

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

Aspectos morfofisiológicos na clonagem de *Eucalyptus benthamii*

Gilvano Ebling Brondani

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

**Piracicaba
2012**

Gilvano Ebling Brondani
Engenheiro Florestal

Aspectos morfofisiológicos na clonagem de *Eucalyptus benthamii*

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

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

**Piracicaba
2012**

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

Brondani, Gilvano Ebling
Aspectos morfofisiológicos na clonagem de *Eucalyptus benthamii* / Gilvano Ebling
Brondani. - - Piracicaba, 2012.
184 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Clonagem 2. Eucalipto 3. Mudanças 4. Micropropagação vegetal 5. Nutrição vegetal
6. Regulador de crescimento vegetal 7. Reprodução assexuada I. Título

CDD 634.9734
B869a

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

Dedico esse trabalho:

Aos meus pais, José Amauri e Marisa

Aos meus irmãos, André e Juliana

BIOGRAFIA

Gilvano Ebling Brondani, filho de José Amauri Camponogara Brondani e Marisa Ebling Brondani, nasceu em 8 de outubro de 1982, no município de São Pedro do Sul, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Em 1996, concluiu o Ensino Fundamental e, em 1999 o Ensino Médio, ambos cursados na Escola Estadual de 1º e 2º Graus Tito Ferrari, em São Pedro do Sul, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Em março de 2001, via aprovação em vestibular, ingressou no curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul, diplomando-se Engenheiro Florestal no ano de 2006.

Em março de 2006 ingressou no curso de Mestrado em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura e Melhoramento de Espécies Florestais, da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, Estado do Paraná, defendendo a Dissertação em março de 2008.

Em julho de 2008 ingressou no curso de Doutorado em Recursos Florestais, Área de Concentração em Silvicultura e Manejo Florestal, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba, Estado de São Paulo, defendendo a Tese no primeiro semestre de 2012.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, por toda confiança, respeito, esforço, incentivo e amor, características que sustentam os pilares de nossa vida.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), pela oportunidade de aprendizado e complementação da minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, a qual possibilitou a realização do curso e dedicação exclusiva aos trabalhos.

À Embrapa Florestas, pelo suporte prestado durante as análises laboratoriais.

Ao Professor da ESALQ, Dr. Marcílio de Almeida, pela orientação, conselhos, críticas e pela amizade.

Ao professor da ESALQ, Dr. Antonio Natal Gonçalves, professor da North Carolina State University, Dr. José Luiz Stape, ao pesquisador da Embrapa Florestas, Dr. Ivar Wendling, e da *InVitroPalm* Consultoria, Estudo e Desenvolvimento Biológico Ltda., em nome da Dr^a. Cristina Vireira de Almeida, por todos os conselhos, críticas, sugestões e pela amizade.

À Planflora Mudas Florestais, em nome do Eng. Florestal Laurindo Salante pela disponibilização dos genótipos selecionados de *Eucalyptus benthamii*.

Aos funcionários da ESALQ, em especial ao José Roberto Romanini.

Aos funcionários da Embrapa Florestas, em especial ao Dr. Fabrício Augusto Hansel.

Aos colegas de laboratório e de curso, Heron, Francisco, Leandro, Katherine, Érika, Lívia, Fabiane, Gabriela, Germana, Natália, Thaís, Rafaela, Marcos, Ângela, Felipe e Javier, pelo convívio, coleguismo e amizade.

Aos companheiros de república, Kuang, Vinícius, Diego, Vanclei, Djair e Elias pela amizade e companheirismo.

Aos amigos, Elaine, André, Enéas, Tiago, Marcelino, Renato e Giovani.

Em especial a Marla, por toda ajuda prestada, compreensão, amizade, incentivo e amor.

Aos componentes da Banca Examinadora, por aceitarem fazer parte desse trabalho e contribuir com os seus conhecimentos.

As demais pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

O mundo é como um espelho que devolve a cada pessoa o reflexo de seus próprios pensamentos. A maneira como você encara a vida é que faz toda diferença.

Luís Fernando Veríssimo

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	17
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Revisão bibliográfica	20
1.1.1 Importância silvicultural do <i>Eucalyptus benthamii</i>	20
1.1.2 Miniestaquia como alternativa de clonagem	23
1.1.3 Enraizamento adventício vs nutrição mineral	26
1.1.3.1 Zinco	28
1.1.3.2 Boro	29
1.1.3.3 Auxina	31
1.1.3.4 Carboidrato	32
1.1.4 Micropropagação de <i>Eucalyptus</i>	33
Referências	36
2 AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE MINIJARDIM CLONAL DE <i>Eucalyptus benthamii</i> EM RELAÇÃO AO ZN, B E COLETAS DE BROTAÇÕES	49
Resumo	49
Abstract	49
2.1 Introdução	50
2.2 Material e métodos	53
2.2.1 Caracterização geral	53
2.2.2 Constituição do minijardim clonal	53
2.2.3 Manejo das minicepas	55
2.2.4 Tratamentos e delineamento experimental	56
2.2.4.1 Sobrevivência de minicepas e produção de miniestacas	56
2.2.4.2 Teor foliar de nutrientes	57
2.2.4.3 Teor foliar de carboidratos solúveis não estruturais	58
2.2.5 Análise estatística dos dados	58
2.3 Resultados	59
2.3.1 Sobrevivência de minicepas e produção de miniestacas	59
2.3.2 Teor foliar de nutrientes	70
2.3.3 Teor foliar de carboidratos solúveis não estruturais	80
2.4 Discussão	82

2.5 Conclusões	92
Referências.....	93
3 ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE <i>Eucalyptus benthamii</i> : EFEITO DO GENÓTIPO, APLICAÇÃO DE AIB, ZN, B E COLETAS DE BROTAÇÕES	101
Resumo.....	101
Abstract	101
3.1 Introdução	102
3.2 Material e métodos.....	105
3.2.1 Caracterização geral.....	105
3.2.2 Constituição do minijardim clonal.....	105
3.2.3 Manejo das minicepas.....	106
3.2.4 Coleta das brotações e preparo das miniestacas.....	107
3.2.5 Tratamentos e delineamento experimental	108
3.2.5.1 Variação de Zn e B na solução nutritiva.....	108
3.2.5.2 Aplicação de AIB.....	108
3.2.6 Condições de enraizamento	109
3.2.7 Análise estatística dos dados.....	109
3.3 Resultados	110
3.4 Discussão	119
3.5 Conclusões	123
Referências.....	124
4 DINÂMICA DE ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE <i>Eucalyptus benthamii</i>	131
Resumo.....	131
Abstract	131
4.1 Introdução	132
4.2 Material e métodos.....	134
4.2.1 Caracterização geral.....	134
4.2.2 Constituição do minijardim clonal e manejo das minicepas.....	134
4.2.3 Preparo das miniestacas	136
4.2.4 Tratamentos e delineamento experimental	136
4.2.5 Análise histológica.....	136
4.2.6 Condições de enraizamento	137
4.2.7 Análise estatística dos dados.....	137
4.3 Resultados	138

4.4 Discussão	143
4.5 Conclusões.....	146
Referências	147
5 MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Eucalyptus benthamii</i> VISANDO A FORMAÇÃO DE UM MICROJARDIM CLONAL	151
Resumo	151
Abstract.....	151
5.1 Introdução.....	152
5.2 Material e métodos	155
5.2.1 Caracterização geral	155
5.2.2 Coleta das brotações e preparo dos explantes	155
5.2.3 Estabelecimento <i>in vitro</i> da cultura	155
5.2.4 Tratamentos e delineamento experimental	156
5.2.4.1 Multiplicação.....	156
5.2.4.2 Alongamento	156
5.2.4.3 Enraizamento <i>in vitro</i> , <i>ex vitro</i> e aclimatização	157
5.2.5 Preparo do meio de cultura e condições <i>in vitro</i>	158
5.2.6 Análise histológica	158
5.2.7 Análise estatística dos dados	159
5.3 Resultados.....	159
5.3.1 Estabelecimento e multiplicação	159
5.3.2 Alongamento	166
5.3.3 Enraizamento <i>in vitro</i> , <i>ex vitro</i> e aclimatização	167
5.4 Discussão	170
5.5 Conclusões.....	175
Referências	175
ANEXOS	181

RESUMO

Aspectos morfofisiológicos na clonagem de *Eucalyptus benthamii*

Dentre as poucas espécies de *Eucalyptus* que apresentam aptidão ao cultivo em regiões de baixas temperaturas e a geadas frequentes, destacam-se genótipos de *Eucalyptus benthamii* que representam opções para futuros plantios florestais em diferentes regiões brasileiras. Porém, existem poucas informações quanto a obtenção de mudas clonais, e se focarmos as espécies aconselhadas para o plantio em condições subtropicais, tal carência é ainda maior, principalmente ao considerar os fatores endógenos e exógenos para o enraizamento adventício. Baseado no exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar aspectos morfofisiológicos da clonagem de genótipos de *Eucalyptus benthamii* por meio das técnicas de miniestaquia e micropropagação. Para tanto, o trabalho foi dividido em quatro estudos básicos. O primeiro estudo (Capítulo 2) baseou-se na avaliação da morfofisiologia de um minijardim clonal em relação a diferentes concentrações de Zn e B ao longo de sucessivas coletas de brotações. O segundo estudo (Capítulo 3) foi baseado em avaliar o enraizamento de miniestacas quanto a diferentes concentrações de Zn e B e aplicação de AIB ao longo de sucessivas coletas de brotações. O terceiro estudo (Capítulo 4) baseou-se em avaliar a dinâmica de enraizamento de miniestacas quanto a diferentes concentrações de AIB, tempo ótimo de permanência de miniestacas enraizadas em casa de vegetação e a origem da conexão vascular da raiz emitida. Por fim, o quarto estudo (Capítulo 5) foi baseado no desenvolvimento e estabelecimento de protocolo para a micropropagação visando a produção de microcepas para formar um microjardim clonal. Em termos gerais, a sobrevivência das minicepas, produção de miniestacas por metro quadrado ao ano e os teores foliares de macro e micronutrientes variaram significativamente em relação as concentrações de Zn e B, apresentando diferentes respostas ao longo das coletas de brotações no minijardim clonal. Os teores foliares de carboidratos solúveis não estruturais variaram significativamente de acordo com as coletas de brotações e solução nutritiva, sendo que o aumento das concentrações de Zn e B na solução nutritiva induziu a redução dos teores de carboidratos solúveis não estruturais. A porcentagem de enraizamento dos materiais clonais foi baixa, sendo considerados de difícil propagação pela miniestaquia. A presença de Zn e B na solução nutritiva (concentrações variando de 1,0 a 2,0 mg L⁻¹) associadas a presença de AIB induziram os maiores índices de enraizamento. A aplicação de AIB na concentração de 2.000 mg L⁻¹ favoreceu a indução de raízes, e o intervalo de 35 a 42 dias foi o mais indicado para a permanência das miniestacas enraizadas em casa de vegetação. De acordo com as análises histológicas da rizogênese foi verificado que a raiz adventícia apresentou conexão direta com o câmbio vascular. A multiplicação *in vitro* de gemas axilares dependeu do clone, meio de cultura e concentração de regulador de crescimento e, o alongamento de brotações dependeu do clone e regulador de crescimento. O protocolo de micropropagação foi eficiente para a produção de microplantas de *Eucalyptus benthamii* as quais podem ser usadas para a formação de um microjardim clonal.

Palavras-chave: Enraizamento adventício; Nutrição vegetal; Miniestaquia, Micropropagação; Regulador de crescimento; Reprodução assexuada, Produção de mudas clonais

ABSTRACT

Morphophysiological aspects in the cloning of *Eucalyptus benthamii*

Few *Eucalyptus* species present adaptation for cultivation in regions subject to low temperatures and frequent frosts, and *Eucalyptus benthamii* genotypes may represent options for future forest plantations in different regions of Brazil, in view of its excellent silvicultural performance in these conditions. However, there is little information on obtaining clones, and considering the species recommended for planting in subtropical conditions, this lack of information is even greater, mainly when considering the endogenous and exogenous factors for the adventitious rooting. Based on these information, the present work was aimed the conducting of studies on morphophysiological aspects during the cloning of *Eucalyptus benthamii* through of the mini-cuttings and micropropagation techniques. Therefore, the work was divided into four basic studies. The first study (Chapter 2) was based in evaluate the morphophysiology of a clonal mini-garden regarding to Zn and B concentrations during successive shoot collections. The second study (Chapter 3) was based in evaluate the induction of adventitious rooting in mini-cuttings regarding to genotype, Zn and B concentrations, shoot collections and IBA application. The third study (Chapter 4) was based in evaluate the adventitious rooting percentage of selected genotypes regarding the IBA concentration, optimal time of permanence of rooted mini-cuttings in a greenhouse and the origin of the vascular connection. Finally, the fourth study (Chapter 5) was based in develop a method for cloning of selected genotypes through micropropagation technique for the formation of a clonal micro-garden. In overall terms, mini-stumps survival, mini-cuttings production per square meter per year and foliar content of macro and micronutrients varied significantly in relation to treatments, presenting different responses according to shoots collection of the clonal mini-garden. The content of soluble carbohydrates non-structural of leaves varied regarding the shoots collection and nutrient solution. The increasing of the Zn and B concentrations in the nutrient solution induced reduction of the total content of soluble carbohydrates non-structural of leaves. The adventitious rooting percentage was low, and the genotypes were considered difficult to propagation by mini-cuttings technique. The mini-stumps fertigated with nutrient solutions containing Zn and B (concentrations of 1.0 at 2.0 mg L⁻¹) associated with the IBA application presented the greater adventitious rooting percentage. The IBA application in the concentration of 2,000 mg L⁻¹ resulted in the greater speed of rooting and rooting percentage, and the interval of 35 to 42 days was the most suitable for the permanence of mini-cuttings rooted in a greenhouse. According to the histological analysis of rhizogenesis was verified that the adventitious root presented direct connection to the vascular cambium. The *in vitro* multiplication of axillary buds depends of the genetic material, culture medium and concentration of plant growth regulator and, the shoots elongation depends of the genetic material and plant growth regulator. The micropropagation protocol was efficient for the microplants production of *Eucalyptus benthamii* and can be used to form a clonal micro-garden.

Keywords: Adventitious rooting; Plant nutrition; Mini-cutting technique, Micropropagation; Plant growth regulator; Asexual reproduction, Clones production

1 INTRODUÇÃO

Os plantios florestais, principalmente de espécies exóticas, representam fonte de recursos renováveis de fundamental importância para atender a exigência por produtos derivados de biomassa lenhosa, onde a crescente competição de mercados demanda elevado aprimoramento dos produtos fornecidos, bem como, dos serviços prestados. Dessa forma, ao considerar o potencial das espécies de *Eucalyptus* em produzir madeira para inúmeras aplicações, fez com que esse gênero adquirisse relevância comercial, despertando o interesse em relação a diversos programas de melhoramento em vista a atender o fluxo de mercado.

Em termos de Brasil, as regiões sul e sudeste formam o maior pólo de plantios florestais para finalidades industriais. Contudo, as espécies de eucalipto adaptadas às condições climáticas e economicamente importantes para condições mais frias constituem um grupo muito restrito, sendo que o *Eucalyptus benthamii* apresenta-se como uma espécie potencial para essa finalidade, porém ainda pouco estudada no campo biotecnológico.

A clonagem do *Eucalyptus* vem sendo executada principalmente pela técnica de miniestaquia, a qual tem sido adotada em larga escala por grandes empresas florestais. Em determinadas situações, algumas empresas utilizam a técnica de micropropagação para a produção em larga escala de genótipos selecionados, ou ainda, para o rejuvenescimento de materiais adultos, buscando melhorar os índices de enraizamento. Um dos fatores decisivos para o sucesso de tais técnicas de clonagem refere-se ao enraizamento adventício de propágulos, sendo que estudos envolvendo a nutrição mineral com ação endógena de reguladores de crescimento correlacionados aos aspectos rizogênicos são escassos e, mostram-se essenciais para o aprimoramento da obtenção de mudas de materiais genéticos selecionados considerados de difícil enraizamento.

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

Baseado nesse contexto, o trabalho teve como objetivo geral, gerar informações sobre a morfofisiologia durante a clonagem *Eucalyptus benthamii* por meio das técnicas de miniestaquia e micropropagação, visando estabelecer protocolos de propagação da espécie.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Importância silvicultural do *Eucalyptus benthamii*

O *Eucalyptus* é utilizado em grande escala para o estabelecimento de plantações em áreas tropicais e subtropicais do mundo, representando mais de 19,5 milhões de hectares de florestas plantadas (GFC, 2010). Estima-se que 90 países usam este gênero em plantios comerciais, os quais se destinam ao abastecimento de matéria-prima para as indústrias de celulose, papel, carvão vegetal, chapas de partículas e fibras (FOELKEL, 2007), sendo que o Brasil corresponde a 20% das áreas plantadas com *Eucalyptus* do mundo, atrás apenas da Índia, que representa 22% (GFC, 2010).

O eucalipto é amplamente plantado no Brasil, principalmente nas regiões sul e sudeste, as quais formam o maior pólo consumidor e exportador de madeira oriunda de plantios florestais (ABRAF, 2011; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006). Segundo dados da ABRAF (2011), em 2010 os plantios de *Eucalyptus* no Brasil totalizaram cerca de 4,7 milhões de hectares, apresentando crescimento de 5,3% em relação ao ano base de 2009, sendo que a área de florestas plantadas no Brasil está em contínuo crescimento desde o ano de 2005 (Figura 1).

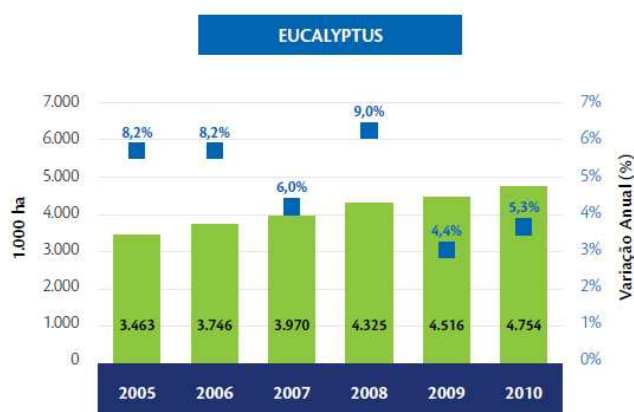


Figura 1 - Evolução da área plantada com florestas de *Eucalyptus* spp. no Brasil (2005 - 2010). Fonte: ABRAF (2011)

Contudo, as condições climáticas limitam a expansão dos plantios comerciais de *Eucalyptus* nas regiões mais frias e de elevada altitude do Brasil, principalmente devido a ocorrência de geadas frequentes, comprometendo significativamente a produtividade. Buscando contornar esse problema, a utilização do *Eucalyptus benthamii* apresenta-se como alternativa para a composição de plantios florestais destinados para finalidades industriais

nessas regiões, em função de suportar temperaturas amenas e de tolerar geadas, apresentado desempenho silvicultural, sob essas condições (GRAÇA; SHIMIZU; TAVARES, 1999), superior as demais espécies (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006).

O *Eucalyptus benthamii* tem sua origem natural situada no litoral oriental de New South Wales, Austrália, com latitude aproximada de 34°00' S e longitude de 150°30' E, em altitudes variando de 140 a 1.000 m, onde é conhecida como “Camden White Gum”. A espécie limita-se, principalmente, a sudoeste da cidade de Sydney em planícies aluviais ao longo do Rio Nepean e seus afluentes (BENSON, 1985; BENSON; MCDOUGALL, 1998; HALL; BROOKER, 1973; KELLY, 1982). A média da temperatura anual na região de ocorrência natural oscila de 13°C a 17°C, com média das temperaturas máximas do mês mais quente entre 26°C a 30°C e média das temperaturas mínimas do mês mais frio de 1°C a 3°C. Além disso, a espécie pode suportar temperaturas mínimas do mês mais frio de -1°C a 3°C, sendo considerada tolerante a geadas e a secas (JOVANOVIC; BOOTH, 2002).

Porém, de acordo com as condições adaptativas, o *Eucalyptus benthamii* pode tolerar temperaturas mais baixas (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006). Em teste de seleção de progênies realizado em Hunan, China, o *Eucalyptus benthamii* ficou entre as espécies mais promissoras para a formação de povoamentos florestais devido a adaptação e desenvolvimento superior em relação às demais espécies testadas após 15 meses do plantio. Nesse período, a média das temperaturas mínimas foi de 3°C a 8°C e, as temperaturas mínimas absolutas situaram-se entre -6°C a -10°C (MUJIU et al., 2003).

A espécie está confinada a uma reduzida população de 6.500 árvores no Vale Kedumba e a três populações remanescentes ao longo do Rio Nepean até a Bacia Bents, Wallacia e Camden (BUTCHER; SKINNER; GARDINER, 2005). Devido a construção da represa de Warragamba Dam, situada em Sydney, e pelas intensas atividades agrícolas no Vale Cox, a área de distribuição natural da população de *Eucalyptus benthamii* foi fortemente reduzida (BENSON, 1985; HALL; BROOKER, 1973). Dessa forma, devido a espécie ser considerada vulnerável ao processo de extinção na região de ocorrência natural, o interesse em seu uso na Austrália está centrado para fins conservacionistas (BENSON; MCDOUGALL, 1998; KJAER et al., 2004; SEIDLICH; DOUGLAS; OCULUS, 1997).

No Brasil, uma das primeiras populações genéticas de *Eucalyptus benthamii* de que se tem registro foi introduzida em 1988 pela Embrapa Florestas-CNPQ, Colombo-PR. Esse povoamento constou de famílias misturadas de sete a dez matrizes da procedência Wentworth Falls (NSW), Austrália, apresentando alta resistência a geada, rápido crescimento, boa forma de fuste e alta homogeneidade do talhão, estimando-se altura média de 21,7 m e DAP médio

de 18,2 cm aos oito anos de idade (GRAÇA; SHIMIZU; TAVARES, 1999; HIGA; PEREIRA, 2003). Essas características tornaram o *Eucalyptus benthamii* uma excelente opção para reflorestamentos em regiões de clima frio no Brasil, principalmente em localidades onde ocorre geadas frequentes e severas (GRAÇA; SHIMIZU; TAVARES, 1999; HIGA; PEREIRA, 2003; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006; SILVA, 2008; SILVA et al., 2004).

