁺	0,09	0,09	0,09	0,08
com H ⁺	0,02	0,02	0,02	0,02
Cl ⁻ livre	99,72	99,68	99,61	99,51
com Ca ²	0,02	0,02	0,02	0,02
com Mg ²⁺	0,12	0,12	0,12	0,11
com K ⁺	0,10	0,15	0,22	0,32
com Na ⁺	0,03	0,03	0,03	0,03
NH ₃ ⁻ livre	0,02	0,03	0,02	0,02
com H ⁺	99,98	99,98	99,98	99,98
PO ₄ ³⁻ com Ca ²	6,60	6,60	6,45	6,06
com Mg ²⁺	1,34	1,31	1,36	1,09
com Fe ²⁺	0,92	0,92	0,90	0,87
com H ⁺	91,14	91,17	91,28	91,98
EDTA ₄ ⁻ com Ca ²	2,11	2,12	2,10	2,09
com Mg ²⁺	0,02	0,02	0,02	0,02
com Fe ²⁺	66,95	66,93	67,08	67,27
com Mn ²⁺	20,63	20,65	20,51	20,33
com Cu ²⁺	2,51	2,51	2,51	2,51
com Zn ²⁺	7,57	7,57	7,57	7,57
com Co ²⁺	0,20	0,20	0,20	0,20
B(OH) ₄ ²⁻ livre	0,02	0,02	0,02	0,02
com H ⁺	99,98	99,98	99,98	99,98
MoO ₄ ²⁻ livre	95,46	95,44	95,79	95,14
com H ⁺	4,54	4,56	4,21	4,86
NO ₃ ⁻ livre	99,99	99,99	99,99	99,99
pH	5,40	5,38	5,42	5,33

K₁ = 7,3 mmol L⁻¹; K₂(JADS) = 11,0 mmol L⁻¹; K₃ = 16,5 mmol L⁻¹; K₄ = 24,75 mmol L⁻¹

Anexo 13 – Distribuição das espécies (metais) estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) nos meios de cultura suplementados com concentrações de cálcio

Metais	Meios de cultura				
	Ca ₁	Ca ₂ (JADS) (% do total)	Ca ₃	Ca ₄	
Ca ²⁺	livre	85,26	86,21	87,54	89,21
	com SO ₄ ²⁻	10,52	9,73	8,70	7,46
	com PO ₄ ³⁻	4,13	3,98	3,65	3,21
	com Cl ⁻			0,02	0,05
	com EDTA ₄ ⁻	0,09	0,08	0,08	0,08
Mg ²⁺	livre	89,79	90,56	91,52	92,73
	com SO ₄ ²⁻	8,80	8,11	7,23	6,16
	com PO ₄ ³⁻	1,39	1,31	1,04	0,63
	com Cl ⁻			0,20	0,47
	com NO ₃ ⁻		0,01	0,01	0,01
K ⁺	livre	99,01	99,07	99,08	99,08
	com SO ₄ ²⁻	0,99	0,93	0,86	0,76
	com Cl ⁻			0,07	0,16
Na ⁺	livre	99,37	99,41	99,12	88,71
	com SO ₄ ²⁻	0,63	0,59	0,54	0,47
	com Cl ⁻			0,34	0,82
Fe ²⁺	livre	16,64	17,25	18,20	19,52
	com SO ₄ ²⁻	1,63	1,55	1,44	1,30
	com PO ₄ ³⁻	14,14	13,99	13,59	12,99
	com EDTA ₄ ⁻	67,33	66,93	66,47	65,90
	com NO ₃ ⁻	0,26	0,29	0,30	0,30
Mn ²⁺	livre	36,52	37,57	38,96	40,72
	com SO ₄ ²⁻	4,41	4,24	3,87	3,40
	com EDTA ₄ ⁻	58,98	58,19	56,81	54,99
	com Cl ⁻			0,36	0,89
Cu ²⁺	com EDTA ₄ ⁻	100,00	100,00	100,00	100,00
Zn ²⁺	livre	0,16	0,16	0,17	0,19
	com SO ₄ ²⁻	0,02	0,02	0,02	0,02
	com PO ₄ ³⁻	0,02	0,02	0,01	0,01
	com EDTA ₄ ⁻	99,82	99,81	99,79	99,78
Co ²⁺	livre	0,16	0,16	0,17	0,19
	com SO ₄ ²⁻	0,02	0,02	0,02	0,02
	com EDTA ₄ ⁻	99,82	99,81	99,79	99,78
pH	5,40	5,38	5,32	5,12	