Contudo, por ser uma espécie recente em plantios florestais, existem limitações quanto a produção de sementes e, quando essas estão disponíveis, os preços são elevados. A propagação apresenta-se como alternativa para a multiplicação, inclusive de matrizes previamente selecionadas para cada região. No Brasil, um dos primeiros estudos nessa linha de pesquisa com *Eucalyptus benthamii* foi realizado por Graça; Shimizu e Tavares (1999), o qual foi baseado na técnica de estaquia. Contudo, o baixo índice de enraizamento limitou a aplicação da técnica para a implantação de plantios comerciais, bem como, para programas de melhoramento genético.

Trabalhando com a técnica de miniestaquia, Cunha; Wendling e Souza Junior (2005) recomendaram o minijardim clonal em sistema hidropônico do tipo canaletão como alternativa mais viável para a produção de brotações. Porém, os autores não avaliaram o enraizamento da espécie, bem como a nutrição, sendo esses os maiores problemas enfrentados na atualidade em termos de multiplicação, os quais são relatados por vários produtores de mudas clonais de *Eucalyptus benthamii*.

Wit Ondas et al. (2009) estudaram o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* após exposição ao frio e verificaram que o armazenamento dos propágulos sob baixa temperatura não influenciou positivamente o enraizamento dos clones BP118 e BP120, sendo aconselhada a miniestaquia logo após a coleta das brotações. Porém, o clone BP101 apresentou aumento do enraizamento até 48h de exposição ao frio, sendo constatada diferença significativa entre os materiais genéticos. Além disso, a análise histológica revelou raízes normais e funcionais para todos os clones avaliados. Em outro estudo, Brondani; Gonçalves e Almeida (2010) estudando a rizogênese em miniestacas de *Eucalyptus benthamii* determinaram o tempo de 35 dias para o enraizamento na concentração de 2.000 mg L⁻¹ de AIB.

Em relação a micropropagação, Brondani et al. (2009b) estudaram a indução e expressão das respostas morfogênicas em *Eucalyptus benthamii* sob condições *in vitro* e verificaram que os explantes cultivados na presença de ANA (ácido naftalenoacético) não apresentaram respostas morfogênicas, ao passo que os tratados com BAP (benzilaminopurina)

apresentaram zonas meristemáticas mais evidentes, que poderão favorecer a emissão de gemas e/ou raízes. Recentemente, em estudo referente a caracterização anatômica da propagação clonal *in vitro* de *Eucalyptus benthamii*, Wit Ondas et al. (2010) verificaram a viabilidade da técnica de micropropagação para a clonagem de matrizes selecionadas a partir de brotações emitidas de segmentos nodais. Os autores também destacaram que as gemas axilares provenientes da fase de multiplicação foram oriundas de meristemas laterais pré-existentes, ao passo que as adventícias originaram-se do tecido cortical, ambas por organogênese direta, demonstrando a viabilidade da técnica.

Considera-se que os resultados sejam promissores para a obtenção de mudas de *Eucalyptus benthamii* auxiliando sobremaneira a clonagem comercial da espécie. Contudo, apesar de todos os avanços na área de clonagem, pouco se conhece a respeito da rizogênese da espécie, sendo que estudos complementares serão necessários para o aprimoramento da produção de mudas clonais de *Eucalyptus benthamii*.

1.1.2 Miniestaquia como alternativa de clonagem

A reprodução assexuada tem por fundamentação teórica a obtenção de mudas geneticamente idênticas a planta-matriz (planta-mãe) a partir de diferentes órgãos vegetativos (galhos, brotações, folhas, gemas ou raízes), fato embasado na capacidade dos tecidos se regenerarem por divisões mitóticas (ELDRIDGE et al., 1994; HARTMANN et al., 2011), evento esse conhecido como totipotência celular (VASIL, 2008a; VASIL, 2008b, VASIL, 2008c). A seleção clonal e a propagação são amplamente utilizadas para maximizar a produtividade, qualidade e uniformidade em sistemas de produção florestal (POHIO et al., 2005), auxiliando de sobremaneira o melhoramento florestal.

O Brasil adotou comercialmente esse tipo de prática no final da década de 70 a partir da estaquia (CAMPINHOS; IKEMORI, 1983), sendo difundida em muitas empresas de base florestal visando a melhoria de seus plantios, tanto em termos qualitativos quanto quantitativos. Dentre as técnicas de propagação de maior impacto na atualidade em relação a clonagem de diversos genótipos de *Eucalyptus* destaca-se a miniestaquia, a qual pode ser considerada uma variação da estaquia convencional (macroestaquia). Basicamente consiste na utilização de brotações de plantas propagadas pelo processo de macroestaquia, ou por mudas produzidas a partir de sementes (ALFENAS et al., 2004; ALMEIDA et al., 2007; ROSA et al., 2009; SCHWAMBACH et al., 2008; WENDLING et al., 2010).

O elevado grau de melhoramento genético aliado as técnicas de rejuvenescimento do material adulto e pela otimização do uso de insumos e equipamentos adequados resultaram na

otimização da produção de florestas plantadas (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2005). A base da silvicultura do *Eucalyptus* está na utilização de clones de elevada produtividade, que são especialmente selecionados em testes clonais (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2002) e, posteriormente, multiplicados em larga escala para a formação de povoamentos florestais homogêneos (ALFENAS et al., 2004).

O surgimento da miniestaquia advém das limitações da microestaquia em função da obtenção de material rejuvenescido em laboratório de micropropagação, tanto no que se refere aos aspectos técnicos, estruturais e operacionais, quanto aos de custo (WENDLING; XAVIER, 2005a; WENDLING; XAVIER, 2005b; XAVIER; WENDLING, 1998). A sua execução consiste na quebra da dominância apical por meio da poda da macroestaca enraizada, a qual emite novas brotações (miniestacas) para o enraizamento e formação de futuras mudas em intervalos variáveis de acordo com a época do ano, condições estruturais, condução de poda, clone/espécie e condições nutricionais (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000; SCHWAMBACH et al., 2008; XAVIER; WENDLING, 1998).

Na miniestaquia os propágulos geralmente variam de 4 a 8 cm de comprimento, contendo um par de folhas (miniestacas de base) ou dois pares de folhas (miniestacas de ponta ou de ápice) por miniestaca, com a redução de aproximadamente um terço da área foliar. Essa técnica pode ser dividida nas fases de produção de brotos em minijardim clonal, indução do enraizamento adventício em casa de enraizamento sob nevoeiro intermitente e com temperatura elevada, aclimação à sombra, crescimento e rustificação (ALFENAS et al., 2004).

Aplicações exógenas de reguladores de crescimento podem potencializar a rizogênese em propágulos coletados de espécies consideradas difíceis de enraizar, sendo que o ácido indolbutírico (AIB) é o mais utilizado para promover tal êxito, variando em suas formas de aplicações, como veiculado em talco e líquido (ALMEIDA et al., 2007; BRONDANI, 2008; BRONDANI et al. 2010a; BRONDANI et al., 2010b; SCHWAMBACH et al., 2008; WENDLING et al., 2000; WENDLING et al., 2010; WENDLING; XAVIER, 2005a), e mais recentemente, via gel (BRONDANI et al., 2008).

A composição do substrato deve apresentar propriedades físicas e químicas adequadas para favorecer o enraizamento de propágulos (HARTMANN et al., 2011), sendo que ajustes das condições de umidade e temperatura do ambiente de enraizamento e/ou da mistura de componentes que resultem em maior drenagem podem proporcionar melhores resultados (SCHWAMBACH et al., 2008; WENDLING et al., 2010). Um dos substratos mais utilizados na miniestaquia de *Eucalyptus* consiste da mistura de casca de arroz carbonizada e vermiculita

(1:1, v/v), previamente fertilizado com macro e micronutrientes. Em alguns casos, adicionam-se também casca de coco desfibrada ou turfa como um dos componentes, a fim de aumentar a retenção de água e a capacidade de troca catiônica (CTC). Quanto ao recipiente de enraizamento, o tubete tem sido o mais adotado, variando em formatos e dimensões ao longo da escala de produção de mudas clonais de *Eucalyptus* spp. (ALFENAS et al., 2004; STAPE; GONÇALVES; GONÇALVES, 2001).

No viveiro, o minijardim clonal pode ser localizado em tubetes, vasos, sacos plásticos ou bandejas, possibilitando melhor controle hídrico, nutricional e fitossanitário. A coleta de miniestacas nas mudas podadas deve ser realizada de forma seletiva, em períodos a serem definidos conforme o vigor das brotações, coletando-se todas aquelas que se enquadram nos padrões de miniestaca. Após serem coletadas, as miniestacas devem ser acondicionadas em recipientes contendo água, para que possam ser transportadas ao local de enraizamento em perfeitas condições de turgor, evitando estresse hídrico (ALFENAS et al., 2004; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2005).

Em relação a técnica de estaquia convencional de *Eucalyptus* a miniestaquia apresenta vantagens, tais como: eliminação do jardim clonal de campo; maior facilidade no controle de patógenos, bem como das condições nutricionais e hídricas no minijardim clonal; maior produtividade, uma vez que as operações de manejo do minijardim clonal, coleta e confecção de miniestacas são mais fáceis e rápidas de serem executadas; maior produção de miniestacas por unidade de área e em menor unidade de tempo; menores dosagens de reguladores de crescimento vegetal e, em alguns casos, até a sua exclusão completa; a coleta das miniestacas pode ser realizada em qualquer horário do dia; melhor qualidade do sistema radicial em termos de vigor, número, uniformidade e volume; redução do tempo de formação da muda no viveiro, devido ao menor tempo de permanência para o enraizamento (ALFENAS et al., 2004; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2005; MAFIA et al., 2005; WENDLING et al., 2010; WENDLING; XAVIER, 2003).

Apesar de todas as vantagens existentes, a dificuldade de enraizamento de árvores adultas e a variação entre clones quanto ao enraizamento ainda constituem problemas a serem superados. Em termos de desvantagens da miniestaquia em relação à estaquia convencional destacam-se a maior sensibilidade das miniestacas às condições ambientais; a necessidade de maior rapidez entre a coleta dos propágulos no minijardim clonal e a sua estaquia em casa de vegetação e a necessidade de um cronograma de produção melhor sincronizado (ALFENAS et al., 2004).

Mesmo com todos os avanços proporcionados pela miniestaquia são escassas as divulgações científicas quanto a eficiência da técnica em termos de otimização das instalações do viveiro durante as diversas fases de produção de mudas para espécies de *Eucalyptus* difíceis de enraizar. Baseado nesse fato e, considerando as condições favoráveis à incidência de doenças na casa de vegetação durante o processo de formação de raízes, torna-se importante o desenvolvimento de estudos relacionados a dinâmica de enraizamento em propágulos, sobretudo de espécies de *Eucalyptus* subtropicais. Baseado nesse princípio pode-se adotar como critério técnico para determinar o tempo ótimo de permanência dos propágulos na casa de enraizamento o intercepto entre as curvas de incremento diário e incremento médio do enraizamento, em analogia aos estudos realizados nos trabalhos de biometria florestal (FERREIRA et al., 2004; TITON; XAVIER; OTONI, 2002) e, dessa forma, buscar a otimização do sistema de produção de mudas.

1.1.3 Enraizamento adventício vs nutrição mineral

O crescimento dos órgãos da planta depende da combinação de divisão celular com a expansão de células, que é altamente regulado por estímulos nutricionais e fisiológicos (ALABADÍ; BLÁZQUEZ, 2009; CARY et al., 2001; MACARTHUR; MA'AYAN; LEMISCHKA, 2009; PAPP; PLATH, 2011; SMET; BEECKMAN, 2011; SMET et al., 2009). Dentre os fatores endógenos, os nutrientes minerais possuem funções essenciais e específicas para o metabolismo da planta, podendo atuar como constituintes de estruturas orgânicas, como ativadores de reações enzimáticas, ou como portadores de carga e osmorreguladores, considerando que a nutrição é um fator chave para a morfogênese radicial (CUNHA et al., 2009c; LI et al., 2009).

O estado nutricional da planta-matriz doadora de brotações (minicepa) para a confecção de miniestacas pode influenciar significativamente o processo de rizogênese, tendo em vista estar diretamente associado aos processos fisiológicos que regulam tal evento (HARTMANN et al., 2011; SCHWAMBACH; FADANELLI; FETT-NETO, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2009). A capacidade rizogênica também é dependente da interação entre os fatores endógenos e exógenos (DAI; CHENG; SARGENT, 2004; FORD et al., 2002), sendo considerada um dos mais importantes eventos na propagação de espécies florestais (CORRÊA et al., 2005; LI et al., 2009). Contudo, muitas vezes, o enraizamento de espécies lenhosas é genótipo-dependente e diferentes espécies, híbridos, ou até clones do mesmo estoque parental podem requerer diferentes condições de manejo.

Um possível efeito dos baixos índices de enraizamento em espécies de *Eucalyptus* indicadas para o plantio em regiões mais frias, refere-se a elevada recalcitrância a rizogênese, ao comparar com espécies plantadas em regiões tropicais, como o *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla* e seus híbridos (ASSIS; MAFIA, 2007). A importância de se conhecer os fatores que afetam a indução de raízes está relacionada ao sucesso ou ao fracasso da produção de mudas por propagação e, apesar da evolução das técnicas para maximizar o enraizamento do *Eucalyptus*, os fundamentos biológicos da sua formação em propágulos ainda não estão bem elucidados (ALFENAS et al., 2004; CUNHA et al., 2008; LI et al., 2009).

Segundo Li et al. (2009) existem pelo menos duas vias que podem originar e/ou induzir a formação de raízes adventícias em propágulos: (i) por organogênese direta a partir de tecidos celulares diferenciados, como o câmbio, ou (ii) por organogênese indireta partir de tecidos de calos. O mesmo autor ainda complementa que o processo de enraizamento adventício é composto por três fases fisiológicas sucessivas, mas interdependentes com diferentes requisitos, a saber: indução, iniciação e expressão. A fase de indução compreende eventos bioquímicos e moleculares sem alterações visíveis. A fase de iniciação é caracterizada por divisões celulares e organização dos primórdios da raiz. E por fim, a fase de expressão é caracterizada por crescimento intra-tronco dos primórdios da raiz e sua emergência.

Tais eventos podem estar relacionados a presença de indutores e inibidores de enraizamento, juvenilidade, período de coleta das brotações (ALFENAS et al., 2004; HARTMANN et al., 2011; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000; HUNT; TRUEMAN; RASMUSSEN, 2011; LI et al., 2009; MAJADA et al., 2011; WENDLING et al., 2010), nutrição mineral, condições climáticas (CUNHA et al., 2009b; CUNHA et al., 2009d; FORDE; LORENZO, 2001; HARTMANN et al., 2011; SCHWAMBACH; FADANELLI; FETT-NETO, 2005), atividade enzimática (BASAK; DAS; DAS, 2000; FORDE; LORENZO, 2001) e a expressão de genes (DAI; CHENG; SARGENT, 2004; DEAN; CASSON; LINDSEY, 2004; LI et al., 2009). Dentre esses fatores, a nutrição mineral é considerada determinante para a predisposição ao enraizamento, principalmente devido ao seu envolvimento na determinação de respostas morfogenéticas das plantas (CUNHA et al., 2009a; RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

Em termos práticos, os minijardins semihidropônicos em leitos de areia ou em tubetes são os mais utilizados no Brasil (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2002). Nesse sistema, os nutrientes são fornecidos em quantidades adequadas para favorecer o desenvolvimento da planta, podendo resultar em aumento do enraizamento. Contudo, as

concentrações ideais de nutrientes não estão bem estabelecidas para minicepas de *Eucalyptus* spp. (ALFENAS et al., 2004). Apesar dos nutrientes necessários para o desenvolvimento serem os mesmos, as quantidades exigidas são diferentes entre e dentro de cada espécie, não existindo uma solução nutritiva padrão (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2002), fato que evidencia a necessidade de estudos mais aprofundados.

Considerando os preceitos teóricos, a nutrição mineral pode influenciar o enraizamento de propágulos de duas formas distintas: decorrente do vigor vegetativo da planta-matriz e, do próprio status nutricional do material coletado. Para Alfenas et al. (2004), os problemas nutricionais em minijardins clonais podem estar ligados a deficiência ou excesso de elementos. De certa forma, qualquer nutriente envolvido nos processos metabólicos, associados a diferenciação e a formação de sistema radicial é considerado essencial para a iniciação rizogênica (CUNHA et al., 2009a). Contudo, pouca atenção tem sido dada em relação aos efeitos dos micronutrientes, principalmente no que se refere a sua influência na atividade de reguladores de crescimento envolvidos nos processos de enraizamento adventício.

Dentre os microelementos que interferem a rizogênese destacam-se o zinco (Zn) e o boro (B). Vários estudos (KERSTEN; LUCCHESI; GUTIERREZ, 1993; LEONEL; RODRIGUES, 1993; MALTA et al., 2002; ONO; RODRIGUES; PINHO, 1992; SCALON; RAMOS; VIEIRA, 2003) relataram aumento do enraizamento em propágulos ao serem submetidos ao Zn, B e AIB nas mais variadas concentrações e formas de aplicações, porém não existem relatos dessas interações na clonagem de *Eucalyptus benthamii*.

1.1.3.1 Zinco

O Zn é essencial para o metabolismo da planta, principalmente devido a sua atuação como cofator enzimático (RUBIO et al., 2009). Sabe-se que mais de 80 enzimas contém o Zn em sua conformação, constituindo metaloenzimas, como da álcool desidrogenase, desidrogenase glutâmica e anidrase carbônica (CUNHA et al., 2009a; EPSTEIN; BLOOM, 2004; GHNAYA et al., 2010).

As funções desse microelemento nas plantas estão ligadas ao metabolismo de carboidratos, proteínas, fosfatases e também na síntese de auxinas, ácido ribonucléico (RNA) e aminoácidos, estando intimamente relacionado ao metabolismo do nitrogênio (TAIZ; ZEIGER, 2009). Existem relatos que o Zn é essencial para a síntese de triptofano (MALTA et al., 2002; SOUZA; PEREIRA, 2007), qualificando-o como provável precursor de auxina (ISHIHARA et al., 2007; LI et al., 2009; MÜLLER; HILLEBRAND; WEILER, 1998;

PERRINE et al., 2004; WOODWARD; BARTEL, 2005) e, dessa forma, pode influenciar diretamente os eventos de enraizamento adventício (SOUZA; PEREIRA, 2007).

O Zn não é facilmente redistribuído entre os tecidos vegetais (mobilidade intermediária), e sua deficiência pode ocasionar a redução do tamanho das folhas mais jovens, prejudicando o crescimento do limbo foliar e internódios, sendo que a planta pode apresentar hábito de crescimento “rosetado”. Nas folhas mais jovens surgem clorose e necrose, afetando todo o parênquima foliar e as nervuras. A deficiência de Zn ainda pode afetar a síntese e estabilização de auxinas, principalmente do ácido indolacético (AIA) (DECHEN; NACHTIGALL, 2006; DELL; MALAJCZUK; GROVE, 1995; EPSTEIN; BLOOM, 2004; MALAVOLTA, 2006; MALTA et al., 2002; TAIZ; ZEIGER, 2009). Além disso, a deficiência de Zn inibe a síntese protéica, resultando em declínio da atividade da Zn-polimerase, que por sua vez acaba por induzir menor integridade estrutural dos ribossomos, resultando na degradação de RNA (MALAVOLTA, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009).

O balanço nutricional das plantas doadoras de propágulos pode estar ligado a produção de triptofano e de substâncias de reserva, de modo que os aumentos dos níveis endógenos de AIA podem ser favorecidos pelo adequado fornecimento de Zn (HARTMANN et al., 2011). Existem relatos que a maior concentração de triptofano em folhas deficientes em Zn, e sua menor concentração em folhas normais, pode ser atribuída a um possível distúrbio causado no sistema catalítico na conversão do triptofano para auxina (MALTA et al., 2002). Apesar desses relatos, e de sua comprovada essencialidade em outros processos metabólicos da planta, pouca atenção tem sido dada ao seu possível uso como co-fator de enraizamento, podendo até mesmo substituir a utilização de auxinas sintéticas (NICOLOSO; LAZZARI; FORTUNATO, 1999).

1.1.3.2 Boro

Estruturalmente, o B está associado com a parede celular, ligando-se a polissacarídeos pécnicos e contribuindo com a estabilidade química, diferenciação do xilema e lignificação, complexos com manitol, manas, ácido polimanurônico, além de estar envolvido no alongamento celular e metabolismo de ácidos nucléicos e transporte de carboidratos através de membranas (CUNHA et al., 2009a; CUNHA et al., 2009c; EPSTEIN; BLOOM, 2004; LI et al., 2009; MALAVOLTA, 2006; MEDEIROS; BELTRÃO; MEDEIROS, 2003; SAKYA; DELL; HUANG, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2009). O B desempenha papel importante como componente estrutural para o crescimento primário da parede celular durante o

desenvolvimento de tecidos vegetais, podendo controlar os níveis endógenos de auxina (LI et al., 2009).

A deficiência de B resulta em raízes susceptíveis a patógenos, sendo que os sintomas de deficiência são similares a deficiência em auxina (KERSTEN; LUCCHESI; GUTIERREZ, 1993). Além disso, é considerado importante para o enraizamento (TREVIZAM, 2005; TREVIZAM et al., 2011a) e processos metabólicos celulares (TREVIZAM, 2001; TREVIZAM et al., 2011b).

Esse elemento é considerado imóvel nas plantas, onde é transportado principalmente pelo xilema (MALAVOLTA, 2006) e com mobilidade muito limitada pelo floema (HUANG; BELL; DELL, 1999). Em condições de deficiência, as gemas apicais são danificadas podendo resultar em mortalidade do tecido, as quais apresentam aspecto duro, seco e quebradiço. A necrose de folhas jovens ocorre principalmente na base da lâmina foliar e, a parte aérea e raízes podem ficar suscetíveis ao ataque de fungos e bactérias. A dominância apical pode ser perdida, tornando a planta altamente ramificada, reduzindo o crescimento e provocando deformações nas zonas de crescimento, pois as células novas não se diferenciam (BARRETTO et al., 2007; DECHEN; NACHTIGALL, 2006; DELL; MALAJCZUK; GROVE, 1995; EPSTEIN; BLOOM, 2004; MALAVOLTA, 2006; SGARBI et al., 1999; SILVEIRA; GONÇALVES; KRÜGNER, 1998; SILVEIRA et al., 2000; SILVEIRA et al., 2002; SILVEIRA; MOREIRA; HIGASHI, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2009). Além disso, pode alterar os níveis de auxina, diminuir a síntese de proteínas, dificultar o transporte de fotoassimilados e reduzir o acúmulo de compostos fenólicos (MEDEIROS; BELTRÃO; MEDEIROS, 2003).

De acordo com a literatura, existem evidências que a deficiência de B pode induzir controle da atividade de AIA-oxidase e aumento dos níveis endógenos de auxinas, causando mudanças anatômicas, fisiológicas e bioquímicas na indução de raízes adventícias (HARTMANN et al., 2011; SOUZA; PEREIRA, 2007). Li et al. (2009) sugerem que a iniciação dos primórdios da raiz está mais ligada ao estímulo pela ação das auxinas, contudo o subsequente crescimento e desenvolvimento da raiz dependem do fornecimento exógeno de boro.

Trindade e Pais (1997) verificaram relação significativa durante o enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* ao omitir o B do meio de cultura, onde ocorreu aumento da porcentagem de indução de raízes. Os autores sugeriram que a deficiência de B induziu aumento da síntese de auxina endógena, que por sua vez, promoveu aumento dos índices de enraizamento. Dessa forma, esse micronutriente foi considerado como não necessário durante

a fase de indução rizogênica, porém foi essencial para o desenvolvimento e crescimento das raízes diferenciadas, ou seja, esse micronutriente atua no processo rizogênico somente após a ação das auxinas durante o alongamento celular e alteração da membrana celular.

1.1.3.3 Auxina

As auxinas representam uma classe de hormônios vegetais que estão envolvidos em muitos aspectos do crescimento, desenvolvimento e respostas das plantas a eventos ambientais (GIANFAGNA, 1995; LUDWIG-MÜLLER, 2000; MORI; NISHIMURA; KOSHIBA, 2005; WOODWARD; BARTEL, 2005).

Os órgãos mais comuns que sintetizam auxinas nas plantas referem-se aos meristemas e as folhas em estágio de desenvolvimento juvenil, bem como, os frutos e sementes em desenvolvimento (DETTMER; ELO; HELARIUTTA, 2009; RISOPATRON; SUN; JONES, 2010; TAIZ; ZEIGER, 2009). As auxinas desempenham importantes papéis ao longo do ciclo de vida do vegetal, onde seus estímulos estão ligados ao alongamento celular, fototropismo, geotropismo, dominância apical, diferenciação dos tecidos vasculares, extensibilidade da parede celular, embriogênese, síntese de etileno, desenvolvimento das gemas florais e dos frutos, partenocarpia, abscisão, bem como, indução da rizogênese (ALABADÍ; BLÁZQUEZ, 2009; COOKE et al., 2002; HARTMANN et al., 2011; LUDWIG-MÜLLER, 2000; MÜLLER; WEILER, 2000; POLLMANN; DÜCHTING; WEILER, 2009; RUBIO et al., 2009; TAIZ; ZEIGER, 2009; WOODWARD; BARTEL, 2005).

As raízes adventícias podem surgir em uma grande variedade de tecidos a partir de agregados de células maduras que renovam sua atividade de divisão celular, as quais se desenvolvem em meristema apical da raiz de maneira análoga a formação de raízes laterais (HARTMANN et al., 2011; TAIZ; ZEIGER, 2009), onde o enraizamento em propágulos é especialmente controlado pelos teores endógenos de auxinas (LI et al., 2009).

O ácido indolacético (AIA) é a auxina endógena mais abundante e de maior relevância fisiológica para as plantas, enquanto que o ácido indolbutírico (AIB) foi classificado como uma auxina endógena recentemente (LUDWIG-MÜLLER, 2000), sendo encontrado naturalmente em muitas espécies vegetais (LI et al., 2009). Outras auxinas importantes para o uso agrícola, porém sintéticas, referem-se ao ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e o ácido naftalenoacético (ANA) (HARTMANN et al., 2011).

Os avanços biotecnológicos, principalmente em relação ao uso de isótopos como marcadores moleculares, permitiram aos bioquímicos vegetais elucidar diversas rotas de síntese e degradação de auxina, bem como, a determinação do transporte unidirecional da

extremidade apical para a basal (transporte basípeto) pelo floema (TAIZ; ZEIGER, 2009). Woodward e Bartel (2005) salientam que o AIA pode ser sintetizado na planta a partir de duas rotas distintas, ou seja, uma dependente e outra independente de triptofano, sendo que as reações completas das rotas bioquímicas ainda não estão bem elucidadas. Taiz e Zeiger (2009) descreveram três rotas principais para a síntese de AIA: (i) a rota AIP (ácido indol-3-pirúvico), (ii) rota TAM (triptamina) e (iii) rota IAN (indol-3-acetonitrila).

Os teores endógenos de AIA podem variar de acordo com a velocidade das reações de síntese, degradação, ativação e inativação, as quais podem ser afetadas pela idade fisiológica do órgão e da planta, condições ambientais e parte vegetativa considerada (LUDWIG-MÜLLER, 2000; MORI; NISHIMURA; KOSHIBA, 2005; SAN-FRANCISCO et al., 2005). Devido a existência de inúmeras rotas alternativas de biossíntese de AIA é muito raro ocorrer a deficiência desse regulador de crescimento em plantas, considerando o papel essencial para o crescimento e desenvolvimento do vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Segundo Ludwig-Müller (2000) existem várias rotas bioquímicas para a síntese de AIB endógeno em plantas, sendo: (i) uma rota análoga ao AIA, por meio do triptofano, (ii) pela reação em cadeia de alongamento semelhantes aos encontrados na biossíntese dos ácidos graxos usando AIA como substrato, e (iii) por uma via independente de triptofano semelhante a rota do AIA.

Em termos comerciais, as auxinas são muito utilizadas para a indução de raízes em propágulos, sendo o AIB o mais comumente empregado para o enraizamento de estacas e miniestacas de *Eucalyptus* spp. (ALFENAS et al., 2004; ALMEIDA et al., 2007; BRONDANI et al., 2008; BRONDANI et al., 2010a, BRONDANI et al., 2010b; CORRÊA et al., 2005; SCHWAMBACH et al., 2008; STAPE; GONÇALVES; GONÇALVES, 2001; TITON et al., 2003; WENDLING et al., 2000; WENDLING; XAVIER, 2005a), tendo em vista a sua maior estabilidade química e funcionalidade em relação ao AIA (HARTMANN et al., 2011; LI et al., 2009; LUDWIG-MÜLLER, 2000; WOODWARD; BARTEL, 2005).

1.1.3.4 Carboidrato

Os carboidratos como a sacarose, glicose e frutose representam papel crucial para o metabolismo, crescimento e morfogênese das plantas, principalmente pelo fornecimento de energia e carbono para a biossíntese de aminoácidos (PAVLINOVA et al., 2002; STENVALL; PIISILÄ; PULKKINEN, 2009; VEYRES et al., 2008).

Diferente do amido, a sacarose apresenta mobilidade na planta, e pode ser transportada para locais não-fotossintetizantes tais como raiz e caule (MINDÉLLO NETO, 2005), onde é

convertida em glicose ou frutose por enzimas invertases (TAIZ; ZEIGER, 2009). Nestes órgãos, os carboidratos mais simples (como glicose e frutose) podem ser utilizados de três formas: (i) na respiração, para a formação de ATP e outros compostos importantes, (ii) serem armazenados no vacúolo para posterior uso na respiração, e (iii) a glicose pode ser convertida em amido (imóvel na planta), servindo como reserva para uso em situações onde há pouca atividade fotossintética da parte aérea (TAIZ; ZEIGER, 2009).

O acúmulo de carboidratos nos tecidos foliares das plantas também pode variar em relação a época do ano (KERSTEN; LUCCHESI; GUTIERREZ, 1993; MINDÉLLO NETO, 2005), fatores edáficos e também de acordo com os tratos culturais (BORBA; SCARPARE FILHO; KLUGE, 2005), os quais podem ser exemplificados no sistema de poda contínua de brotações em minijardins clonais de *Eucalyptus*. Devido a função no metabolismo das plantas, os carboidratos podem influenciar a produção de brotações e o posterior enraizamento em propágulos (HARTMANN et al., 2011), sejam provenientes da estaquia, miniestaquia ou da microestaquia.

Nas plantas existe forte interação do nível de carboidratos com o nível hormonal endógeno (AGULLÓ-ANTÓN et al., 2011), afetando desta forma o processo morfogênico e/ou organogênico (AGULLÓ-ANTÓN et al., 2011; CORUZZI; ZHOU, 2001; KOMATSU et al., 2011; KUMAR et al., 1999; STENVALL; PIISILÄ; PULKKINEN, 2009; VEYRES et al., 2008). A falha na competência de um tecido pode refletir na falta de receptores para a classe de regulador de crescimento que irá induzir o processo organogênico (CARY et al., 2001; MACARTHUR; MA'AYAN; LEMISCHKA, 2009; PAPP; PLATH, 2011; SMET; BEECKMAN, 2011; SMET et al., 2009), sendo que a inativação de reguladores de crescimento pode ocorrer por meio da conjugação de açúcares derivados da hidrólise da sacarose, glicose e frutose, alterando dessa forma, o balanço das moléculas ativas de auxina e citocinina (AGULLÓ-ANTÓN et al., 2011; CORUZZI; ZHOU, 2001), o que pode afetar a formação de raízes em propágulos (BHARDWAJ; MISHRA, 2005).

1.1.4 Micropropagação de *Eucalyptus*

A micropropagação envolve a produção de plantas a partir de órgãos, tecidos ou células, os quais são cultivados *in vitro* sob condições assépticas em meio de cultura adequado e com rigoroso controle das condições ambientais e nutricionais (GEORGE; HALL; De KLERK, 2008; MERKLE; NAIRN, 2005; THORPE, 2007). É uma técnica que possibilita a obtenção de grande número de plantas a partir de poucas matrizes, em curto espaço de tempo e em área reduzida (HARTMANN et al., 2011). A técnica de cultura de tecidos representa destaque e

com aplicações comprovadas no setor florestal (XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007), especialmente pelo fato de permitir menores variações genéticas em relação ao explante original (NEHRA et al., 2005) e promover o rejuvenescimento do tecido vegetal (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

O *Eucalyptus* é o gênero florestal que mais possui estudos relacionados a micropropagação (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). Essa técnica encontra-se ligada à programas de melhoramento que objetivam a maximização ou manutenção do valor genético, permitindo acelerar os métodos de clonagem de propágulos oriundos de árvores adultas selecionadas (BUNN et al., 2005; DEL PONTE et al., 2001; JOSHI et al., 2003; THORPE, 2007; WATT et al., 2003), como a estaquia e miniestaquia, bem como servir de base para estudos relacionados a nutrição mineral.

Um dos objetivos da micropropagação é a necessidade de clonar espécies ou híbridos que apresentam elevadas taxas de crescimento, tolerância a baixas temperaturas e salinidade, resistência a pragas e doenças e, principalmente, para o rejuvenescimento de clones selecionados em laboratório e de difícil enraizamento (BENNETT et al., 1994; GOMES; CANHOTO, 2003; KLERK, 2002; NOURISSIER; MONTEUUIS, 2008).

As principais vantagens do emprego dessa técnica relacionam-se a possibilidade de propagação em larga escala de clones em um curto espaço de tempo, maior controle nutricional, ambiental e fitopatológico, transporte do material clonal por grandes distâncias sem danos, armazenamento por longos períodos e a retenção do vigor híbrido (BISHT et al., 1999; GEORGE; HALL; De KLERK, 2008). Além disso, os problemas de enraizamento de estacas, principalmente observados em árvores adultas devido a elevada produção de inibidores de enraizamento, metabólitos secundários e fenóis, podem ser minimizados ou até solucionados pelo emprego da micropropagação (JOSHI et al., 2003). Por meio de sucessivos subcultivos também é possível reverter a juvenilidade do tecido vegetal (XAVIER; COMÉRIO, 1996), o que melhora de maneira significativa os índices de enraizamento (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). Outras aplicações referem-se a conservação de germoplasma *in vitro*, obtenção de sementes sintéticas, limpeza clonal e possibilidade de patenteamento (XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007).

Uma das grandes limitações da micropropagação refere-se ao elevado custo de instalação e manutenção de um laboratório, resultando em aumento do custo de produção das mudas, que por sua vez, acaba não sendo viável sob o ponto de vista econômico para o uso em larga escala. No entanto, para plantas de alto valor agregado e com grande demanda pelo

mercado, a técnica tem sido altamente compensatória (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

De maneira geral, a micropropagação pode ser dividida nas seguintes fases, segundo Grattapaglia e Machado (1998):

Fase 0: Refere-se ao condicionamento das plantas matrizes, relacionando aspectos ligados a condição fisiológica, ao ambiente onde ela se encontra e condições de sanidade. De maneira geral, as matrizes vigorosas, sadias, isentas de qualquer tipo de estresse e em pleno crescimento são aquelas que fornecem os melhores explantes, sendo a nutrição das plantas matrizes um fator chave para o sucesso do estabelecimento das culturas *in vitro*.

Fase I: Está ligada ao estabelecimento *in vitro* dos explantes, onde neste estágio é visada a obtenção de explantes no tubo de ensaio totalmente livre de contaminação, condição imprescindível ao estabelecimento do mesmo, visto que o desenvolvimento de microorganismos no meio de cultura pode resultar na morte do explante. Nessa fase, todas as operações devem ser realizadas em condições assépticas e em câmaras de fluxo laminar.

Fase II: É considerada a fase de multiplicação rápida dos explantes obtidos sem contaminação na fase anterior (Fase I). Nessa fase, objetiva-se a produção do maior número possível de gemas, no menor espaço de tempo e com a máxima uniformidade.

Fase III: Refere-se ao alongamento das brotações obtidas por multiplicação, é uma fase necessária para a maioria das culturas, visando condicioná-las para o enraizamento. Isto é importante, pois a multiplicação dos explantes induz a formação de muitas brotações pequenas, sendo necessário fornecer condições para a indução de brotações mais alongadas, a fim de facilitar o uso e manejo *in vitro*.

Fase IV: É a última etapa e está relacionada a indução do enraizamento das brotações. Quando o enraizamento não ocorrer nas condições de multiplicação *in vitro*, os explantes são acondicionados em meio de cultura apropriado para o enraizamento, contendo maior relação auxina/citocinina. No enraizamento *ex vitro*, os explantes induzidos *in vitro* são enraizados em substrato sob condições de elevada umidade relativa do ar (casa de vegetação ou outra estrutura adequada), para que os mesmos formem as raízes e regenerem uma planta completa.

Inúmeros procedimentos e produtos são utilizados para a desinfestação *in vitro* de explantes de *Eucalyptus* spp., sendo que os mais utilizados são o etanol (70%) e o hipoclorito de sódio (NaOCl) em diversas concentrações (BRONDANI et al., 2009a; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). As concentrações, tempo de exposição e produtos variam conforme o tipo de explante a ser utilizado, bem como, em relação a sua origem (XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007).

Em termos de controle morfogênico em condições *in vitro* têm-se utilizado, preferencialmente na fase de multiplicação de gemas, os hormônios vegetais pertencentes ao grupo das auxinas e citocininas. As giberelinas são utilizadas para promover o alongamento de brotações (GEORGE; HALL; De KLERK, 2008; HARTMANN et al., 2011). Considerando os reguladores de crescimento mais utilizados para a obtenção de gemas axilares na micropropagação de *Eucalyptus*, o BAP (benzilaminopurina) e o ANA (ácido naftalenoacético) merecem amplo destaque, onde são suplementados ao meio de cultura nas mais variadas relações (BRONDANI et al., 2009a; DEL PONTE et al., 2001; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

O meio cultura deve promover condições adequadas ao crescimento e desenvolvimento *in vitro* do tecido vegetal. Os componentes do meio de cultura de natureza definida são: sais minerais (macro e micronutrientes), vitaminas (biotina, ácido fólico, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, tiamina e inositol), reguladores de crescimento (AIA; AIB; ANA, BAP; GA₃; 2,4-D e TDZ), aminoácidos (asparagina, glicina e ácido glutâmico), ácidos orgânicos (ácido citérico, ácido tartárico) e açúcares (sacarose e glicose) (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). Conforme a literatura, dentre os meios de cultura mais utilizados para a micropropagação de *Eucalyptus*, destacam-se o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), JADS (CORREIA et al., 1995) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980).

Atualmente, ainda existe a necessidade de continuidade dos estudos com a técnica de micropropagação de *Eucalyptus*, principalmente no sentido de redução de custos, buscando maximizar as etapas que compõem o processo e estabelecimento de protocolos que possam ser empregados para diversas espécies, bem como, em relação a técnicas para o resgate de material adulto selecionado e seu posterior rejuvenescimento (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Referências

- AGULLÓ-ANTÓN, M.A.; SÁNCHEZ-BRAVO, J.; ACOSTA, M.; DRUEGE, U. Auxins or sugars: what makes the difference in the adventitious rooting of stored carnation cuttings? **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 30, n. 1, p. 100–113, 2011. DOI: 10.1007/s00344-010-9174-8
- ALABADÍ, D.; BLÁZQUEZ, M.A. Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 409–417, 2009. DOI: 10.1007/s11103-008-9400-y

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442 p.

ALMEIDA, F.D.; XAVIER, A.; DIAS, J.M.M.; PAIVA, H.N. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 455–463, 2007. DOI: 10.1590/S0100-67622007000300011

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2010. Brasília. 2011. 130 p. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF11/ABRAF11-BR.pdf>>. Acesso em: 27 ago. 2011.

BARRETTO, V.C.M.; VALERI, S.V.; SILVEIRA, R.L.V.A.; TAKAHASHI, E.N. Eficiência de uso de boro no crescimento de clones de eucalipto em vasos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 76, p. 21–33, 2007.

BASAK, U.C.; DAS, A.B.; DAS, P. Rooting response in stem cuttings from five species of mangrove trees: effect of auxins and enzyme activities. **Marine Biology**, Berlin, v. 136, n. 1, p. 185–189, 2000. DOI: 10.1007/s002270050021

BENNETT, I.J.; MCCOMB, J.A.; TONKIN, C.M.; MCDAVID, D.A.J. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. **Annals of Botany**, London, v. 74, n. 1, p. 53–58, 1994. DOI: 10.1006/anbo.1994.1093

BENSON, D.; MCDUGALL, L. Ecology of Sydney plant species. Part 6 Dicotyledon family Myrtaceae. **Cunninghamia**, Sydney, v. 5, n. 4, p. 809–987, 1998.

BENSON, D.H. Aspects of the ecology of a rare tree species, *Eucalyptus benthamii*, at Bents Basin, Wallacia. **Cunninghamia**, Sydney, v. 1, n. 3, p. 371–383, 1985.

BHARDWAJ, D.R.; MISHRA, V.K. Vegetative propagation of *Ulmus villosa*: effects of plant growth regulators, collection time, type of donor and position of shoot on adventitious root formation in stem cuttings. **New Forests**, Dordrecht, v. 29, n. 2, p. 105–116, 2005. DOI: 10.1007/s11056-005-0240-1

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

BORBA, M.R.C.; SCARPARE FILHO, J.A.; KLUGE, R.A. Teores de carboidratos em pessegueiros submetidos a diferentes intensidades de poda verde em clima tropical. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 68–72, 2005. DOI: 10.1590/S0100-29452005000100019

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

BRONDANI, G.E.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Determinação do tempo ótimo de enraizamento para miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. In: REUNIÓN ARGENTINA DE FISIOLÓGÍA VEGETAL, 28., 2010, La Plata. **Libro de resúmenes...** La Plata: Asociación Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal, 2010. p. 194. 1 CD-ROM.

BRONDANI, G.E.; WENDLING, I.; ARAUJO, M.A.; PIRES, P.P. Ácido indolbutírico em gel para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 153–158, 2008.

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 11–19, 2009a. DOI: 10.1590/S0100-67622009000100002

BRONDANI, G.E.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; DUTRA, L.F.; ARAUJO, M.A. Aplicação de IBA para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 667–674, 2010a. DOI: 10.4025/actasciagron.v32i4.4879

BRONDANI, G.E.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; DUTRA, L.F.; ARAUJO, M.A. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*: (II) sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das coletas e estações do ano. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 3, p. 453–465, 2010b.

BRONDANI, G.E.; WIT ONDAS, H.W.; FIGUEIREDO, C.R.F.; ALMEIDA, C.V.; ALMEIDA, M. Indução e expressão das respostas morfogênicas em cultura *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage (Angiospermae: Myrtaceae) em função de BAP e ANA. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 60., 2009, Feira de Santana. **Anais...** Feira de Santana: UEFS, 2009b. 1 CD-ROM.

BUNN, E.; SENARATNA, T.; SIVASITHAMPARAM, K.; DIXON, K.W. *In vitro* propagation of *Eucalyptus phylacis* L. Johnson and K. Hill., a critically endangered relict from Western Australia. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 41, n. 6, p. 812–815, 2005. DOI: 10.1079/IVP2005700

BUTCHER, P.A.; SKINNER, A.K.; GARDINER, C.A. Increased inbreeding and inter-species gene flow in remnant populations of the rare *Eucalyptus benthamii*. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 6, n. 2, p. 213–226, 2005. DOI: 10.1007/s10592-004-7830-x

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

CAMPINHOS, E.J.; IKEMORI, Y.K. Nova técnica para produção de mudas de essências florestais. **IPEF**, Piracicaba, v. 23, p. 47–52, 1983.

CARY, A.J.; UTTAMCHANDANI, S.J.; SMETS, R.; ONCKELEN, H.A.V.; HOWELL, S.H. *Arabidopsis* mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signals. **Planta**, Berlin, v. 213, n. 5, p. 700–707, 2001. DOI: 10.1007/s004250100565

COOKE, T.J.; POLI, D.B.; SZTEIN, A.E.; COHEN, J.D. Evolutionary patterns in auxin action. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 49, n. 3/4, p. 319–338, 2002. DOI: 10.1023/A:1015242627321

CORRÊA, L.R.; PAIM, D.C.; SCHWAMBACH, J.; FETT-NETO, A.G. Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 45, n. 1, p. 63–73, 2005. DOI: 10.1007/s10725-004-6125-z

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

CORUZZI, G.M.; ZHOU, L. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging ‘matrix effects’. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, n. 3, p. 247–53, 2001. DOI: 10.1016/S1369-5266(00)00168-0

CUNHA, A.C.M.C.M.; WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. Produtividade e sobrevivência de minicepas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage em sistema de hidroponia e em tubete. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 307–310, 2005.