Ca₁ = 3,3 mmol L⁻¹; Ca₂ (JADS) = 5,0 mmol L⁻¹; Ca₃ = 7,5 mmol L⁻¹; Ca₄ = 11,25 mmol L⁻¹

Anexo 14 – Distribuição das espécies (ligantes) estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) nos meios de cultura suplementados com concentrações de cálcio

Ligantes	Meios de cultura			
	Ca ₁	Ca ₂ (JADS) (% do total)	Ca ₃	Ca ₄
CO ₃ ⁻ com H ⁺	0,12	0,12	0,12	0,12
com H ⁺ (forma sólida)	99,88	99,88	99,88	99,83
SO ₄ ²⁻ livre	77,87	74,53	70,38	66,39
com Ca ²⁺	10,52	14,72	19,94	25,26
com Mg ²⁺	8,03	7,40	6,59	5,61
com K ⁺	3,29	3,08	2,84	2,50
com Na ⁺	0,08	0,07	0,07	0,06
com Fe ²⁺	0,10	0,09	0,09	0,08
com Mn ²⁺	0,10	0,09	0,08	0,07
com H ⁺	0,02	0,02	0,02	0,03
Cl ⁻ livre	99,68	99,68	99,67	99,66
com Ca ²	0,01	0,02	0,03	0,05
com Mg ²⁺	0,12	0,12	0,12	0,11
com K ⁺	0,15	0,15	0,15	0,14
com Na ⁺	0,03	0,03	0,03	0,03
NH ₃ ⁻ livre	0,02	0,03	0,02	0,01
com H ⁺	99,98	99,98	99,98	99,99
PO ₄ ³⁻ com Ca ²	4,53	6,60	9,18	11,91
com Mg ²⁺	1,39	1,31	1,04	0,63
com Fe ²⁺	0,93	0,92	0,90	0,86
com H ⁺	93,14	91,17	88,89	86,60
EDTA ₄ ⁻ com Ca ²	1,44	2,12	3,06	4,27
com Mg ²⁺	0,02	0,02	0,02	0,02
com Fe ²⁺	67,33	66,93	66,47	65,90
com Mn ²⁺	20,93	20,65	20,16	19,51
com Cu ²⁺	2,51	2,51	2,51	2,51
com Zn ²⁺	7,57	7,57	7,57	7,57
com Co ²⁺	0,20	0,20	0,20	0,20
com H ⁺				0,02
B(OH) ₄ ²⁻ livre	0,02	0,02	0,02	0,01
com H ⁺	99,98	99,98	99,98	99,99
MoO ₄ ²⁻ livre	95,47	95,44	94,75	92,49
com H ⁺	4,53	4,56	5,25	7,51
NO ₃ ⁻ livre	99,99	99,99	99,99	99,99
pH	5,40	5,38	5,32	5,12

Ca₁ = 3,3 mmol L⁻¹; Ca₂ (JADS) = 5,0 mmol L⁻¹; Ca₃ = 7,5 mmol L⁻¹; Ca₄ = 11,25 mmol L⁻¹

Anexo 15 – Distribuição das espécies (metais) estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) nos meios de cultura suplementados com concentrações de magnésio