CUNHA, A.C.M.C.M.; PAIVA, H.N.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Papel da nutrição mineral na formação de raízes adventícias em plantas lenhosas. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 35–47, 2009a. DOI: 10.4336/2009.pfb.58.35

CUNHA, A.C.M.C.M.; PAIVA, H.N.; BARROS, N.F.; LEITE, H.G.; LEITE, F.P. Relação do estado nutricional de miniestacas com o número de miniestacas de eucalipto. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 36, n. 79, p. 203–213, 2008.

_____. Relação do estado nutricional de minicepas com o enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 3, p. 591–599, 2009d. DOI: 10.1590/S0100-06832009000300012

CUNHA, A.C.M.C.M.; PAIVA, H.N.; LEITE, H.G.; BARROS, N.F.; LEITE, F.P. Relações entre variáveis climáticas com produção e enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 2, p. 195–203, 2009b. DOI: 10.1590/S0100-67622009000200001

_____. Influência do estado nutricional de minicepas no enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 607–615, 2009c. DOI: 10.1590/S0100-67622009000400003

DAI, W.; CHENG, Z.M.; SARGENT, W.A. Expression of the *ro1B* gene enhances adventitious root formation in hardwood cuttings of aspen. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 40, n. 4, p. 366–370, 2004. DOI: 10.1079/IVP2004556

DEAN, G.; CASSON, S.; LINDSEY, K. *KNAT6* gene of *Arabidopsis* is expressed in roots and is required for correct lateral root formation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, n. 1, p. 71–84, 2004. DOI: 10.1023/B:PLAN.0000028772.22892.2d

- DECHEN, A.R.; NACHTIGALL, G.R. Micronutrientes. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 327–354.
- DEL PONTE, E.M.; MATTEI, V.L.; PETERS, J.A.; ASSIS, T.F. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 1–8, 2001.
- DELL, B.; MALAJCZUK, N.; GROVE, T.S. **Nutrient disorders in plantation eucalypts**. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research, 1995. 110 p. (ACIAR. Monograph, 31).
- DETTMER, J.; ELO, A.; HELARIUTTA, Y. Hormone interactions during vascular development. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 347–360, 2009. DOI: 10.1007/s11103-008-9374-9
- DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 49–59, 2009.
- ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; VAN WYK, G. Mass vegetative propagation. In: _____. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1994. p. 228–246.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. NUNES, M.E.T. (Trad.). Londrina: Editora Planta, 2004. 403 p.
- FERREIRA, E.M.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; LEITE, H.G.; SARTORIO, R.C.; PENCHEL FILHO, R.M. Determinação do tempo ótimo do enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 183–187, 2004. DOI: 10.1590/S0100-67622004000200004
- FOELKEL, C. As plantações de florestas no Brasil. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 13–24.
- FORD, Y.Y.; BONHAM, E.C.; CAMERON, R.W.F.; BLAKE, P.S.; JUDD, H.L.; HARRISON-MURRAY, R.S. Adventitious rooting: examining the role of auxin in an easy and a difficult to root plant. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 36, n. 2, p. 149–159, 2002. DOI: 10.1023/A:1015013025513
- FORDE, B.; LORENZO, H. The nutritional control of root development. **Plant and Soil**, The Hague, v. 232, n. 1/2, p. 51–68, 2001. DOI: 10.1023/A:1010329902165
- GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; De KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Netherlands: Springer, 2008. v. 1. 501 p.
- GHNAYA, A.B.; HOURMANT, A.; CERANTOLA, S.; KERVAREC, N.; CABON, J.Y., BRANCHARD, M.; CHARLES, G. Influence of zinc on soluble carbohydrate and free amino acid levels in rapeseed plants regenerated *in vitro* in the presence of zinc. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, n. 2, p. 191–197, 2010. DOI: 10.1007/s11240-010-9721-9

GIANFAGNA, T. Natural and synthetic growth regulators and their use in horticultural and agronomic crops. In: DAVIES, J. (Ed.). **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 751-773.

GIT FORESTRY CONSULTING. **Global *Eucalyptus* map**. Version 1.0.1. Disponível em: <http://git-forestry.com/download_git_eucalyptus_map_PT.htm>. Acessado em: 18 de abr. de 2010.

GOMES, F.; CANHOTO, J.M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining Gum). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 39, n. 3, p. 316–321, 2003. DOI: 10.1079/IVP2002376

GRAÇA, M.E.C.; SHIMIZU, J.Y.; TAVARES, F.R. Capacidade de rebrota e de enraizamento de *Eucalyptus benthamii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 39, p. 135–138, 1999.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1. p. 183–260.

HALL, N.; BROOKER, I. **Camden white gum: *Eucalyptus benthamii*** Maiden et Cambage. Camberra: Department of National Development Forestry and Timber Bureau, 1973. 4 p. (Commonwealth of Australia. Forest Tree Series, 57).

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

HIGA, R.C.V.; PEREIRA, J.C.D. **Usos potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage**. Colombo: Embrapa Florestas-CNPQ. 2003. 4 p. (EMBRAPA. Comunicado Técnico, 100).

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

_____. **Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de *Eucalyptus***. Piracicaba: IPEF, 2002. 21 p. (IPEF. Circular Técnica, 194).

_____. Monitoramento nutricional e fertilização em macro, mini e microjardim clonal de *Eucalyptus*. In: GONÇALVES, J.L.M.; BENEDETTI, V. (Eds.). **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2005. p. 191–217.

HUANG, L.; BELL, R.W.; DELL, B. Factors controlling equilibrium boron (B) concentration in nutrient solution buffered with B-specific resin (Amberlite IRA-743). **Plant and Soil**, The Hague, v. 208, n. 2, p. 233–241, 1999. DOI: 10.1023/A:1004595315639

HUNT, M.A.; TRUEMAN, S.J.; RASMUSSEN, A. Indole-3-butyric acid accelerates adventitious root formation and impedes shoot growth of *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* cuttings. **New Forests**, Dordrecht, v. 41, n. 3, p. 349–360, 2011. DOI: 10.1007/s11056-010-9227-7

- ISHIHARA, A.; MATSUDA, F.; MIYAGAWA, H.; WAKASA, K. Metabolomics for metabolically manipulated plants: effects of tryptophan overproduction. **Metabolomics**, Boston, v. 3, n. 3, p. 319–334, 2007. DOI: 10.1007/s11306-007-0072-4
- JOSHI, I.; BISHT, P.; SHARMA, V. K.; UNİYAL, D.P. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 52, n. 3/4, p. 110–113, 2003.
- JOVANOVIĆ, T.; BOOTH, T.H. **Improved species climatic profiles**. Australia: Union Offset Printing, Joint Venture Agroforestry Program, Rural Industries Research and Development Corporation, 2002. 68 p.
- KELLY, S. **Eucalypts**. Singapore: Australia: Thomas Nelson, 1982. v. 2. 76 p.
- KERSTEN, E.; LUCCHESI, A.A.; GUTIERREZ, L.E. Efeitos do boro e zinco no teor de carboidratos solúveis, aminoácidos totais e no enraizamento de estacas de ramos de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, n. 1, p. 13–18, 1993. DOI: 10.1590/S0103-90161993000100003
- KJAER, E.; AMARAL, W.; YANCHUK, A.; GRAUDAL, L. Strategies for conservation of forest genetic resources. Conservation of *Eucalyptus benthamii*: an endangered eucalypt species from eastern Australia. In: FAO, FLD, IPGRI. **Forest genetic resources conservation and management: overview, concepts and some systematic approaches**. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, 2004. v. 1. p. 5–24.
- KLERK, G.J. Rooting of microcuttings: theory and practice. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 38, n. 5, p. 415–422, 2002. DOI: 10.1079/IVP2002335
- KOMATSU, Y.H.; BATAGIN-PIOTTO, K.D.; BRONDANI, G.E.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. *In vitro* morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides*. **Journal of Forestry Research**, Harbin, v. 22, n. 2, p. 209–215, 2011. DOI: 10.1007/s11676-011-0152-1
- KUMAR, A.; SOOD, A.; PALNI, L.M.S.; GUPTA, A.K. *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort.: synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 57, n. 2, p. 105–112, 1999. DOI: 10.1023/A:1006373314814zho
- LEONEL, S.; RODRIGUES, J.D. Efeito da época de estaquia, fitorreguladores e ácido bórico no enraizamento de estacas de porta-enxertos de videira. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, n. 1, p. 27–32, 1993. DOI: 10.1590/S0103-90161993000100005
- LI, S.W.; XUE, L.; XU, S.; FENG, H.; AN, L. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **The Botanical Review**, New York, v. 75, n. 2, p. 230–247, 2009. DOI: 10.1007/s12229-009-9029-9
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society**, Ashville, v. 30, p. 421–427, 1980.

- LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 32, n. 2/3, p. 219–230, 2000. DOI: 10.1023/A:1010746806891
- MACARTHUR, B.D.; MA'AYAN, A.; LEMISCHKA, I.R. Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 10, n. 10, p. 672–681, 2009. DOI: 10.1038/nrm2766
- MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, E.M.; ZARPELON, T.G.; SIQUEIRA, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 843–851, 2005. DOI: 10.1590/S0100-67622005000600002
- MAJADA, J.; MARTÍNEZ-ALONSO, C.; FEITO, I.; KIDELMAN, A.; ARANDA, I.; ALÍA, R. Mini-cuttings: an effective technique for the propagation of *Pinus pinaster* Ait. **New Forests**, Dordrecht, v. 41, n. 3, p. 399–412, 2011. DOI: 10.1007/s11056-010-9232-x
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638 p.
- MALTA, M.R.; FURTINI NETO, A.E.; ALVES, J.D.; GUIMARÃES, P.T.G. Efeito da aplicação de zinco via foliar na síntese de triptofano, aminoácidos e proteínas solúveis em mudas de cafeeiro. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 14, n. 1, p. 31–37, 2002. DOI: 10.1590/S1677-04202002000100004
- MEDEIROS, J.F.; BELTRÃO, N.E.M.; MEDEIROS, J.C. Boro no metabolismo vegetal e adubação boratada no algodoeiro herbáceo. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 7, n. 2/3, p. 743–752, 2003.
- MERKLE, S.A.; NAIRN, C.J. Hardwood tree biotechnology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 41, n. 5, p. 602–619, 2005. DOI: 10.1079/IVP2005687
- MINDÊLLO NETO, U.R. Enraizamento de estacas de pessegueiro em função do uso de ácido indolbutírico e fertilizante orgânico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 92–94, 2005. DOI: 10.1590/S0100-29452005000100025
- MORI, Y.; NISHIMURA, T.; KOSHIBA, T. Vigorous synthesis of indole-3-acetic acid in the apical very tip leads to a constant basipetal flow of the hormone in maize coleoptiles. **Plant Science**, Limerick, v. 168, n. 2, p. 467–473, 2005. DOI: 10.1016/j.plantsci.2004.09.010
- MUJIU, L.; ARNOLD, R.; BOHAI, L.; MINSHENG, Y. Selection of cold-tolerant eucalypts for Hunan Province. In: TURNBULL, J.W. (Ed.). **Eucalypts in Asia**: proceedings of a international conference held in Zhanjiang, Guangdong, people's Republic of China. Canberra: Elect Printing, 2003. p. 107–116. (ACIAR. Proceedings, 111).
- MÜLLER, A.; WEILER, E.W. IAA-synthase, an enzyme complex from *Arabidopsis thaliana* catalyzing the formation of indole-3-acetic acid from (S)-tryptophan. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 381, n. 8, p. 679–686, 2000. DOI: 10.1515/BC.2000.088

MÜLLER, A.; HILLEBRAND, H.; WEILER, E.W. Indole-3-acetic acid is synthesized from L-tryptophan in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Berlin, v. 206, n. 3, p. 362–369, 1998. DOI: 10.1007/s004250050411

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

NEHRA, N.S.; BECWAR, M.R.; ROTTMANN, W.H.; PEARSON, L.; CHOWDHURY, K.; CHANG, S.; WILDE, H.D.; KODRZYCKI, R.J.; ZHANG, C.; GAUSE, K.C.; PARKS, D.W.; HINCHEE, M.A. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 41, n. 6, p. 701–717, 2005. DOI: 10.1079/IVP2005691

NICOLOSO, F.T.; LAZZARI, M.; FORTUNATO, R.P. Propagação vegetativa de *Platanus acerifolia* Ait: (II) efeito da aplicação de zinco, boro e ácido indolbutírico no enraizamento de estacas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 487–492, 1999. DOI: 10.1590/S0103-84781999000300018

NOURISSIER, S.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of two *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* mature clones. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 44, n. 4, p. 263–272, 2008. DOI: 10.1007/s11627-008-9109-2

ONO, E.O.; RODRIGUES, I.D.; PINHO, S.Z. Interações entre auxinas e ácido bórico, no enraizamento de estacas caulinares de *Coffea arabica* L. cv Mundo Novo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 49, n. 1, p. 23–27, 1992. DOI: 10.1590/S0103-90161992000400005

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

PAPP, B.; PLATH, K. Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. **Cell Research**, Shanghai, v. 21, n. 3, p. 486–501, 2011. DOI: 10.1038/cr.2011.28

PAVLINOVA, O.A.; BALAKHONTSEV, E.N.; PRASOLOVA, M.F.; TURKINA, M.V. Sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase, and invertase in sugar beet leaves. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 49, n. 1, p. 68–73, 2002. DOI: 10.1023/A:1013712311720

PERRINE, F.M.; ROLFE, B.G.; HYNES, M.F.; HOCART, C.H. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of indoleacetic acid and tryptophan following aqueous chloroformate derivatisation of *Rhizobium* exudates. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, n. 9, p. 723–729, 2004. DOI: 10.1016/j.plaphy.2004.07.008

POHIO, K.E.; WALLACE, H.M.; PETERS, R.F.; SMITH, T.E.; TRUEMAN, S.J. Cuttings of Wollemi pine tolerate moderate photoinhibition and remain highly capable of root formation. **Trees - Structure and Function**, Berlin, v. 19, n. 5, p. 587–595, 2005. DOI: 10.1007/s00468-005-0418-3

POLLMANN, S.; DÜCHTING, P.; WEILER, E.W. Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by ‘IAA-synthase’ proceeds via indole-3-acetamide. **Phytochemistry**, New York, v. 70, n. 4, p. 523–531, 2009. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.01.021

- RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 38, n. 2, p. 116–124, 2002. DOI: 10.1079/IVP2001269
- RISOPATRON, J.P.M.; SUN, Y.; JONES, B.J. The vascular cambium: molecular control of cellular structure. **Protoplasma**, New York, v. 247, n. 3/4, p. 145–161, 2010. DOI: 10.1007/s00709-010-0211-z
- ROSA, L.S.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; REISSMANN, C.B. Efeito da dose de nitrogênio e de formulações de substratos na miniestaquia de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1025–1035, 2009. DOI: 10.1590/S0100-67622009000600005
- RUBIO, V.; BUSTOS, R.; IRIGOYEN, M.L.; CARDONA-LÓPEZ, X.; ROJAS-TRIANA, M.; PAZ-ARES, J. Plant hormones and nutrient signaling. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 361–373, 2009. DOI: 10.1007/s11103-008-9380-y
- SAKYA, A.T.; DELL, B.; HUANG, L. Boron requirements for *Eucalyptus globulus* seedlings. **Plant and Soil**, The Hague, v. 246, n. 1, p. 87–95, 2002. DOI: 10.1023/A:1021589029492
- SAN-FRANCISCO, S.; HOUDUSSE, F.; ZAMARREÑO, A.M.; GARNICA, M.; CASANOVA, E.; GARCÍA-MINA, J.M. Effects of IAA and IAA precursors on the development, mineral nutrition, IAA content and free polyamine content of pepper plants cultivated in hydroponic conditions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 38–52, 2005. DOI: 10.1016/j.scienta.2005.03.006
- SCALON, S.P.Q.; RAMOS, M.B.M.; VIEIRA, M.C. Auxinas e boro no comprimento da maior raiz e número de estacas enraizadas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e carqueja (*Baccharis trimera* Less A.P.D.C.) em duas épocas de plantio. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 5, n. 2, p. 71–76, 2003.
- SCHWAMBACH, J.; FADANELLI, C.; FETT-NETO, A.G. Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 487–494, 2005. DOI: 10.1093/treephys/25.4.487
- SCHWAMBACH, J.; RUEDELL, C.M.; ALMEIDA, M.R.; PENCHEL, R.M.; ARAÚJO, E.F.; FETT-NETO, A.G. Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* x *maidennii* mini-cuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. **New Forests**, Dordrecht, v. 36, n. 3, p. 261–271, 2008. DOI: 10.1007/s11056-008-9099-2
- SEIDLICH, B.; DOUGLAS, S.; OCULUS, E.J. **A vegetation management plan for the Sydney Region**. Sydney: Sydney Regional Organizations, ANCA, ALGA, 1997. 117 p.
- SGARBI, F.; SILVEIRA, R.L.V.A.; TAKAHASHI, E.N.; CAMARGO, M.A.F. Crescimento e produção de biomassa de clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em condições de deficiência de macronutrientes, B e Zn. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 56, p. 69–82, 1999.

SILVA, H.D.; FERREIRA, C.A.; CORRÊA, R.S.; BELLOTE, A.F.J.; TUSSOLINI, E.L. Alocação de biomassa e ajuste de equações para estimativa de biomassa em compartimentos aéreos de *Eucalyptus benthamii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 49, p. 83–95, 2004.

SILVA, L.D. **Melhoramento genético de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage visando a produção de madeira serrada em áreas de ocorrência de geadas severas**. 2008. 275 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N.; KRÜGNER, T.L. Estado nutricional de *Eucalyptus citriodora* Hook cultivado sob diferentes doses de boro e sua relação com a agressividade de *Botryosphaeria ribis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 53, p. 57–70, 1998.

SILVEIRA, R.L.V.A.; MOREIRA, A.; HIGASHI, E.N. Crescimento e sobrevivência de mudas de eucalipto sob doses de boro cultivadas em condições de viveiro e de campo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 366–371, 2004. DOI: 10.1590/S1413-70542004000200017

SILVEIRA, R.L.V.A.; MOREIRA, A.; TAKASHI, E.N.; SGARBI, F.; BRANCO, E.F. Sintomas de deficiência de macronutrientes e de boro em clones híbridos de *Eucalyptus grandis* com *Eucalyptus urophylla*. **Cerne**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 107–116, 2002.

SILVEIRA, R.L.V.A.; TAKAHASHI, E.N.; SGARBI, F.; CAMARGO, M.A.F.; MOREIRA, A. Crescimento e estado nutricional de brotações de *Eucalyptus citriodora* sob doses de boro em solução nutritiva. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 57, p. 53–67, 2000.

SMET, I.; BEECKMAN, T. Asymmetric cell division in land plants and algae: the driving force for differentiation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 12, n. 3, p. 177–188, 2011. DOI: 10.1038/nrm3064

SMET, I.; VOß, U.; JÜRGENS, G.; BEECKMAN, T. Receptor-like kinases shape the plant. **Nature Cell Biology**, London, v. 11, n. 10, p. 1166–1173, 2009. DOI: 10.1038/ncb1009-1166

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

STAPE, J.L.; GONÇALVES, J.L.M.; GONÇALVES, A.N. Relationships between nursery practices and field performance for *Eucalyptus* plantations in Brazil. **New Forests**, Dordrecht, v. 22, n. 1/2, p. 19–41, 2001. DOI: 10.1023/A:1012271616115

STENVALL, N.; PIISILÄ, M.; PULKKINEN, P. Seasonal fluctuation of root carbohydrates in hybrid aspen clones and its relationship to the sprouting efficiency of root cuttings. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 39, n. 8, p. 1531–1537, 2009. DOI: 10.1139/X09-066

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

THORPE, T.A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 37, n. 2, p. 169–180, 2007. DOI: 10.1007/s12033-007-0031-3

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Dinâmica do enraizamento de microestacas de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 6, p. 665–673, 2002. DOI: 10.1590/S0100-67622002000600003

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; REIS, G.G. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 1–7, 2003. DOI: 10.1590/S0100-67622003000100001

TREVISAM, R. **Atuação de concentrações de boro na morfogênese de *Eucalyptus urophylla* cultivados *in vitro***. 2001. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

_____. **Análises histológicas e bioquímicas em calos de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake cultivados *in vitro* sob interação nutricional de boro e cálcio**. 2005. 167 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

TREVISAM, R.; BRONDANI, G.E.; SOUZA, R.; ALMEIDA, M. Morfologia de calos de *Eucalyptus urophylla* cultivados *in vitro* sob concentrações de boro e cálcio. **Floresta**, Curitiba, v. 41, n. 3, p. 563–574, 2011a.

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

TRINDADE, H.; PAIS, M.S. *In vitro* studies on *Eucalyptus globulus* rooting ability. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 33, n. 1, p. 1–5, 1997. DOI: 10.1007/s11627-997-0032-8

VASIL, I.K. A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 9, p. 1423–1440, 2008a. DOI: 10.1007/s00299-008-0571-4

_____. A short history of plant biotechnology. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 7, n. 3, p. 387–394, 2008b. DOI: 10.1007/s11101-007-9075-z

_____. History and evolution of the International Association for Plant Biotechnology (IAPB): 1963–2008. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 44, n. 5, p. 365–372, 2008c. DOI: 10.1007/s11627-008-9148-8

VEYRES, N.; DANON, A.; AONO, M.; GALLIOT, S.; KARIBASAPPA, Y.B.; DIET, A.; GRANDMOTTET, F.; TAMAOKI, M.; LESUR, D.; PILARD, S.; BOITEL-CONTI, M.; SANGWAN-NORREEL, B.S.; SANGWAN, R.S. The *Arabidopsis* sweetie mutant is affected in carbohydrate metabolism and defective in the control of growth, development and senescence. **The Plant Journal**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 665–686, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03541.x

WATT, M.P.; BERJAK, P.; MAKHATHINI, A.; BLAKEWAY, F. *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 3, p. 233–240, 2003. DOI: 10.1023/A:1025819826742

WENDLING, I.; XAVIER, A. Miniestaquia seriada no rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 4, p. 475–480, 2003. DOI: 10.1590/S0100-204X2003000400005

_____. Influência da miniestaquia seriada no vigor radicular de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 681–689, 2005a. DOI: 10.1590/S0100-67622005000500003

_____. Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 921–930, 2005b.

WENDLING, I.; BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; HANSEL, F.A. Mini-cuttings technique: a new *ex vitro* method for clonal propagation of sweetgum. **New Forests**, Dordrecht, v. 39, n. 3, p. 343–353, 2010. DOI: 10.1007/s11056-009-9175-2

WENDLING, I.; XAVIER, A.; GOMES, J.M.; PIRES, I.E.; ANDRADE, H.B. Efeito do regulador de crescimento AIB na propagação de clones de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 187–192, 2000.

WIT ONDAS, H.W.; BRONDANI, G.E.; ALMEIDA, C.V.; ALMEIDA, M. Caracterização anatômica da propagação clonal *in vitro* de *Eucalyptus benthamii*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 18., 2010, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 2010. 1 CD-ROM.

WIT ONDAS, H.W.; BRONDANI, G.E.; FIGUEIREDO, C.R.F.; ALMEIDA, C.V.; ALMEIDA, M. Exposição ao frio e análise histológica no enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 17., 2009, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: FMVZ, 2009. 1 CD-ROM.

WOODWARD, A.W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 5, p. 707–735, 2005. DOI: 10.1093/aob/mci083

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

XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus***. Viçosa: SIF, 1998. 10 p. (SIF. Informativo Técnico, 11).

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

2 AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE MINIJARDIM CLONAL DE *Eucalyptus benthamii* EM RELAÇÃO AO ZN, B E COLETAS DE BROTAÇÕES

Resumo

A produção de mudas clonais de *Eucalyptus benthamii* não está estabelecida comercialmente, sendo que o manejo nutricional do minijardim clonal apresenta controle fundamental para obter brotações em qualidade e quantidade suficientes para a confecção de miniestacas. Objetivou-se avaliar a sobrevivência de minicepas de *Eucalyptus benthamii*, a produção de miniestacas, e os teores foliares nutricionais e de carboidratos em relação a diferentes concentrações de Zn e B ao longo de sucessivas coletas de brotações. As brotações para a confecção das miniestacas foram oriundas de minicepas (clones BP101, BP118 e BP120) fertirrigadas com soluções nutritivas variando nas concentrações de Zn e B (S1 – isento de Zn e B, S2 – 0,5 mg L⁻¹ de Zn, S3 – 0,5 mg L⁻¹ de B, S4 – 0,5 mg L⁻¹ de Zn e B, S5 – 1,0 mg L⁻¹ de Zn e B, S6 – 2,0 mg L⁻¹ de Zn e B), sendo realizadas oito coletas de brotações do minijardim clonal. Ao longo do experimento foram avaliadas a sobrevivência das minicepas, a produção de miniestaca por metro quadrado ao ano, número de folhas, número de nós, comprimento de brotações, intervalo de entrenós e aparência visual das minicepas visando identificar sintomas de deficiência ou toxidez nutricional. O experimento foi conduzido no delineamento em blocos completos ao acaso em arranjo fatorial (3x8x6) com parcelas subdivididas no tempo, com cinco blocos contendo duas minicepas por parcela. Em cada coleta de brotos foi determinado o teor nutricional foliar de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn, independente do clone. Dessa forma, considerou-se o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (8x6) com parcelas subdivididas no tempo, com três repetições. O teor foliar total de carboidratos solúveis não estruturais (sacarose, glicose e frutose) foi determinado na 2^a, 4^a, 6^a e 8^a coletas de brotações, independente do clone. Dessa forma, considerou-se o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (4x6) com parcelas subdivididas no tempo, com três repetições. A sobrevivência das minicepas, produção de miniestacas por metro quadrado ao ano, número de folhas, número de nós, comprimento de brotações, intervalo de entrenós e os teores foliares de macro e micronutrientes variaram significativamente em relação aos tratamentos avaliados, sendo que as soluções S5 (1,0 mg L⁻¹ de Zn e B) e S6 (2,0 mg L⁻¹ de Zn e B) apresentaram as melhores respostas para todos os clones. Os teores foliares de sacarose, glicose e total de carboidratos solúveis não estruturais variaram em relação a coleta de brotações e solução nutritiva. O teor foliar de frutose variou somente em relação a solução nutritiva. O aumento das concentrações de Zn e B na solução nutritiva induziu redução dos teores foliares totais de carboidratos solúveis não estruturais, sendo a frutose a mais afetada.

Palavras-chave: Solução nutritiva; Fertirrigação; Miniestaquia; Clonagem; Teor nutricional; Glicose; Frutose; Sacarose; Auxina

Abstract

The producing clonal of *Eucalyptus benthamii* is not commercially established, and the nutritional management of the clonal mini-garden presents fundamental role for shoots production in quality and quantity sufficient for the preparation of mini-cuttings. The aim of this study was to evaluate the mini-stumps survival of *Eucalyptus benthamii*, the mini-cuttings production, foliar content of nutrient and content of soluble carbohydrates non-structural regarding to Zn and B concentrations during successive collection of shoots. Shoots for the preparation of mini-cuttings were collected from mini-stumps (BP101, BP118 and

BP120 clones) fertigated with nutrient solutions containing different concentrations of Zn and B (S1 – free of Zn and B, S2 – 0.5 mg L⁻¹ Zn, S3 – 0.5 mg L⁻¹ B, S4 – 0.5 mg L⁻¹ Zn and B, S5 – 1.0 mg L⁻¹ Zn and B, S6 – 2.0 mg L⁻¹ Zn and B). Eight shoot collections of the clonal mini-garden were performed. The mini-stumps survival, mini-cuttings production per square meter per year, leaves number, nodes number, shoots length, internodes interval and visual appearance of mini-stumps to identify symptoms of nutritional deficiency or toxicity were evaluated. The experiment was conducted in randomized complete block design in factorial arrangement (3x8x6) with split-plot in time, containing five blocks of two mini-stumps per plot. In each shoot collection was determined the leaf nutritional content (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn and Zn), regardless of clone, considering the completely randomized design in factorial arrangement (8x6) with split-plot in time, containing three replications. The content total of soluble carbohydrates non-structural of leaves (sucrose, glucose and fructose) was determined in the 2nd, 4th, 6th and 8th shoot collections, regardless of clone, considering the completely randomized design in factorial arrangement (4x6) with split-plot in time, containing three replications. The mini-stumps survival, mini-cuttings production per square meter per year, leaves number, nodes number, shoots length, internodes interval and foliar content of macro and micronutrients varied significantly in relation to treatments, and the nutritive solutions S5 (1.0 mg L⁻¹ Zn and B) and S6 (2.0 mg L⁻¹ Zn and B) presented the best responses to all clones. Foliar content of sucrose, glucose and total content of soluble carbohydrates non-structural of leaves varied regarding the shoots collection and nutrient solution. The foliar content of fructose varied only in relation to nutrient solution. The increasing of the Zn and B concentrations in the nutrient solution induced reduction of the total content of soluble carbohydrates non-structural of leaves, and the fructose was the most affected.

Keywords: Nutritive solution; Fertigation; Mini-cutting technique; Cloning; Nutritional content; Glucose; Fructose; Sucrose; Auxin

2.1 Introdução

A clonagem de espécies de *Eucalyptus* em escala comercial no Brasil já é realidade, seja ela realizada pela técnica de estaquia, miniestaquia ou por micropropagação. Atualmente, a técnica de miniestaquia é a mais difundida entre as grandes empresas florestais, sendo responsável pela produção de milhares de mudas para o abastecimento do setor. A micropropagação é utilizada em casos específicos, principalmente para promover o rejuvenescimento dos clones selecionados e produzir mudas para serem utilizadas como microcepas em sistemas de microjardins clonais. A estaquia geralmente é utilizada para o resgate de matrizes adultas, e devido aos baixos índices de enraizamento, ao comparar com as demais técnicas de propagação (ALFENAS et al., 2004), não é empregada em escala comercial.

Apesar de todos os avanços nos últimos anos proporcionados pela pesquisa na área de biotecnologia florestal, alguns problemas ainda persistem em termos de clonagem de *Eucalyptus*, principalmente ao considerar as espécies destinadas ao plantio em regiões mais

frias. O *Eucalyptus benthamii* é uma espécie considerada de clima subtropical (JOVANOVIC; BOOTH, 2002; MUJIU et al., 2003; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006) que apresenta problemas na fase de rizogênese em propágulos (BRONDANI; GONÇALVES; ALMEIDA, 2010), o que pode comprometer a produção de mudas de genótipos selecionados.

Essa espécie apresenta baixos índices de enraizamento pela estaquia (GRAÇA; SHIMIZU; TAVARES, 1999) e miniestaquia (BRONDANI; GONÇALVES; ALMEIDA, 2010; WIT ONDAS et al., 2009) ao comparar com as demais espécies de *Eucalyptus* destinadas ao plantio em regiões tropicais (ASSIS; MAFIA, 2007). Contudo, alguns progressos podem ser alcançados com o ajuste do manejo do minijardim clonal em termos de nutrição (ELDRIDGE et al., 1994; HARTMANN et al., 2011), o que pode proporcionar a produção de propágulos com maior predisposição ao enraizamento (ALFENAS et al., 2004; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2005; SCHWAMBACH et al., 2008; STAPE; GONÇALVES; GONÇALVES, 2001).

A base do minijardim clonal é composta pelo conjunto de minicepas (ALFENAS et al., 2004), sendo que a rizogênese em propágulos está intimamente ligada ao seu estado fisiológico (CUNHA et al., 2009c; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2005). Inúmeros trabalhos relatam que a sobrevivência de minicepas varia com o tempo de cultivo (ALMEIDA et al., 2007; BRONDANI et al., 2010a; BRONDANI et al., 2010b; WENDLING; XAVIER, 2005), com a nutrição (CUNHA; WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2005; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2005; ROSA et al., 2009), temperatura (ALFENAS et al., 2004), sazonalidade (BRONDANI, 2008; CUNHA et al., 2009a) e com as condições de manejo adotado durante a coleta de brotações (TITON et al., 2003), as quais podem interferir significativamente a produção (ALFENAS et al., 2004). De acordo com Higashi; Silveira e Gonçalves (2005) geralmente as minicepas de *Eucalyptus* apresentam adequada longevidade para suprir a produção de brotos por longos períodos, sendo essas substituídas durante a observação da queda repentina da produção de brotos (ALFENAS et al., 2004), aumento da mortalidade (ASSIS; MAFIA, 2007) e pelo ataque de pragas e doenças associadas ou não a alterações fisiológicas, como deficiências nutricionais (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2005; SILVEIRA; GONÇALVES; KRÜGNER, 1998).

Os micronutrientes Zn e B, devido as suas funções fisiológicas (GHNAYA et al., 2010; EPSTEIN; BLOOM, 2004; MEDEIROS; BELTRÃO; MEDEIROS, 2003; RUBIO et al., 2009; SAKYA; DELL; HUANG, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2009) são considerados importantes componentes da solução nutritiva para garantir a produção de brotações com qualidade e

quantidade suficientes para serem usadas na miniestaquia. As concentrações desses micronutrientes na solução nutritiva variam de acordo com as condições de manejo para cada genótipo de interesse, contudo não existe relato de suas variações na fertirrigação de minicepas de *Eucalyptus benthamii*, bem como, sobre os efeitos morfofisiológicos na produção de brotações.

Não obstante, o acúmulo de carboidrato (glicose, frutose e sacarose) também está intimamente relacionado ao metabolismo da planta (PAVLINOVA et al., 2002; STENVALL; PIISILÄ; PULKKINEN, 2009; VEYRES et al., 2008), os quais são requeridos em importantes rotas bioquímicas (TAIZ; ZEIGER, 2009). O acúmulo de carboidratos nos tecidos foliares varia com as condições de manejo e época do ano (BORBA; SCARPARE FILHO; KLUGE, 2005; HARTMANN et al., 2011; KERSTEN; LUCCHESI; GUTIERREZ, 1993; MINDÉLLO NETO, 2005) e afetam o processo morfogênico e/ou organogênico (AGULLÓ-ANTÓN et al., 2011; CORUZZI; ZHOU, 2001; KUMAR et al., 1999; STENVALL; PIISILÄ; PULKKINEN, 2009; VEYRES et al., 2008).

Em termos de crescimento e desenvolvimento da planta destacam-se os hormônios vegetais (GIANFAGNA, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2009) e, dentre as diversas classes, as auxinas desempenham papéis importantes no ciclo vegetativo, além de estarem intimamente relacionadas ao enraizamento de propágulos (ALABADÍ; BLÁZQUEZ, 2009; LUDWIG-MÜLLER, 2000; MÜLLER; WEILER, 2000; POLLMANN; DÜCHTING; WEILER, 2009). O triptofano é um aminoácido comum em plantas que é considerado um precursor de AIA (MÜLLER; DÜCHTING; WEILER, 2002; POLLMANN; DÜCHTING; WEILER, 2009; SAN-FRANCISCO et al., 2005), sendo que o Zn é essencial para a sua síntese (ISHIHARA et al., 2007; MALTA et al., 2002; SOUZA; PEREIRA, 2007). Dessa forma, o suprimento adequado de nutrientes no minijardim clonal por meio da fertirrigação poderá influenciar os teores endógenos de auxinas e triptofano, favorecendo a qualidade da brotação emitida e sua predisposição ao enraizamento.

Com base no exposto, o presente trabalho apresenta as seguintes hipóteses e objetivos:

2.1.1 Hipóteses

- A produção de miniestacas e a sobrevivência de minicepas variam de acordo com as coletas de brotações, concentrações de Zn e B e, material genético;

- O teor nutricional foliar das minicepas (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn) varia de acordo com as coletas de brotações e concentrações de Zn e B;
- Os teores foliares de carboidratos solúveis não estruturais (glicose, frutose e sacarose) das minicepas variam de acordo com as coletas de brotações e concentrações de Zn e B.

2.1.2 Objetivos

- Quantificar a produção de miniestacas e a sobrevivência de minicepas em relação as coletas de brotações, concentrações de Zn e B e, material genético;
- Determinar o teor nutricional foliar das minicepas (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn) em relação as coletas de brotações e concentrações de Zn e B;
- Determinar os teores foliares de carboidratos solúveis não estruturais (glicose, frutose e sacarose) das minicepas em relação as coletas de brotações e concentrações de Zn e B.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Caracterização geral

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia das Árvores e Viveiro Florestal, ambos pertencentes ao Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, Piracicaba-SP. As análises químicas nutricionais foram realizadas no Laboratório de Ecologia Aplicada do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP. A determinação dos teores foliares de carboidratos solúveis não estruturais foi realizada na Embrapa Florestas - Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, Colombo-PR.

2.2.2 Constituição do minijardim clonal

Mudas clonais identificadas como BP101, BP118 e BP120 dos genótipos superiores de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage foram utilizadas para a instalação dos experimentos. As plantas matrizes foram provenientes de teste de progênes com dois anos e

seis meses de idade, o qual foi estabelecido no espaçamento 2,0 x 3,0 m em Concórdia-SC. O lote de sementes foi adquirido da população base genética de *Eucalyptus benthamii* da Embrapa Florestas-CNPq, Colombo-PR.

As unidades experimentais foram compostas por mudas clonais propagadas pelo processo de miniestaquia com aplicação de 2.000 mg L⁻¹ de AIB e cultivadas em vasos plásticos (18 x 16 x 45 cm) com duas aberturas na porção inferior (Figura 1 A). O substrato foi composto por areia, fração fina (0,10 mm < diâmetro de partícula < 0,25 mm), o qual foi peneirado (peneira de malha 3 mm), lavado com água deionizada por cinco vezes e autoclavado durante 20 minutos a 121°C ($\approx 1,0 \text{ kgf cm}^{-2}$), a fim de erradicar plantas daninhas e patógenos, como fungos e bactérias. Previamente ao plantio das mudas nos vasos, procedeu-se a lavagem do sistema radicular das mudas com água deionizada durante 10 minutos, com a finalidade de lixiviar nutrientes e demais componentes aderidos.



Figura 1 - Unidade experimental para a constituição do minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii*. (A) detalhe do vaso contendo areia fina; (B) detalhe da indução de brotações axilares pela quebra do caule aos 21 dias; (C) disposição dos vasos contendo as minicepas aos 50 dias; (D) minicepas emitindo brotações aptas para a coleta aos 50 dias

Os vasos foram suspensos por grades metálicas a 85 cm do solo, sendo plantadas seis mudas por vaso no espaçamento 10 x 8 cm, os quais foram compostos por duas mudas de cada clone dispostas sequencialmente. Após sete dias efetuou-se a quebra do caule das mudas

a 10 cm acima da porção basal, com a finalidade de reduzir a dominância apical e favorecer o crescimento de brotações axilares, as quais foram emitidas aos 21 dias após a quebra do caule (Figura 1 B).

Para a formação das minicepas, foi realizada poda da parte aérea a 7 cm acima da base da muda, aos 15 dias após a quebra do caule, conforme metodologia descrita por Brondani (2008), constituindo o minijardim clonal em sistema de vaso (Figura 1 C-D).

2.2.3 Manejo das minicepas

O minijardim clonal foi instalado em condições de casa de vegetação recoberta com polietileno transparente e composta por dois sistemas de ventiladores, sendo que os dados da temperatura do ar foram coletados diariamente visando uma possível correlação com as variáveis respostas (Anexo A). A cada sete dias adicionou-se 100 mL de solução nutritiva básica por minicepa (Tabela 1), sendo realizada irrigação com água deionizada diariamente, visando suprir a perda excessiva por evapotranspiração. A cada semana foi realizada lavagem da areia com água deionizada para evitar o excesso de salinização.

Tabela 1 - Composição da solução nutritiva básica para a fertirrigação do minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii*

Nutriente	Solução Nutritiva* (mg L ⁻¹)	
N-NO ₃ ⁻	60,00	
N-NH ₄ ⁺	30,00	
P	12,00	
Ca	40,00	
K	80,00	
S	10,00	
Mg	12,00	
Cu	0,10	
Fe	2,00	
Mo	0,02	
Mn	1,60	
Fonte de Macro e Micronutriente	FQ / PM	(mg L ⁻¹)
Nitrato de potássio (Nuclear [®])	KNO ₃ / 101,10	206,85
Monoamônio fostato (Mallinckrodt [®])	NH ₄ H ₂ PO ₄ / 115,03	44,57
Nitrato de amônio (Reagex [®])	NH ₄ NO ₃ / 80,04	140,50
Cloreto de cálcio (Synth [®])	CaCl ₂ .2H ₂ O / 147,02	111,13
Nitrato de cálcio (Labsynth [®])	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O / 236,15	57,18
Cloreto de magnésio (Synth [®])	MgCl ₂ .6H ₂ O / 203,30	50,46
Sulfato de magnésio (Mallinckrodt [®])	MgSO ₄ .7H ₂ O / 246,48	60,49
Sulfato de manganês (Ecibra [®])	MnSO ₄ .H ₂ O / 169,01	4,9223
Sulfato de cobre (Mallinckrodt [®])	CuSO ₄ .5H ₂ O / 249,68	0,3929
Sulfato de ferro (Synth [®])	FeSO ₄ .7H ₂ O / 278,02	9,9520
Sódio - EDTA (Nuclear [®])	Na ₂ -EDTA.2H ₂ O / 372,24	13,3110
Molibdato de sódio (Merck [®])	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O / 241,95	0,0504

* O pH foi ajustado para 6,2 a 25°C com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH), ambos a 1M. FQ = fórmula química, PM = peso molecular

2.2.4 Tratamentos e delineamento experimental

2.2.4.1 Sobrevivência de minicepas e produção de miniestacas

Para avaliação da sobrevivência de minicepas e da produtividade de miniestacas foi monitorado o crescimento e desenvolvimento das minicepas ao longo de sucessivas coletas de brotações. Como tratamentos foram aplicados diferentes concentrações de zinco (Zn) e boro (B), os quais foram fornecidos por meio de solução nutritiva (Tabela 2).

Tabela 2 - Combinação das concentrações de Zn e B para a composição das soluções nutritivas

Solução Nutritiva	Zn ⁽¹⁾ (mg L ⁻¹)	B ⁽²⁾ (mg L ⁻¹)
S1	0,00	0,00
S2	0,50	0,00
S3	0,00	0,50
S4	0,50	0,50
S5	1,00	1,00
S6	2,00	2,00

⁽¹⁾ Fornecido na forma de sulfato de zinco (Mallinckrodt® / ZnSO₄.7H₂O / 287,54). ⁽²⁾ Fornecido na forma de ácido bórico (Ecibra® / H₃BO₃ / 61,83)

O experimento foi conduzido com base na solução nutritiva apresentada na Tabela 1, variando somente as concentrações dos elementos Zn e B de acordo com as combinações apresentadas na Tabela 2.

O experimento foi conduzido no delineamento em blocos completos ao acaso em arranjo fatorial (3x8x6) com parcelas subdivididas no tempo, sendo os fatores constituídos por três clones (BP101, BP118 e BP120), oito coletas de brotações e seis combinações de Zn e B (Tabela 2), com cinco blocos contendo duas minicepas por parcela.

A cada sete dias adicionou-se 100 mL da solução nutritiva (Tabelas 1 e 2) por minicepa (Figura 1 C-D). O experimento foi conduzido durante 12 meses, sendo realizadas coletas sucessivas de brotações com intervalos variando de 21 a 35 dias. Ao longo do experimento foram avaliadas a sobrevivência das minicepas (SOB), o número de miniestaca por metro quadrado ao ano (NM), comprimento de broto (CB), número de folhas (NF), número de nós (NN), intervalo de entrenós (IN) e aparência visual das minicepas visando identificar sintomas de deficiência ou toxidez nutricional (DELL; MALAJCZUK; GROVE, 1995). Em cada coleta de brotos foi determinado o teor nutricional foliar de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn. Os teores de carboidratos solúveis não estruturais existentes nos tecidos da folha foram determinados na 2^a, 4^a, 6^a e 8^a coleta de brotações.

O número de miniestacas por metro quadrado ao ano foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$NM = \frac{NMI \cdot DA}{IC \cdot AE}$$

Onde:

NM = número de miniestaca por metro quadrado ao ano (miniestaca m⁻² ano⁻¹);

NMI = número de miniestaca por minicepa;

DA = total de dias do ano (considerou-se 365 dias);

IC = intervalo em dias entre cada coleta de brotações;

AE = área efetiva de cada minicepa (determinado pelo espaçamento do plantio das minicepas no vaso, o qual foi 10 x 8 cm, correspondendo a 0,008 m⁻²).