Metais	Meios de cultura				
	Mg ₁	Mg ₂ (JADS) (% do total)	Mg ₃	Mg ₄	
Ca ²⁺	livre	81,19	86,21	86,67	87,47
	com SO ₄ ²⁻	15,06	9,73	9,27	8,58
	com PO ₄ ³⁻	3,66	3,98	3,98	3,87
	com EDTA ₄ ⁻	0,08	0,08	0,08	0,10
Mg ²⁺	livre	86,15	90,56	90,79	91,46
	com SO ₄ ²⁻	12,69	8,11	7,71	7,12
	com PO ₄ ³⁻	1,15	1,31	1,48	1,40
	com NO ₃ ⁻		0,01	0,01	0,01
K ⁺	livre	98,48	99,07	99,10	99,15
	com SO ₄ ²⁻	1,52	0,93	0,90	0,85
Na ⁺	livre	99,04	99,41	99,43	99,46
	com SO ₄ ²⁻	0,96	0,59	0,57	0,54
Fe ²⁺	livre	16,72	17,25	17,42	17,70
	com SO ₄ ²⁻	2,46	1,55	1,48	1,38
	com PO ₄ ³⁻	13,36	13,99	13,81	13,57
	com EDTA ₄ ⁻	67,22	66,93	66,97	67,02
	com NO ₃ ⁻	0,24	0,29	0,31	0,34
Mn ²⁺	livre	35,83	37,57	37,87	38,32
	com SO ₄ ²⁻	6,65	4,24	4,05	3,37
	com EDTA ₄ ⁻	57,52	58,19	58,07	57,92
Cu ²⁺	com EDTA ₄ ⁻	100,00	100,00	100,00	100,00
Zn ²⁺	livre	0,16	0,16	0,16	0,17
	com SO ₄ ²⁻	0,03	0,02	0,02	0,02
	com PO ₄ ³⁻	0,01	0,02	0,02	0,02
	com EDTA ₄ ⁻	99,80	99,81	99,80	99,80
Co ²⁺	livre	0,16	0,16	0,16	0,17
	com SO ₄ ²⁻	0,04	0,02	0,02	0,02
	com EDTA ₄ ⁻	99,80	99,81	99,81	99,80
pH		5,35	5,38	5,45	5,43

Mg₁ = 2,0 mmol L⁻¹; Mg₂ (JADS) = 3,0 mmol L⁻¹; Mg₃ = 4,5 mmol L⁻¹; Mg₄ = 6,75 mmol L⁻¹

Anexo 16 – Distribuição das espécies (ligantes) estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) meios de cultura suplementados com concentrações de magnésio

Ligantes		Meios de cultura			
		Mg ₁	Mg ₂ (JADS) (% do total)	Mg ₃	Mg ₄
CO ₃ ⁻	com H ⁺	0,12	0,12	0,13	0,13
	com H ⁺ (forma sólida)	99,88	99,88	99,87	99,87
SO ₄ ²⁻	livre	77,34	74,53	72,32	69,42
	com Ca ²⁺	14,38	14,72	14,03	12,98
	com Mg ²⁺	4,83	7,40	10,41	14,55
	com K ⁺	3,17	3,08	2,99	2,80
	com Na ⁺	0,07	0,07	0,07	0,06
	com Fe ²⁺	0,09	0,09	0,09	0,08
	com Mn ²⁺	0,09	0,09	0,09	0,08
	com H ⁺	0,02	0,02	0,02	0,01
Cl ⁻	livre	99,72	99,68	99,62	99,53
	com Ca ²	0,02	0,02	0,02	0,02
	com Mg ²⁺	0,08	0,12	0,18	0,27
	com K ⁺	0,15	0,15	0,15	0,15
	com Na ⁺	0,03	0,03	0,03	0,03
NH ₃ ⁻	livre	0,02	0,03	0,02	0,02
	com H ⁺	99,98	99,98	99,98	99,98
PO ₄ ³⁻	com Ca ²	6,08	6,60	6,60	6,42
	com Mg ²⁺	0,76	1,31	2,18	3,14
	com Fe ²⁺	0,89	0,92	0,91	0,90
	com H ⁺	92,28	91,17	90,30	89,54
EDTA ₄ ⁻	com Ca ²	2,07	2,12	2,11	2,09
	com Mg ²⁺	0,01	0,02	0,03	0,05
	com Fe ²⁺	67,22	66,93	66,97	67,02
	com Mn ²⁺	20,41	20,65	20,61	20,55
	com Cu ²⁺	2,51	2,51	2,51	2,51
	com Zn ²⁺	7,57	7,57	7,57	7,57
	com Co ²⁺	0,20	0,20	0,20	0,20
B(OH) ₄ ²⁻	livre	0,02	0,02	0,02	0,02
	com H ⁺	99,98	99,98	99,98	99,98
MoO ₄ ²⁻	livre	95,13	95,44	96,08	95,97
	com H ⁺	4,87	4,56	3,92	4,03
NO ₃ ⁻	livre	100,00	99,99	99,99	99,99
pH		5,35	5,38	5,45	5,43

Mg₁ = 2,0 mmol L⁻¹; Mg₂ (JADS) = 3,0 mmol L⁻¹; Mg₃ = 4,5 mmol L⁻¹; Mg₄ = 6,75 mmol L⁻¹

Anexo 17 – Distribuição das espécies (metais) estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) nos meios de cultura suplementados com concentrações de enxofre

Metais	Meios de cultura			
	S ₁	S ₂ (JADS) (% do total)	S ₃	S ₄
Ca ²⁺ livre	87,75	86,21	82,80	77,90
com SO ₄ ²⁻	7,00	9,73	13,37	18,51
com PO ₄ ³⁻	4,16	3,98	3,75	3,52
com EDTA ₄ ⁻	0,09	0,08	0,08	0,08
Mg ²⁺ livre	92,68	90,56	87,52	83,06
com SO ₄ ²⁻	5,81	8,11	11,23	15,68
com PO ₄ ³⁻	1,49	1,31	1,24	1,25
com NO ₃ ⁻	0,01	0,01		
K ⁺ livre	99,35	99,07	98,64	98,02
com SO ₄ ²⁻	0,65	0,93	1,36	1,98
Na ⁺ livre	99,59	99,41	99,14	98,74
com SO ₄ ²⁻	0,41	0,59	0,86	1,26
Fe ²⁺ livre	17,53	17,25	16,93	16,38
com SO ₄ ²⁻	1,10	1,55	2,17	3,09
com PO ₄ ³⁻	14,26	13,99	13,48	12,87
com EDTA ₄ ⁻	66,80	66,93	67,15	67,43
com NO ₃ ⁻	0,31	0,29	0,26	0,22
Mn ²⁺ livre	38,47	37,57	36,44	34,72
com SO ₄ ²⁻	3,04	4,24	5,88	8,25
com EDTA ₄ ⁻	58,50	58,19	57,68	57,03
Cu ²⁺ com EDTA ₄ ⁻	100,00	100,00	100,00	100,00
Zn ²⁺ livre	0,16	0,16	0,16	0,15
com SO ₄ ²⁻	0,01	0,02	0,03	0,04
com PO ₄ ³⁻	0,02	0,02	0,01	0,01
com EDTA ₄ ⁻	99,81	99,80	99,80	99,79
Co ²⁺ livre	0,17	0,16	0,16	0,15
com SO ₄ ²⁻	0,02	0,02	0,03	0,05
com EDTA ₄ ⁻	99,81	99,81	99,80	99,79
pH	5,43	5,38	5,39	5,42

S₁ = 2,29 mmol L⁻¹; S₂ (JADS) = 3,29 mmol L⁻¹; S₃ = 4,79 mmol L⁻¹; S₄ = 7,04 mmol L⁻¹

Anexo 18 – Distribuição das espécies (ligantes) estimadas pela técnica da especiação iônica utilizando o software GEOCHEM-PC (PACKER; NORVELL; CHANEY, 1995) nos meios de cultura suplementados com concentrações de enxofre

Ligantes		Meios de cultura			
		S ₁	S ₂ (JADS)	S ₃	S ₄
CO ₃ ²⁻	com H ⁺	0,13	0,12	0,12	0,13
	com H ⁺ (forma sólida)	99,87	99,88	99,88	99,87
SO ₄ ²⁻	livre	73,63	74,53	74,54	76,88
	com Ca ²⁺	15,32	14,72	14,00	13,10
	com Mg ²⁺	7,66	7,40	7,08	6,69
	com K ⁺	3,12	3,08	3,11	3,07
	com Na ⁺	0,07	0,07	0,07	0,07
	com Fe ²⁺	0,10	0,09	0,09	0,09
	com Mn ²⁺	0,09	0,09	0,09	0,08
	com H ⁺	0,02	0,02	0,02	0,02
Cl ⁻	livre	99,67	99,68	99,68	99,70
	com Ca ²⁺	0,02	0,02	0,02	0,02
	com Mg ²⁺	0,13	0,12	0,12	0,11
	com K ⁺	0,15	0,15	0,15	0,14
	com Na ⁺	0,03	0,03	0,03	0,03
NH ₃ ⁻	livre	0,02	0,03	0,02	0,02
	com H ⁺	99,98	99,98	99,98	99,98
PO ₄ ³⁻	com Ca ²⁺	6,90	6,60	6,22	5,83
	com Mg ²⁺	1,49	1,31	1,24	1,25
	com Fe ²⁺	0,94	0,92	0,89	0,85
	com H ⁺	90,66	91,17	91,65	92,06
EDTA ₄ ⁻	com Ca ²⁺	2,14	2,12	2,08	2,03
	com Mg ²⁺	0,02	0,02	0,02	0,02
	com Fe ²⁺	66,80	66,93	67,15	67,43
	com Mn ²⁺	20,76	20,65	20,47	20,23
	com Cu ²⁺	2,51	2,51	2,51	2,51
	com Zn ²⁺	7,57	7,57	7,57	7,57
	com Co ²⁺	0,20	0,20	0,20	0,20
B(OH) ₄ ²⁻	livre	0,02	0,02	0,02	0,02
	com H ⁺	99,98	99,98	99,98	99,98
MoO ₄ ²⁻	livre	95,84	95,44	95,43	95,89
	com H ⁺	4,16	4,56	4,57	4,11
NO ₃ ⁻	livre	99,99	99,99	99,99	100,00
pH		5,43	5,38	5,39	5,42