2.2.4.2 Teor foliar de nutrientes

As amostras foliares entre os clones e blocos correspondentes a cada coleta de brotações foram misturadas a fim de atender a quantidade de matéria seca para efetuar a determinação dos teores foliares nutricionais. Dessa forma, o experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (8x6) com parcelas subdivididas no tempo, sendo os fatores constituídos por oito coletas de brotações e seis combinações de Zn e B (Tabela 2), com três repetições.

As amostras foram constituídas de folhas totalmente expandidas do terço superior da brotação, sendo que após a coleta, todas as folhas foram lavadas com água deionizada e, então foram secas a 60°C até apresentarem peso constante. Após esse processo, as folhas foram moídas até a consistência de pó. Os macro e micronutrientes foram determinados segundo método descrito por Malavolta; Vitti e Oliveira (1989). O N total foi determinado pelo método de digestão em ácido sulfúrico, Semi-Micro Kjeldahl. Os elementos P, S, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn e Mn foram determinados pelo método de digestão em ácido nítrico-perclórico. O P foi determinado por colorimetria de metavanadato de amônio e, o S por turbidimetria de sulfato de bário, com leitura em espectrofotômetro. O K foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica em fotômetro de chama com lâmpada de cátodo oco de K. Os elementos Ca, Mg, Fe, Cu, Zn e Mn foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica. O B foi determinado por digestão da matéria seca por meio de incineração em meio alcalino pelo método de colorimetria de azometina, seguida de leitura em espectrofotômetro.

2.2.4.3 Teor foliar de carboidratos solúveis não estruturais

As amostras foliares entre os clones e blocos correspondentes a cada coleta de brotações foram misturadas a fim de atender a quantidade de matéria fresca para efetuar a determinação dos teores de carboidratos. Dessa forma, o experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (4x6) com parcelas subdivididas no tempo, sendo os fatores constituídos por quatro coletas de brotações (2^a, 4^a, 6^a e 8^a coletas) e seis combinações de Zn e B (Tabela 2), com três repetições.

As amostras foram constituídas de folhas totalmente expandidas do terço superior da brotação (folhas apicais), sendo que após a coleta, todas as folhas foram lavadas com água deionizada. Para a determinação dos teores foliares de carboidratos solúveis não estruturais (sacarose, frutose e glicose), as folhas foram armazenadas em congelador a -80°C. Os extratos foram obtidos a partir de 160 mg (peso fresco) dos tecidos vegetais congelados. As amostras foram cortadas (tamanho de 1 mm²) e fervidas em banho maria (10 minutos) seguida de centrifugação (3 minutos a 16.000 RPM) e, por fim, as amostras foram filtradas (filtro descartável Millex - GP[®] com membrana estéril de 0,45 µm) com o uso de uma seringa de 10 mL. Após a filtragem, as alíquotas (eluato) foram completadas a 5 mL e então efetuou-se a leitura dos teores dos carboidratos. O eluato foi analisado por cromatografia de íons IC5000 (DIONEX, 2000), usando um detector eletroquímico. Os carboidratos foram separados usando uma coluna analítica Carbo PAC PA100 DIONEX, equipado com uma coluna guarda. Os padrões de glicose, frutose e sacarose (Sigma[®]) foram utilizados para determinar as concentrações dos carboidratos (DIONEX, 2000; VEYRES et al., 2008).

2.2.5 Análise estatística dos dados

Os dados mensurados de todos os experimentos foram submetidos ao teste de Hartley ($P < 0,05$) e Lilliefors ($P < 0,05$) e transformados quando necessário. Em seguida, foi realizada análise de variância (ANOVA, $P < 0,01$ e $P < 0,05$). De acordo com a significância da ANOVA, os dados dos fatores qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Realizou-se análise de correlação de Pearson ($P < 0,01$ e $P < 0,05$) dos dados ambientais com as variáveis mensuradas. Utilizaram-se os pacotes SOC (EMBRAPA, 1990) e STATISTICAL PROGRAM (MSTAT, 1994) para a análise estatística dos dados.

2.3 Resultados

2.3.1 Sobrevivência de minicepas e produção de miniestacas

De acordo com a análise de variância houve efeito significativo da coleta das brotações para a sobrevivência de minicepas (SOB), a qual também apresentou variação significativa de acordo com o clone e solução nutritiva (Tabela 3).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para a sobrevivência de minicepas (SOB), comprimento de broto (CB), número de folhas por broto (NF), número de nós por broto (NN), intervalo de entrenós por broto (IN) e número de miniestacas por metro quadrado ao ano (NM) de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação aos tratamentos avaliados ao longo de 316 dias de coletas sucessivas de brotações

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios					
		SOB ⁽¹⁾ (%)	CB ⁽²⁾ (cm broto ⁻¹)	NF ⁽²⁾ (folha broto ⁻¹)	NN ⁽²⁾ (nós broto ⁻¹)	IN ⁽²⁾ (cm broto ⁻¹)	NM ⁽³⁾ (mine m ⁻² ano ⁻¹)
Bloco	4	0,0280**	1,4585 ^{ns}	0,5774 ^{ns}	0,1322 ^{ns}	0,0380 ^{ns}	2,3515 ^{ns}
Coleta (COL)	7	0,0368**	83,8289**	80,5420**	20,1195**	16,6291**	130,2620**
Resíduo-COL	28	0,0053 ^{ns}	1,5180 ^{ns}	0,8629 ^{ns}	0,2136 ^{ns}	0,0580 ^{ns}	3,0331 ^{ns}
Parcela	39	–	–	–	–	–	–
Clone (CLO)	2	0,0443**	0,6748 ^{ns}	42,2732**	10,8950**	1,8937**	11,6455**
Solução (SOL)	5	0,0077 ^{ns}	3,1326 ^{ns}	1,0208 ^{ns}	0,2262 ^{ns}	0,1106 ^{ns}	20,2821**
COL*CLO	14	0,0113 ^{ns}	1,7109 ^{ns}	1,9273*	0,4662*	0,1191*	3,3798 ^{ns}
COL*SOL	35	0,0030 ^{ns}	2,2404 ^{ns}	1,4019*	0,3418*	0,0515 ^{ns}	4,4522**
CLO*SOL	10	0,0187**	2,6489 ^{ns}	0,8866 ^{ns}	0,2114 ^{ns}	0,0715 ^{ns}	5,4794*
COL*CLO*SOL	70	0,0048 ^{ns}	0,8665 ^{ns}	0,4998 ^{ns}	0,1236 ^{ns}	0,0322 ^{ns}	1,4339 ^{ns}
Resíduo	544	0,0067	1,9776	0,8716	0,2216	0,0563	2,2425
Subparcela	719	–	–	–	–	–	–
Média	–	97,36	7,25	7,65	3,83	1,92	8.497,60
CV _{exp.} (%)	–	8,35	19,39	12,18	12,28	12,31	16,61

^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. * e ** Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. ⁽¹⁾ e ⁽³⁾ Dados transformados por $[(n+0,5)/100]^{0,5}$ e $(n/100)^{0,5}$, onde n = dado amostrado. ⁽²⁾ Dados transformados para intervalo de 30 dias. GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental, mine = miniestaca

A sobrevivência de minicepas apresentou valores elevados (superior a 95%) até a 7ª coleta de brotações, não sendo verificada diferença significativa ao considerar a 1ª coleta de brotações até a 7ª coleta. Apenas na 8ª coleta de brotações foi constatada redução significativa da porcentagem de sobrevivência das minicepas, independente do clone avaliado. Contudo, ainda na 8ª coleta de brotações, os valores da porcentagem de sobrevivência das minicepas foram superiores a 91% (Figura 2), não inviabilizando o seu cultivo para a produção de brotações.

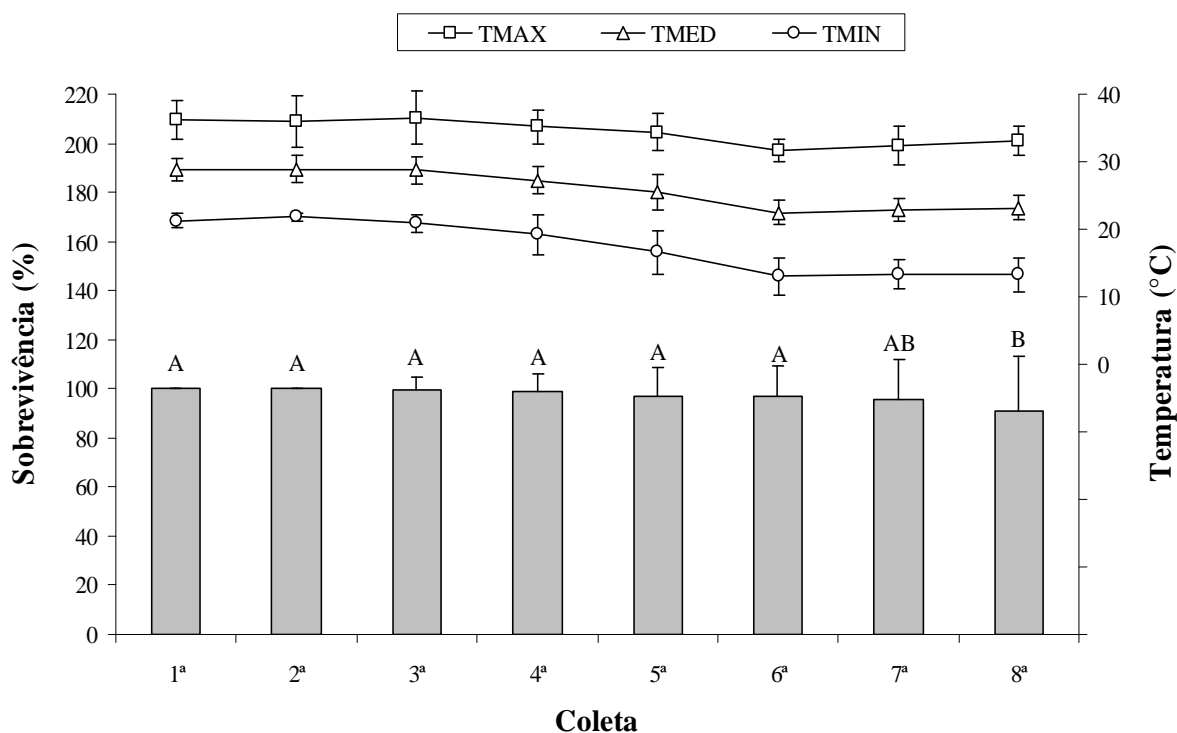


Figura 2 - Valores médios da sobrevivência de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação a coleta de brotações. Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média \pm desvio padrão

Ao analisar a sobrevivência de minicepas em relação ao clone e solução nutritiva na coleta final (8ª coleta de brotações), pode-se observar que o clone BP118 não variou significativamente em relação a solução nutritiva, apresentando elevada porcentagem de sobrevivência de minicepas (Figura 3).

Contudo, os clones BP101 e BP120, apresentaram diferença significativa da sobrevivência de minicepas em relação a solução nutritiva. Para ambos os clones, as soluções S5 e S6 apresentaram as maiores porcentagens de sobrevivência de minicepas, com valores superiores a 91%. O menor valor da porcentagem de sobrevivência foi registrado para as minicepas fertirrigadas com as soluções S1 e S2 (isentas de B), as quais diferiram significativamente das soluções S3, S4, S5 e S6 para ambos os clones (Figura 3).

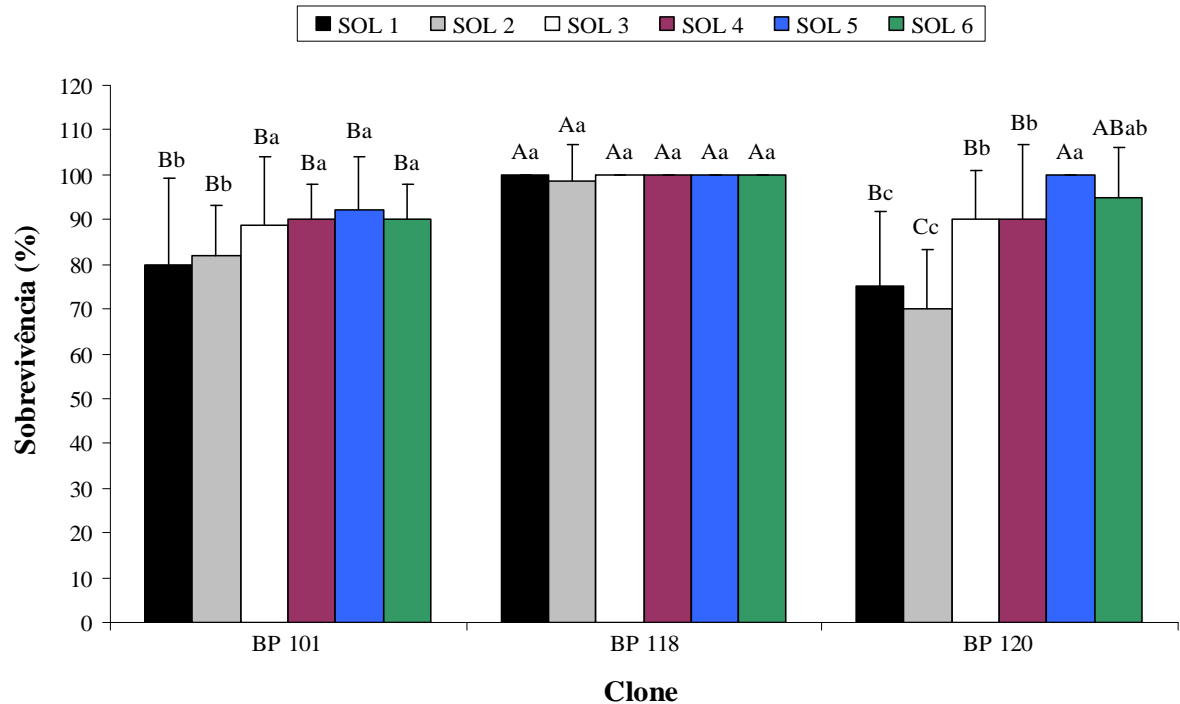


Figura 3 - Valores médios para a sobrevivência de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e solução nutritiva na 8ª coleta de brotações. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para a mesma solução nutritiva entre os clones e, médias seguidas por mesma letra minúscula para o mesmo clone entre as soluções nutritivas não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média \pm desvio padrão

A qualidade das brotações coletadas (ou seja, comprimento de broto, número de folhas e de nós, e intervalo de entrenós) variou significativamente ao longo das coletas de brotações (Tabela 3).

De acordo com a análise de variância houve efeito significativo da coleta de brotações em relação ao comprimento de broto, independente da solução nutritiva e clone (Tabela 3), ou seja, o tamanho de broto variou de acordo com o tempo. Os maiores valores do comprimento de broto foram mensurados na 5ª, 7ª e 8ª coletas de brotações, as quais não diferiram significativamente. A 3ª e 4ª coletas de brotações apresentaram os menores valores do comprimento de broto (Figura 4). Em termos gerais, o comprimento de broto variou de 5,73 a 8,39 cm, sendo adequados para a confecção de miniestacas.

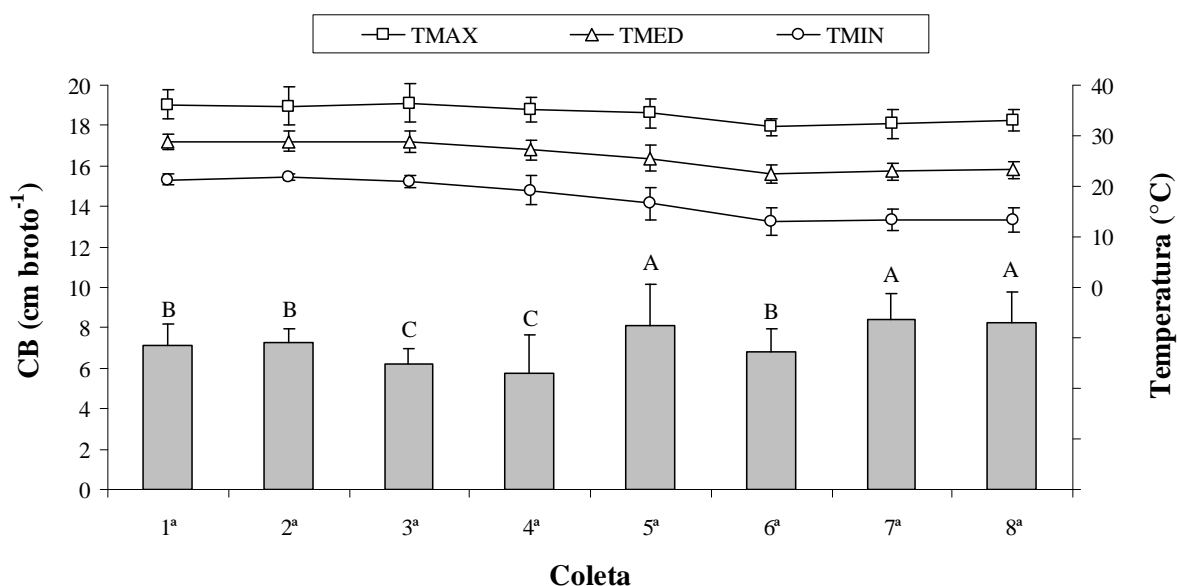


Figura 4 - Valores médios para o comprimento de broto (CB) de minicepas *Eucalyptus benthamii* em relação a coleta de brotações. Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média \pm desvio padrão

O número de folhas por brotação (NF), bem como o número de nós por broto (NN) variaram significativamente em relação a coleta de brotações e clone e, também, em relação a coleta de brotações e solução nutritiva (Tabela 3).

O clone BP118 apresentou o maior número de folhas (Figura 5) e de nós por broto (Figura 6) em relação aos demais clones durante a 1ª, 4ª e 5ª coleta de brotações. Os clones BP101 e BP120 apresentaram valores semelhantes do número de folhas e número de nós por broto.

Com a redução dos valores da temperatura (máxima, média e mínima) a partir da 6ª coleta das brotações pode-se verificar redução do número de folhas por broto (Figura 5) e do número de nós por broto (Figura 6) para todos os clones. Esse efeito denota a influência da variação da temperatura (variação da sazonalidade) quanto a qualidade do broto emitido pelas minicepas de *Eucalyptus benthamii* ao longo do ano.

Em termos gerais, o número de folhas por broto para o clone BP101 apresentou variação de 5,8 a 8,7, o clone BP118 variou de 6,4 a 9,4 e o clone BP120 apresentou variação de 6,0 a 8,6 ao longo das coletas de brotações (Figura 5). Em relação ao número de nós por broto, o clone BP101 apresentou variação de 2,9 a 4,4, o clone BP118 apresentou variação de 3,2 a 4,7 e o clone BP120 apresentou variação de 3,0 a 4,3 ao longo das coletas de brotações (Figura 6).

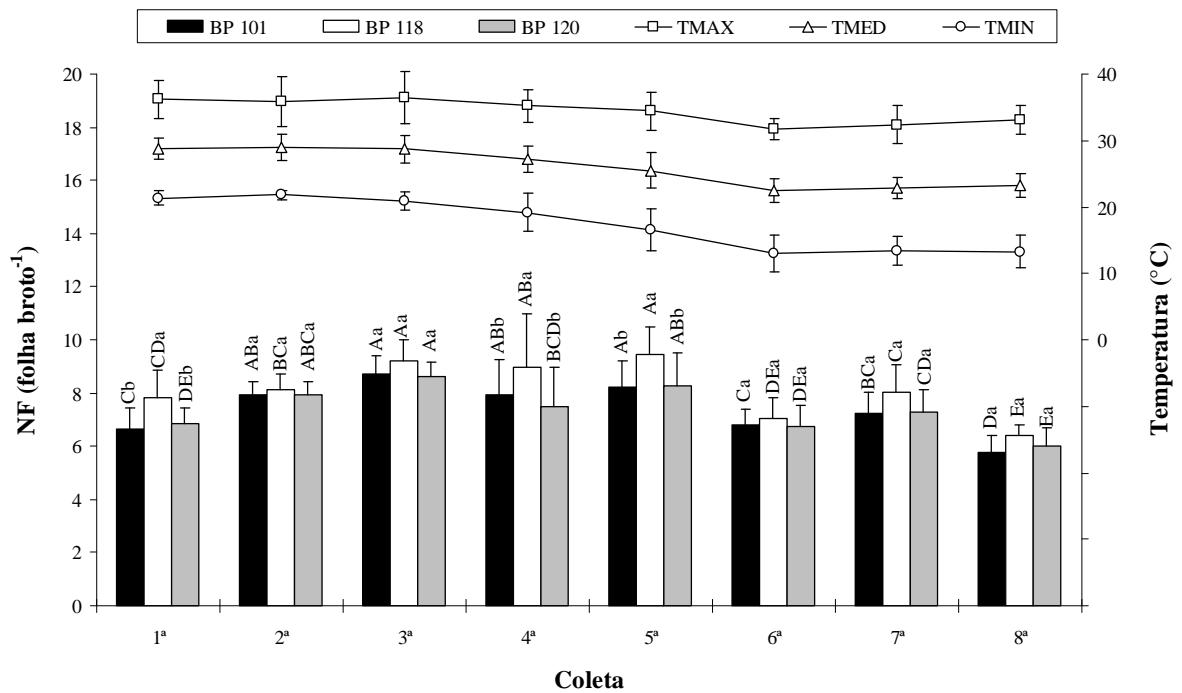


Figura 5 - Valores médios do número de folhas por broto (NF) de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e coleta de brotações. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para o mesmo clone entre as coletas de brotações e, médias seguidas por mesma letra minúscula para a mesma coleta de brotações entre os clones não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média \pm desvio padrão

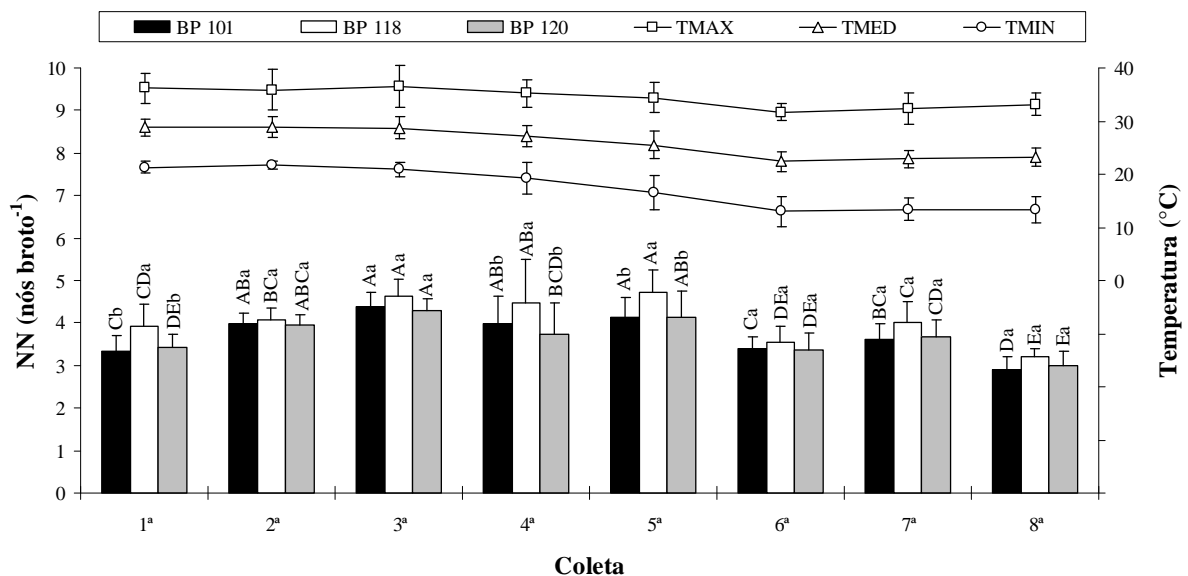


Figura 6 - Valores médios do número de nós por broto (NN) de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e coleta de brotações. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para o mesmo clone entre as coletas de brotações e, médias seguidas por mesma letra minúscula para a mesma coleta de brotações entre os clones não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média \pm desvio padrão

O número de folhas por broto (Figura 7) e o número de nós por broto (Figura 8) não variaram significativamente em relação a solução nutritiva ao considerar a mesma coleta de brotações. Porém, essas características de crescimento variaram significativamente ao longo das coletas de brotações (Figura 7 e Figura 8).