S₁ = 2,29 mmol L⁻¹; S₂ (JADS) = 3,29 mmol L⁻¹; S₃ = 4,79 mmol L⁻¹; S₄ = 7,04 mmol L⁻¹

Anexo 19 - Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis aleatórias relacionadas com o crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de macronutrientes aos 21 dias de cultivo (n = 57)

	MF	MS	MS (%)	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Cl	Na	PST	CNEST	PROL
MF	1																		
MS	0,76*	1																	
MS (%)	-0,65*	0,03	1																
N	0,50*	0,23	-0,53*	1															
P	0,01	-0,13	-0,24	-0,14	1														
K	0,14	-0,26	-0,52*	0,09	0,05	1													
Ca	-0,32*	-0,19	0,34*	-0,25	-0,51*	-0,01	1												
Mg	-0,09	-0,11	0,01	-0,17	-0,17	0,25	0,35*	1											
S	0,48*	0,62*	-0,04	0,35*	-0,12	-0,11	-0,34*	-0,45*	1										
B	-0,03	0,26	0,38*	-0,15	0,05	-0,61*	-0,05	-0,37*	0,03	1									
Cu	-0,33*	-0,58*	-0,14	0,06	-0,08	0,18	0,49*	0,15	-0,56*	-0,18	1								
Fe	-0,09	0,002	0,15	0,06	-0,02	-0,11	0,02	-0,31*	-0,16	0,47*	0,24	1							
Mn	-0,08	-0,09	0,08	0,09	-0,37*	0,01	0,46*	0,05	-0,31*	0,36*	0,51*	0,63*	1						
Zn	0,49*	0,58*	-0,09	0,36*	-0,22	0,04	-0,32*	-0,30*	0,77*	-0,05	-0,66*	0,01	-0,14	1					
Cl	0,07	-0,09	-0,17	-0,17	-0,03	0,48*	0,28*	-0,03	-0,15	-0,02	0,34*	0,29*	0,38*	-0,16	1				
Na	0,04	0,11	0,09	-0,14	0,21	-0,19	-0,10	-0,35*	-0,01	0,46*	-0,18	0,18	0,09	0,003	-0,04	1			
PST	-0,29*	-0,12	0,29*	-0,19	-0,07	-0,14	-0,04	-0,01	-0,08	0,01	-0,13	-0,09	-0,20	-0,12	-0,47*	0,18	1		
CNEST	-0,16	0,03	0,25	-0,03	-0,12	-0,04	0,004	-0,01	0,33*	-0,37*	-0,37*	-0,31*	-0,53*	0,45*	-0,32*	-0,28*	0,12	1	
PROL	0,005	0,13	0,15	0,08	-0,19	-0,21	-0,14	-0,31*	0,47*	-0,05	-0,29*	-0,18	-0,35*	0,28*	-0,47*	0,17	0,61*	0,34*	1

* Significativo p=0,05 (MF = massa fresca; MS = massa seca; MS (%) = porcentagem da massa seca; PST = proteínas solúveis totais; CNEST = carboidratos não-estruturais solúveis totais; PROL = prolina)

Anexo 20 – Correlação ‘Pairwise’ para análise multivariada por componentes principais ‘biplot’ (GABRIEL, 1971)
(n=19)

(continua)