A partir da 6ª coleta de brotações houve redução significativa dos valores do NF e NN em relação as demais coletas efetuadas, sendo esse efeito associado com a redução da temperatura (máxima, média e mínima). Na 8ª coleta de brotações foi registrado os menores valores do número de folhas por broto (Figura 7) e do número de nós por broto (Figura 8).

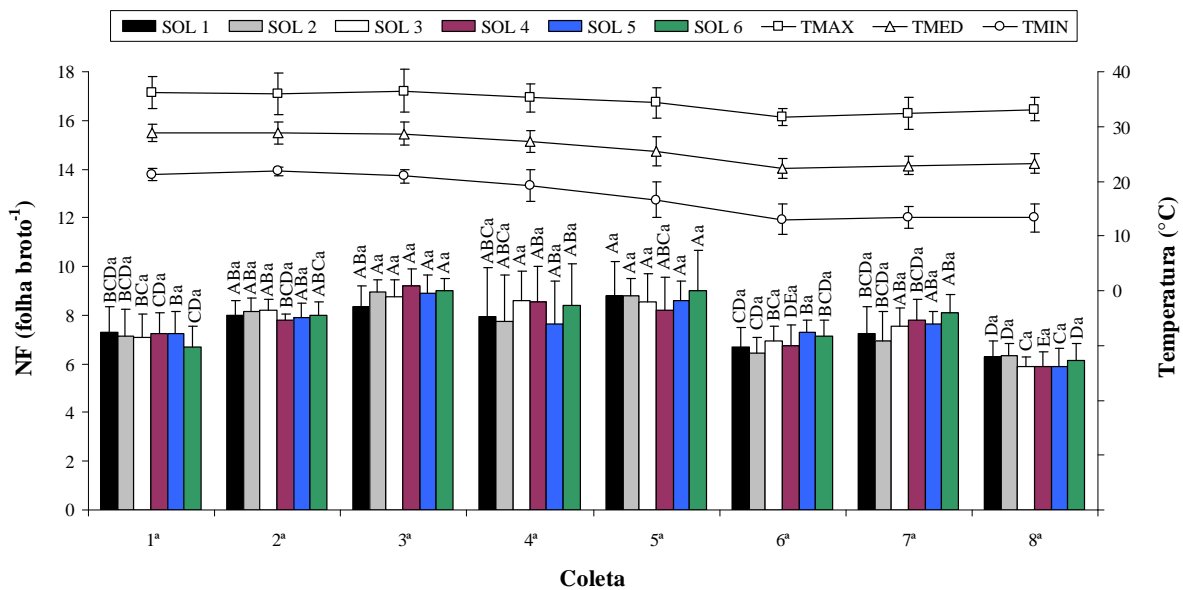


Figura 7 - Valores médios do número de folhas por broto (NF) de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação a coleta de brotações e solução nutritiva. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para a mesma solução nutritiva entre as coletas de brotações e, médias seguidas por mesma letra minúscula para a mesma coleta de brotações entre as soluções nutritivas não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média \pm desvio padrão

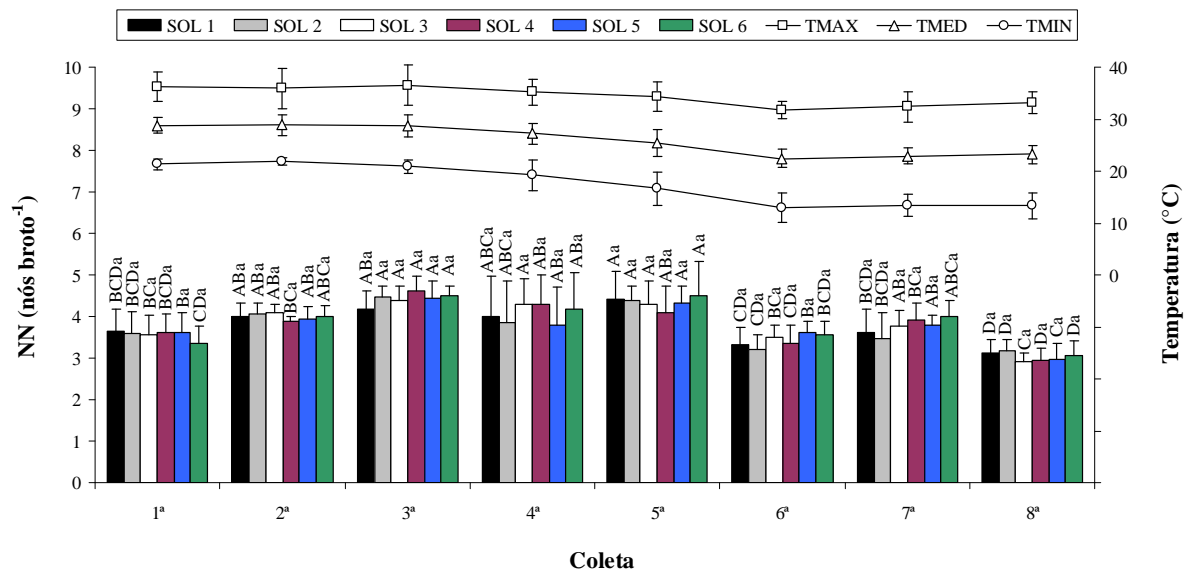


Figura 8 - Valores médios do número de nós por broto (NN) de minicepas *Eucalyptus benthamii* em relação a coleta de brotações e solução nutritiva. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para a mesma solução nutritiva entre as coletas de brotações e, médias seguidas por mesma letra minúscula para a mesma coleta de brotações entre as soluções nutritivas não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média \pm desvio padrão

O intervalo de entrenós (IN) variou significativamente apenas em relação a coleta das brotações e clone (Tabela 3).

De acordo com os dados mensurados pode-se observar que houve redução do IN até a 4ª coleta de brotações, independente do clone avaliado (Figura 9). Contudo, a partir da 5ª coleta de brotações houve aumento do IN, o que denota aumento do comprimento das brotações.

Em termos gerais, os clones BP101 (variação de 1,4 a 2,8 cm) e BP120 (variação de 1,4 a 2,8 cm) apresentaram os maiores valores do IN em relação ao clone BP118 (variação de 1,3 a 2,6 cm) para a maioria das coletas de brotações efetuadas durante o período experimental (Figura 9).

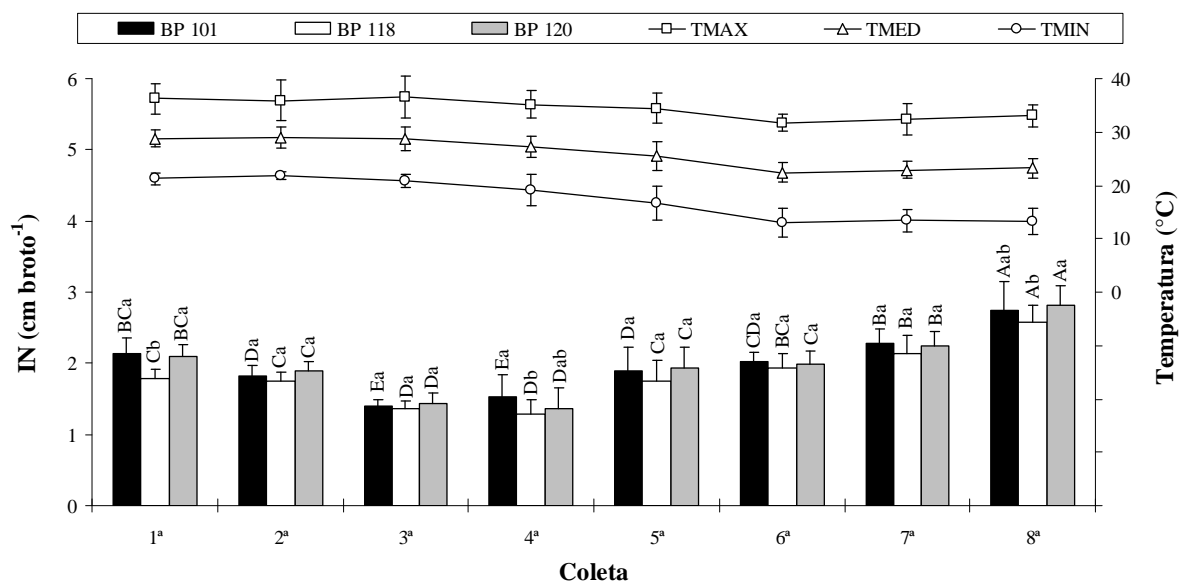


Figura 9 - Valores médios do intervalo de entrenós por broto (IN) de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e coleta de brotações. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para o mesmo clone entre as coletas de brotações e, médias seguidas por mesma letra minúscula para a mesma coleta de brotações entre os clones não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média \pm desvio padrão

O número de miniestacas por metro quadrado ao ano (NM) variou significativamente em relação a coleta de brotações e solução nutritiva e, também, em relação ao clone e solução nutritiva (Tabela 3).

Ao considerar a variação da produção de miniestacas por metro quadrado ao ano em relação ao clone e solução nutritiva, verifica-se que os clones BP101, BP118 e BP120 não apresentaram diferença significativa em relação as soluções S3, S4, S5 e S6, as quais corresponderam aos maiores valores médios (Figura 10). Contudo, ao considerar os clones BP101 e BP118, pode-se observar que somente as soluções S1 e S2 (menores valores médios) apresentaram diferença significativa do NM em relação a solução S6 (maior valor médio). O clone BP120 apresentou diferença significativa da produção de miniestacas por metro quadrado ao ano entre as soluções nutritivas S1 e S2 (menor valor médio) em relação a solução S5 (maior valor médio) (Figura 10).

Em termos gerais, a produção de miniestacas por metro quadrado ao ano para o clone BP101 variou de 7.936,83 (solução S1) a 10.052,74 (solução S6), o clone BP118 variou de 7.579,98 (solução S2) a 10.243,16 (solução S6) e o clone BP120 variou de 7.276,48 (solução S2) a 9.196,18 (solução S5) (Figura 10).

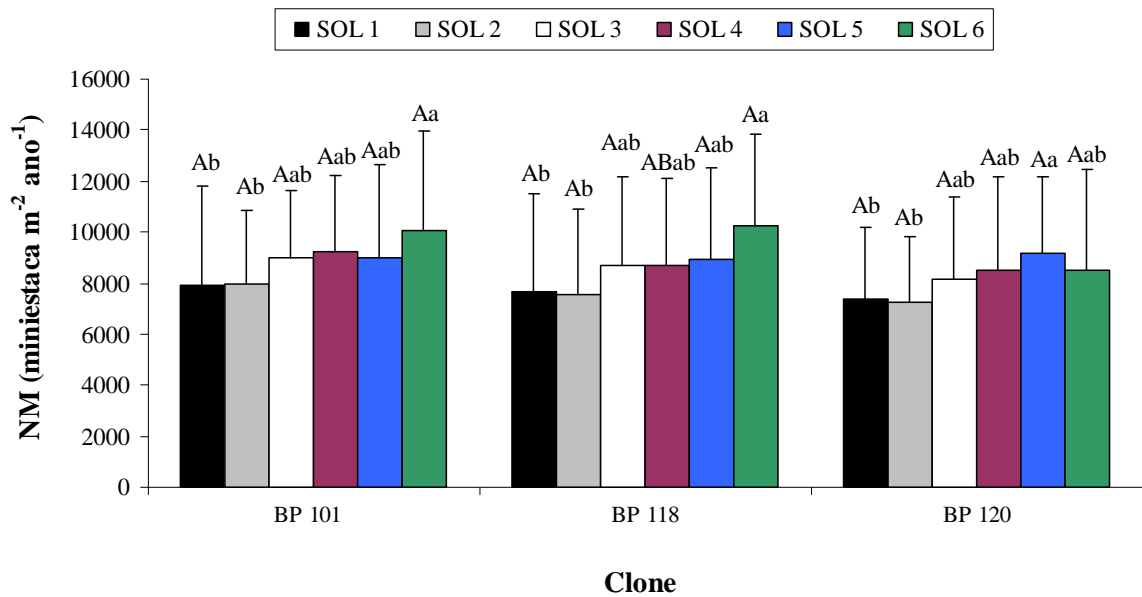


Figura 10 - Valores médios do número de miniestacas por metro quadrado ao ano (NM) de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e solução nutritiva na 8ª coleta de brotações. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para a mesma solução nutritiva entre os clones e, médias seguidas por mesma letra minúscula para o mesmo clone entre as soluções nutritivas não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média \pm desvio padrão

A menor produção de miniestacas por metro quadrado ao ano foi registrada na 1ª coleta de brotações das minicepas, não sendo observada diferença significativa entre as soluções nutritivas. Na 5ª coleta de brotações houve diferença significativa da produção de miniestacas por metro quadrado ao ano (NM) das minicepas que foram fertirrigadas com as soluções nutritivas S1 e S2 (ambas apresentando os menores valores médios) em relação a solução S6 (maior valor médio) (Figura 11).

Efeito semelhante ocorreu durante a 7ª coleta de brotações, onde o NM apresentou diferença significativa das soluções S1 e S2 (menor produção) em relação as soluções S3, S4, S5 e S6 (maior produção). Porém, na 8ª coleta de brotações não foi constatada diferença significativa do NM entre as soluções nutritivas, apesar de existir uma tendência dos maiores valores médios de produção corresponderem as soluções nutritivas S5 e S6 (Figura 11).

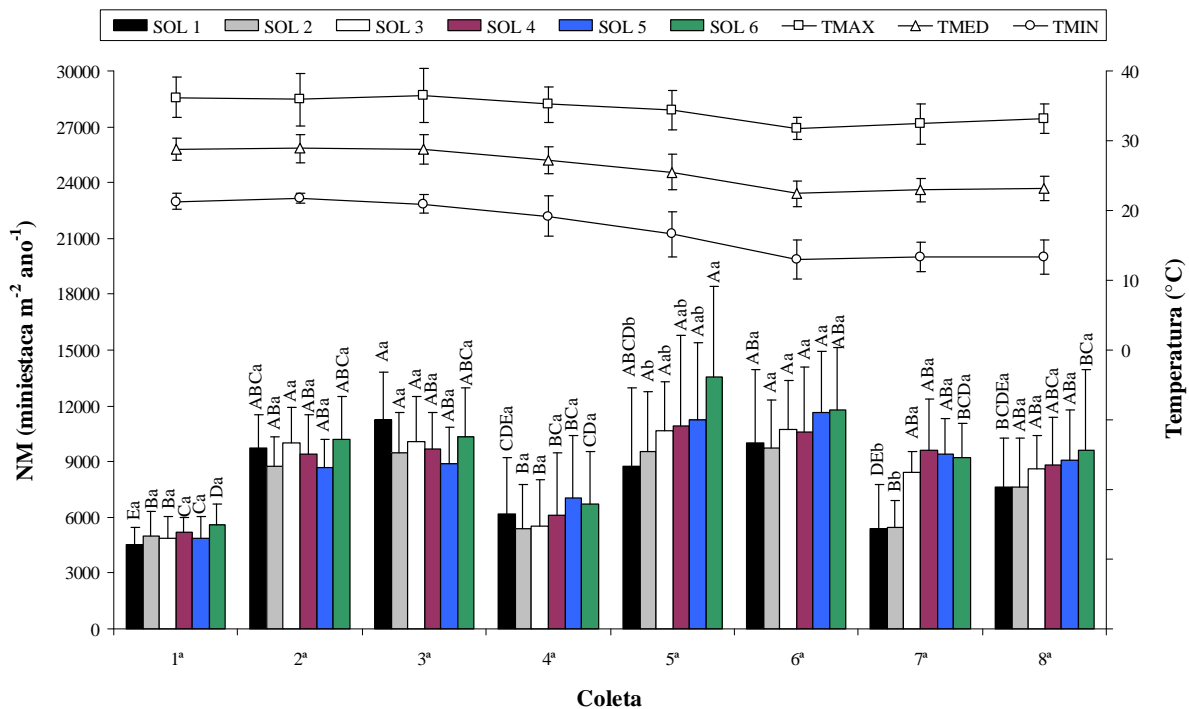


Figura 11 - Valores médios do número de miniestacas por metro quadrado ao ano (NM) de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação a coleta de brotações e solução nutritiva. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para a mesma solução nutritiva entre as coletas de brotações e, médias seguidas por mesma letra minúscula para a mesma coleta de brotações entre as soluções nutritivas não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média \pm desvio padrão

Pela análise da Matriz de Correlação de Pearson dos dados amostrados pode-se verificar que existiu correlação significativa das temperaturas do ar (máximas, médias e mínimas) para o comprimento de broto (correlação negativa), número de folhas (correlação positiva), número de nós (correlação positiva) e intervalo de entrenós (correlação negativa) (Tabela 4). A sobrevivência de minicepas e a produção de miniestacas por metro quadrado ao ano não apresentaram correlação significativa com os dados das temperaturas do ar da casa de vegetação que continha o minijardim clonal em vaso de *Eucalyptus benthamii* (Tabela 4).

A sobrevivência de minicepas também não apresentou correlação significativa com as demais variáveis biométricas mensuradas (número de miniestacas por metro quadrado ao ano, comprimento de broto, número de folhas, número de nós e intervalo de entrenós). Além disso, o número de miniestacas por metro quadrado ao ano apresentou correlação significativa com o número de folhas (correlação positiva) e número de nós (correlação positiva) (Tabela 4).

Em termos gerais, pode-se observar que as médias dos valores das temperaturas do ar máximas, médias e mínimas da casa de vegetação influenciaram significativamente as características de crescimento do CB, NF, NN e IN, denotando o forte efeito da variação da temperatura (condicionada pela sazonalidade) dentro da casa de vegetação em relação a

minietaquia de *Eucalyptus benthamii*, a qual influenciou a produção de miniestacas, principalmente em termos qualitativos ao longo do ano (Tabela 4).

Tabela 4 - Matriz Correlação de Pearson para a média das temperaturas do ar máximas (TMAX), temperaturas médias (TMED), temperaturas mínimas (TMIN), sobrevivência de minicepas (SOB), número de miniestacas por metro quadrado ao ano (NM), comprimento de broto (CB), número de folhas por broto (NF), número de nós por broto (NN) e intervalo de entrenós (IN) de minicepas de *Eucalyptus benthamii* ao longo de 316 dias de coletas sucessivas de brotações

Variável	TMAX	TMED	TMIN	SOB	NM	CB	NF	NN	IN
TMAX	1								
TMED	0,99**	1							
TMIN	0,97**	0,99**	1						
SOB	0,17 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,19 ^{ns}	1					
NM	-0,12 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	0,19 ^{ns}	1				
CB	-0,25*	-0,28*	-0,30*	-0,07 ^{ns}	0,17 ^{ns}	1			
NF	0,36**	0,37**	0,36**	0,14 ^{ns}	0,21*	0,30*	1		
NN	0,36**	0,37**	0,37**	0,14 ^{ns}	0,21*	0,30*	0,99**	1	
IN	-0,49**	-0,54**	-0,55**	-0,18 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,70**	-0,42**	-0,42**	1

^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. * e ** Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F

Em relação ao sintoma de deficiência nutricional, verificou-se intensa clorose com a presença de nervuras salientes (Figura 12 A-D e H-J), deformação e redução do tamanho das folhas, mortalidade da ponteira seguido de superbrotamento (Figura 12 C-D), necrose localizada no centro da folha (Figura 12 E), estiolamento das brotações (Figura 12 F) e engrossamento da base da brotação (Figura 12 G). Esses sintomas foram verificados nas minicepas submetidas as soluções S1 (omissão de Zn e B) e S2 (omissão de B) (Figura 12 A-J) a partir da 5ª coleta de brotações.