Variáveis		Correlações	p
Y	X		
Massa Seca	Massa fresca	0,7733	0,0001
Massa Seca (%)	Massa fresca	-0,6519	0,0025
Massa Seca (%)	Massa seca	-0,0397	0,8717
N	Massa fresca	0,5608	0,0125
N	Massa seca	0,2769	0,2511
N	Massa seca (%)	-0,5939	0,0073
P	Massa fresca	0,0176	0,9341
P	Massa seca	-0,1261	0,6070
P	Massa seca (%)	-0,2533	0,2955
P	N	-0,1816	0,4568
K	Massa fresca	0,1486	0,5437
K	Massa seca	-0,2980	0,2153
K	Massa seca (%)	-0,5930	0,0075
K	N	0,1178	0,6309
K	P	0,0085	0,9723
Ca	Massa fresca	-0,3352	0,1606
Ca	Massa seca	-0,2082	0,3923
Ca	Massa seca (%)	0,3643	0,1252
Ca	N	-0,3353	0,1606
Ca	P	-0,5668	0,0114
Ca	K	-0,0103	0,9668
Mg	Massa fresca	-0,0941	0,7016
Mg	Massa seca	-0,1172	0,6329
Mg	Massa seca (%)	-0,0022	0,9929
Mg	N	-0,1940	0,4261
Mg	P	-0,2006	0,1401
Mg	K	0,2351	0,3325
Mg	Ca	0,3628	0,1269
S	Massa fresca	0,4899	0,0332
S	Massa seca	0,6592	0,0021
S	Massa seca (%)	-0,0131	0,9575
S	N	0,3567	0,1338
S	P	-0,1618	0,5080
S	K	-0,1603	0,5122
S	Ca	-0,3908	0,0980
S	Mg	-0,4778	0,0386
B	Massa fresca	-0,0319	0,8967
B	Massa seca	0,3400	0,1543
B	Massa seca (%)	0,4868	0,0346
B	N	-0,2087	0,3913
B	P	0,0857	0,7272
B	K	-0,6766	0,0015
B	Ca	-0,0513	0,8348
B	Mg	-0,4008	0,0890
B	S	0,0290	0,9063
Cu	Massa fresca	-0,3384	0,1564
Cu	Massa seca	-0,5986	0,0068
Cu	Massa seca (%)	-0,1486	0,5438
Cu	N	0,0430	0,8611
Cu	P	-0,1261	0,6069

Anexo 20 – Correlação ‘Pairwise’ para análise multivariada por componentes principais ‘biplot’ (GABRIEL, 1971)
(n=19)

Variáveis		Correlações	p
Y	X		
Cu	K	0,1775	0,4671
Cu	Ca	0,5181	0,0231
Cu	Mg	0,1618	0,5080
Cu	S	-0,5983	0,0068
Cu	B	-0,1751	0,4733
Fe	Massa fresca	-0,1021	0,6774
Fe	Massa seca	0,0094	0,9697
Fe	Massa seca (%)	0,1825	0,4545
Fe	N	0,0178	0,9424
Fe	P	-0,0642	0,7939
Fe	K	-0,1195	0,6260
Fe	Ca	0,0473	0,8476
Fe	Mg	-0,3249	0,1748
Fe	S	-0,1982	0,4160
Fe	B	0,5704	0,0108
Fe	Cu	0,2357	0,3313
Mn	Massa fresca	-0,0834	0,7343
Mn	Massa seca	-0,0747	0,7613
Mn	Massa seca (%)	0,1042	0,6711
Mn	N	0,0653	0,7905
Mn	P	-0,4384	0,0604
Mn	K	0,0266	0,9138
Mn	Ca	0,4809	0,0371
Mn	Mg	0,0761	0,7567
Mn	S	-0,3761	0,1125
Mn	B	0,3759	0,1127
Mn	Cu	0,5276	0,0203
Mn	Fe	0,7036	0,0008
Zn	Massa fresca	0,5003	0,0291
Zn	Massa seca	0,6050	0,0061
Zn	Massa seca (%)	-0,0871	0,7230
Zn	N	0,3929	0,0961
Zn	P	-0,2515	0,2989
Zn	K	0,0297	0,9040
Zn	Ca	-0,3556	0,1351
Zn	Mg	-0,3138	0,1907
Zn	S	0,7724	0,0001
Zn	B	-0,0413	0,8667
Zn	Cu	-0,7003	0,0008
Zn	Fe	-0,0035	0,9887
Zn	Mn	-0,1721	0,4810
Cl	Massa fresca	0,0680	0,7821
Cl	Massa seca	-0,1016	0,6788
Cl	Massa seca (%)	-0,1819	0,4562
Cl	N	-0,1919	0,4312
Cl	P	-0,0304	0,9017
Cl	K	0,5302	0,0195
Cl	Ca	0,2976	0,2159
Cl	Mg	-0,0218	0,9294
Cl	S	-0,1529	0,5319

Anexo 20 – Correlação ‘Pairwise’ para análise multivariada por componentes principais ‘biplot’ (GABRIEL, 1971)
(n=19)

Variáveis		Correlações	p
Y	X		
Cl	B	-0,0226	0,9269
Cl	Cu	0,3580	0,1323
Cl	Fe	0,3454	0,1475
Cl	Mn	0,4055	0,0850
Cl	Zn	-0,1524	0,5334
Na	Massa fresca	0,0527	0,8303
Na	Massa seca	0,1038	0,6724
Na	Massa seca (%)	0,0726	0,7679
Na	N	-0,2094	0,3895
Na	P	0,1912	0,4329
Na	K	-0,3062	0,2023
Na	Ca	-0,1976	0,4174
Na	Mg	-0,4892	0,0335
Na	S	-0,0055	0,9821
Na	B	0,6370	0,0034
Na	Cu	-0,2434	0,3153
Na	Fe	0,2777	0,2497
Na	Mn	0,1137	0,6431
Na	Zn	0,0035	0,9885
Na	Cl	-0,0488	0,8428
PST	Massa fresca	-0,3102	0,1962
PST	Massa seca	-0,1483	0,5445
PST	Massa seca (%)	0,3024	0,2083
PST	N	-0,1967	0,4196
PST	P	-0,0823	0,7377
PST	K	-0,1582	0,5178
PST	Ca	-0,0855	0,7280
PST	Mg	0,0067	0,9782
PST	S	-0,0805	0,7432
PST	B	0,0734	0,7653
PST	Cu	-0,1634	0,5038
PST	Fe	-0,0950	0,6990
PST	Mn	-0,2501	0,3018
PST	Zn	-0,1378	0,5736
PST	Cl	-0,05251	0,0210
PST	Na	0,2600	0,2823
CNET	Massa fresca	-0,1659	0,4974
CNET	Massa seca	0,0179	0,9419
CNET	Massa seca (%)	0,2428	0,3166
CNET	N	-0,0243	0,9213
CNET	P	-0,1275	0,6030
CNET	K	-0,0516	0,8338
CNET	Ca	-0,0207	0,9330
CNET	Mg	-0,0112	0,9636
CNET	S	0,3565	0,1341
CNET	B	-0,4467	0,0552
CNET	Cu	-0,3861	0,1025
CNET	Fe	-0,3530	0,1382
CNET	Mn	-0,5575	0,0131
CNET	Zn	0,4727	0,0410
CNET	Cl	-0,3342	0,1620

Anexo 20 – Correlação ‘Pairwise’ para análise multivariada por componentes principais ‘biplot’ (GABRIEL, 1971)
(n=19)

Variáveis		Correlações	p
Y	X		
CNET	Na	-0,4230	0,0712
CNET	PST	0,1045	0,6704
PROL	Massa fresca	0,0058	0,9813
PROL	Massa seca	0,1313	0,5920
PROL	Massa seca (%)	0,1604	0,5119
PROL	N	0,0753	0,7562
PROL	P	-0,1939	0,4264
PROL	K	-0,2262	0,3517
PROL	Ca	-0,1669	0,4946
PROL	Mg	-0,3374	0,1578
PROL	S	0,4939	0,0316
PROL	B	-0,0340	0,8902
PROL	Cu	-0,2967	0,2173
PROL	Fe	-0,2163	0,3737
PROL	Mn	-0,3668	0,1224
PROL	Zn	0,2925	0,2243
PROL	Cl	-0,4831	0,0361
PROL	Na	0,2278	0,3482
PROL	PST	0,6748	0,0015
PROL	CNET	0,3397	0,1548

Significativo para valor >0,65 nos elementos dos autovetores