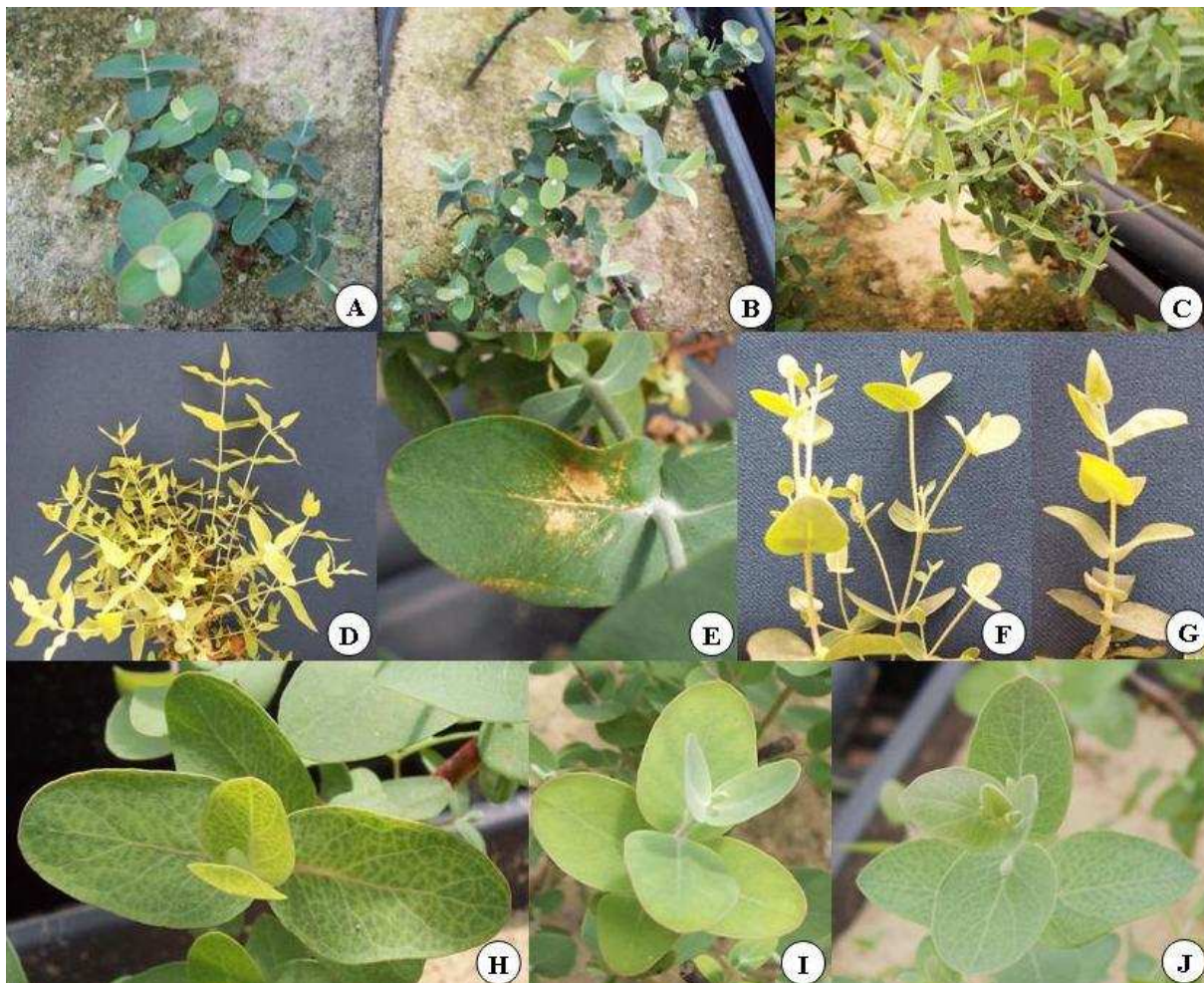


Figura 12 - Sintomas foliares de deficiência nutricional de B e/ou Zn em minicepas de *Eucalyptus benthamii* cultivadas em sistema de minijardim clonal em vasos contendo areia. (A e B) clorose nas folhas mais jovens e redução do tamanho das folhas, solução S1 (omissão de B e Zn); (C e D) clorose nas folhas mais jovens com deformação e redução do tamanho das folhas, evidenciando superbrotamento, solução S1 (omissão de Zn e B) e S2 (omissão de B); (E) detalhe do sintoma foliar típico da deficiência de B, solução S1 (omissão de Zn e B) e S2 (omissão de B); (F) detalhe do estiolamento das brotações, solução S1 (omissão de Zn e B); (G) detalhe do engrossamento da base da brotação, solução S1 (omissão de Zn e B) e S2 (omissão de B); (H) detalhe da clorose na solução S1 (omissão de Zn e B); (I e J) detalhe da clorose na solução S2 (omissão de B)

2.3.2 Teor foliar de nutrientes

De acordo com a análise de variância houve interação entre a coleta de brotações e solução nutritiva para os teores foliares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) em brotações de minicepas de *Eucalyptus benthamii* conduzidas em sistema de vaso com areia, ou seja, o teor foliar de macronutrientes variou ao longo das sucessivas coletas de brotações (Tabela 5).

Tabela 5 - Resumo da análise de variância para o teor foliar de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) em brotações de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação aos tratamentos avaliados ao longo de 316 dias de coletas sucessivas de brotações

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios					
		N (g kg ⁻¹)	P (g kg ⁻¹)	K (g kg ⁻¹)	Ca (g kg ⁻¹)	Mg (g kg ⁻¹)	S (g kg ⁻¹)
Coleta (COL)	7	428,23**	5,1991**	358,85**	30,482**	1,0741**	5,5915**
Resíduo-COL	16	5,92**	0,0615**	1,11**	0,235**	0,0337**	0,0500 ^{ns}
Parcela	23	–	–	–	–	–	–
Solução (SOL)	5	4,06*	0,0069 ^{ns}	0,53 ^{ns}	0,270**	0,0339**	0,1616**
COL*SOL	35	4,05**	0,0734**	1,57**	0,259**	0,0158**	0,0634**
Resíduo	80	1,64	0,0190	0,24	0,068	0,0055	0,0312
Subparcela	143	–	–	–	–	–	–
Média	–	26,10	2,50	12,39	5,03	1,97	2,12
CV _{exp.} (%)	–	4,92	5,51	3,97	5,19	3,77	8,30

^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. * e ** Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental

O teor foliar de N aumentou até a 6^a e 7^a coletas de brotações, sendo que ocorreu redução do teor foliar na 8^a coleta. A única diferença significativa do teor foliar de N das minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação a solução nutritiva ocorreu na 8^a coleta, sendo registrada diferença significativa entre a solução S2 (27,8 g kg⁻¹) e S6 (22,2 g kg⁻¹). O teor foliar de N variou de 34,0 a 17,6 g kg⁻¹ ao longo das oito coletas de brotações (Tabela 6).

Na 1^a, 2^a, 4^a e 8^a coletas de brotações foi registrado os menores valores do teor foliar de P, independente da solução nutritiva. Os maiores teores foliares de P ocorreram na 3^a, 5^a, 6^a e 7^a coletas de brotações. A maior variação do teor foliar de P em relação a solução nutritiva ocorreu na 5^a e 7^a coletas de brotações. Em termos gerais, o teor foliar de P variou de 3,4 a 1,8 g kg⁻¹ ao longo das oito coletas de brotações (Tabela 6).

O teor foliar de K aumentou até a 8^a coleta de brotações. Os menores valores foram registrados na 1^a, 2^a, 3^a e 4^a coletas de brotações. Na 8^a coleta, a solução nutritiva S1 apresentou o menor teor foliar em relação as soluções nutritivas S3, S4, S5 e S6. O teor foliar de K variou de 22,1 a 7,1 g kg⁻¹ ao longo das oito coletas de brotações (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores médios dos teores foliares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) em brotações de minicepas de *Eucalyptus benthamii*

Solução	Coleta							
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a
N (g kg ⁻¹)								
S1	18,7±0,3 Ad	23,1±1,6 Ac	26,4±1,1 Abc	24,3±1,0 Ac	29,3±1,0 Aab	31,3±1,9 Aa	32,3±0,6 Aa	26,4±2,0 ABbc
S2	17,9±0,6 Ac	20,5±1,7 Ac	26,9±0,1 Ab	25,1±2,0 Ab	27,4±1,6 Ab	32,1±0,9 Aa	34,0±0,5 Aa	27,8±1,7 Ab
S3	18,6±0,2 Ad	21,8±1,5 Acd	25,6±1,4 Abc	25,5±0,9 Abc	28,9±1,7 Aab	32,7±1,4 Aa	32,5±1,4 Aa	25,5±0,3 ABbc
S4	17,6±0,4 Ae	21,1±2,8 Ade	24,8±0,2 Acd	23,6±1,6 Acd	30,6±3,3 Aab	30,2±2,9 Aab	32,0±0,2 Aa	26,4±0,7 ABbc
S5	18,1±0,6 Ae	21,5±2,3 Ade	24,3±1,3 Acd	23,9±0,9 Acd	27,7±0,4 Abc	31,4±0,9 Aab	33,3±0,7 Aa	25,5±0,6 ABcd
S6	17,6±0,7 Ac	23,2±4,1 Ab	24,2±0,8 Ab	24,2±1,7 Ab	29,7±0,6 Aa	33,2±1,8 Aa	30,5±2,0 Aa	22,2±0,4 Bb
P (g kg ⁻¹)								
S1	2,1±0,1 Ab	2,1±0,2 Ab	2,8±0,2 Aa	1,8±0,2 Ab	2,8±0,1 Ba	3,1±0,2 Aa	3,0±0,1 ABa	2,1±0,1 Ab
S2	2,0±0,1 Ac	2,0±0,1 Ac	2,9±0,1 Aab	1,9±0,1 Ac	2,7±0,4 Bb	3,3±0,1 Aa	3,3±0,1 Aa	1,9±0,1 Ac
S3	2,1±0,1 Ab	2,0±0,1 Ab	2,8±0,1 Aa	2,0±0,2 Ab	3,0±0,1 ABa	3,1±0,1 Aa	2,7±0,1 Ba	2,0±0,1 Ab
S4	2,1±0,1 Ac	2,0±0,2 Ac	2,7±0,1 Ab	1,8±0,1 Ac	3,3±0,2 Aa	3,1±0,2 Aab	2,7±0,1 Bb	2,1±0,1 Ac
S5	2,1±0,1 Ac	2,0±0,1 Ac	2,8±0,2 Aab	1,9±0,2 Ac	3,1±0,3 ABa	3,1±0,1 Aa	2,6±0,1 Bb	2,0±0,1 Ac
S6	2,1±0,1 Ac	1,9±0,2 Ac	2,6±0,1 Ab	1,9±0,1 Ac	3,2±0,1 ABa	3,4±0,1 Aa	3,0±0,2 ABab	1,8±0,1 Ac
K (g kg ⁻¹)								
S1	9,1±0,1 Ad	8,7±0,9 Ad	9,8±0,4 Ad	8,4±0,4 Ad	12,6±0,6 ABC	14,1±0,4 ABc	16,0±0,6 Ab	18,3±0,7 Ca
S2	9,9±0,2 Ad	7,9±0,1 Af	9,8±0,4 Ade	8,2±0,3 Aef	11,6±0,5 Bc	14,8±0,7 ABb	16,4±0,8 Ab	19,7±0,4 BCa
S3	8,9±0,1 Ae	8,1±0,4 Ae	9,7±0,5 Ae	8,8±0,4 Ae	11,9±0,7 Bd	14,0±0,6 Bc	16,0±0,6 Ab	21,4±0,3 ABa
S4	9,5±0,3 Ad	7,3±0,2 Ae	9,4±0,2 Ad	8,3±0,5 Ade	12,4±0,3 ABC	14,0±0,8 Bc	16,2±1,5 Ab	22,1±1,0 Aa
S5	9,4±0,3 Ad	7,1±0,2 Ae	10,0±0,5 Ad	8,6±0,2 Ade	13,6±0,3 Ac	14,6±0,2 ABbc	15,9±0,4 Ab	21,2±1,4 ABa
S6	8,6±0,4 Ade	7,1±0,2 Ae	9,7±0,2 Ad	8,3±0,5 Ade	13,8±1,1 Ac	15,7±0,4 Ab	16,0±1,3 Ab	20,7±0,5 ABa
Ca (g kg ⁻¹)								
S1	6,3±0,1 Aa	4,2±0,3 Ab	6,9±0,2 Aa	3,1±0,2 Ac	4,5±0,7 Ab	4,1±0,2 Ab	4,6±0,4 Ab	6,7±0,3 Aa
S2	6,4±0,2 Aa	3,9±0,1 Abc	6,5±0,6 ABa	3,1±0,2 Ac	4,3±0,2 Ab	3,7±0,1 Abc	4,5±0,1 Ab	6,7±0,2 Aa
S3	6,6±0,2 Aa	4,2±0,1 Ac	6,8±0,3 ABa	3,3±0,2 Ad	4,4±0,2 Ac	3,9±0,2 Acd	5,4±0,6 Ab	6,5±0,5 ABa
S4	6,5±0,2 Aa	3,7±0,1 Acd	6,4±0,5 ABa	3,3±0,1 Ad	4,5±0,1 Abc	4,2±0,4 Ac	5,3±0,5 Ab	6,7±0,1 Aa
S5	6,8±0,1 Aa	4,0±0,1 Ade	6,3±0,1 ABab	3,2±0,1 Ae	4,4±0,1 Ad	4,1±0,1 Ad	5,4±0,4 Ac	5,8±0,1 Bbc
S6	6,1±0,2 Aa	3,6±0,2 Ade	6,0±0,3 Ba	3,0±0,1 Ae	4,8±0,3 Abc	4,3±0,2 Acd	5,3±0,2 Aab	5,8±0,2 Ba
Mg (g kg ⁻¹)								
S1	2,2±0,1 Aa	2,2±0,2 Aa	2,2±0,1 Aa	1,7±0,1 Abc	1,8±0,1 Ab	1,5±0,1 Ac	1,7±0,1 BCbc	2,1±0,1 Aa
S2	2,2±0,1 Aa	1,9±0,1 Abc	2,2±0,2 Aa	1,7±0,2 Acd	1,7±0,1 Acd	1,5±0,1 Ad	1,6±0,1 Cd	2,2±0,1 Aa
S3	2,2±0,1 Aab	2,0±0,1 Abc	2,2±0,1 Aab	1,9±0,1 Acd	1,7±0,1 Ade	1,6±0,1 Ae	1,8±0,2 ABcd	2,3±0,1 Aa
S4	2,2±0,1 Aa	1,9±0,1 Ab	2,2±0,1 Aa	1,9±0,1 Ab	1,8±0,2 Abc	1,7±0,1 Abc	1,8±0,1 ABbc	2,3±0,2 Aa
S5	2,2±0,1 Aa	2,0±0,1 Aab	2,2±0,1 Aa	1,8±0,1 Abc	1,7±0,1 Acd	1,6±0,1 Ad	1,8±0,1 ABbc	2,1±0,1 Aa
S6	2,2±0,1 Aa	2,0±0,1 Aab	2,2±0,1 Aa	1,8±0,1 Abc	1,8±0,1 Abc	1,7±0,1 Ac	2,0±0,2 Aab	2,2±0,1 Aa
S (g kg ⁻¹)								
S1	2,9±0,1 Aab	3,2±0,1 Aa	2,5±0,3 Abc	1,3±0,1 Ae	2,0±0,2 Acd	1,8±0,1 Ade	1,5±0,2 Ade	1,8±0,3 Ade
S2	2,6±0,1 ABab	3,0±0,2 Aa	2,7±0,1 Aa	1,3±0,1 Ad	1,9±0,3 Acd	2,1±0,2 Abc	1,6±0,1 Acd	1,7±0,1 Acd
S3	2,8±0,1 ABa	2,9±0,2 Aa	2,6±0,2 Aab	1,4±0,1 Ad	2,1±0,3 Abc	1,8±0,1 Acd	1,5±0,1 Ad	1,8±0,3 Acd
S4	2,6±0,1 ABab	2,8±0,1 Aa	2,5±0,1 Aab	1,5±0,1 Ac	2,1±0,1 Abc	2,0±0,1 Abc	1,5±0,1 Ac	2,0±0,3 Abc
S5	2,9±0,1 Aab	3,1±0,1 Aa	2,4±0,1 Abc	1,5±0,1 Ad	2,3±0,2 Ac	1,9±0,2 Acd	1,5±0,1 Ad	1,6±0,1 Ad
S6	2,3±0,2 Bab	2,7±0,1 Aa	2,3±0,1 Aab	1,3±0,1 Ad	1,9±0,1 Abc	1,9±0,3 Abc	1,5±0,1 Acd	1,6±0,2 Acd

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e, nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média ± desvio padrão

O teor foliar de Ca apresentou oscilações ao longo das coletas de brotações. Na 1^a, 3^a e 8^a coletas de brotações o teor foliar de Ca apresentou os maiores valores em relação as demais coletas efetuadas. Em termos gerais, o teor foliar de Ca variou de 6,9 a 3,0 g kg⁻¹ ao longo das oito coletas de brotações (Tabela 6).

Quanto ao teor foliar de Mg foi observada pouca variação ao longo das oito coletas de brotações das minicepas de *Eucalyptus benthamii*. Em termos gerais, os menores valores do

teor foliar ocorreram nas soluções S1 e S2. O teor foliar de Mg variou de 2,3 a 1,5 g kg⁻¹ ao longo das oito coletas de brotações (Tabela 6).

O teor foliar de S foi maior na 1^a, 2^a e 3^a coleta de brotações, sendo registrada redução a partir da 4^a coleta de brotações. O teor foliar de S variou de 3,2 a 1,5 g kg⁻¹ ao longo das oito coletas de brotações (Tabela 6).

De acordo com dados levantados na literatura em relação ao teor foliar de macro e micronutrientes de minicepas conduzidas em sistema de micro e minijardim clonal de *Eucalyptus*, pode-se verificar a variação dos teores foliares considerados como alto, adequado, baixo e deficiente (Tabela 7).

Tabela 7 - Intervalo dos teores de macro e micronutrientes considerados alto, adequado, baixo e deficiente para brotações de *Eucalyptus* com idade de 7 a 14 dias, em condição de micro e minijardim clonal

Nutriente	Alto ⁽¹⁾	Adequado ⁽¹⁾	Baixo ⁽¹⁾	Deficiente ⁽¹⁾
	Macronutriente			
----- (g kg ⁻¹) -----				
N	$\partial > 40,0$	$28,0 < \partial \leq 40,0$	$20,0 \leq \partial \leq 28,0$	$\partial < 20,0$
P	$\partial > 4,0$	$2,5 < \partial \leq 4,0$	$1,5 \leq \partial \leq 2,5$	$\partial < 1,5$
K	$\partial > 30,0$	$15,0 < \partial \leq 30,0$	$10,0 \leq \partial \leq 15,0$	$\partial < 10,0$
Ca	$\partial > 7,0$	$5,0 < \partial \leq 7,0$	$3,0 \leq \partial \leq 5,0$	$\partial < 3,0$
Mg	$\partial > 4,0$	$2,0 < \partial \leq 4,0$	$1,0 \leq \partial \leq 2,0$	$\partial < 1,0$
S	$\partial > 2,5$	$2,0 < \partial \leq 2,5$	$1,3 \leq \partial \leq 2,0$	$\partial < 1,3$
Nutriente	Micronutriente			
	----- (mg kg ⁻¹) -----			
B	$\partial > 70,0$	$35,0 < \partial \leq 70,0$	$20,0 \leq \partial \leq 35,0$	$\partial < 20,0$
Cu	$\partial > 15,0$	$8,0 < \partial \leq 15,0$	$5,0 \leq \partial \leq 8,0$	$\partial < 5,0$
Fe	$\partial > 220,0$	$100,0 < \partial \leq 220,0$	$75,0 \leq \partial \leq 100,0$	$\partial < 75,0$
Mn	$\partial > 700,0$	$250,0 < \partial \leq 700,0$	$150,0 \leq \partial \leq 250,0$	$\partial < 150,0$
Zn	$\partial > 80,0$	$30,0 < \partial \leq 80,0$	$20,0 \leq \partial \leq 30,0$	$\partial < 20,0$

⁽¹⁾ Adaptado de Alfenas et al. (2004), Higashi; Silveira e Gonçalves (2005), Cunha et al. (2009b) e Cunha et al. (2009c). ∂ = valor médio do nutriente considerado

Baseado na interpretação da Tabela 7 e na variação significativa dos teores foliares dos macronutrientes em minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação as soluções nutritivas e coleta de brotações ao longo do tempo (Tabela 5) verifica-se que apenas 12,5% dos teores foliares de N foram considerados como deficientes (apenas na 1^a coleta de brotações) ao longo das oito coletas de brotações (Tabela 8). O restante dos teores foliares de N foram classificados como adequados e baixos para todas as soluções nutritivas avaliadas (Tabela 8), contudo sem comprometer o crescimento e desenvolvimento das minicepas (Tabela 1).

Quanto ao P, Ca e Mg, não foi observado teores considerados altos e deficientes, sendo que os teores foliares ficaram compreendidos entre adequados e baixos, porém não

comprometendo o crescimento das minicepas. O S não apresentou deficiência, sendo que os valores ficaram compreendidos entre alto, adequado e baixo (Tabela 8).

Tabela 8 - Porcentagem de frequência dos teores foliares para os macronutrientes considerados alto, adequado, baixo e deficiente de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação a solução nutritiva em oito coletas de brotações

Solução	Alto	Adequado	Baixo	Deficiente
	N ----- (%) -----			
S1	0,0	37,5	50,0	12,5
S2	0,0	25,0	62,5	12,5
S3	0,0	37,5	50,0	12,5
S4	0,0	37,5	50,0	12,5
S5	0,0	25,0	62,5	12,5
S6	0,0	37,5	50,0	12,5
Solução	P ----- (%) -----			
	S1	0,0	50,0	50,0
S2	0,0	50,0	50,0	0,0
S3	0,0	50,0	50,0	0,0
S4	0,0	50,0	50,0	0,0
S5	0,0	50,0	50,0	0,0
S6	0,0	50,0	50,0	0,0
Solução	K ----- (%) -----			
	S1	0,0	25,0	25,0
S2	0,0	25,0	25,0	50,0
S3	0,0	25,0	25,0	50,0
S4	0,0	25,0	25,0	50,0
S5	0,0	25,0	37,5	37,5
S6	0,0	37,5	12,5	50,0
Solução	Ca ----- (%) -----			
	S1	0,0	37,5	62,5
S2	0,0	37,5	62,5	0,0
S3	0,0	50,0	50,0	0,0
S4	0,0	50,0	50,0	0,0
S5	0,0	50,0	50,0	0,0
S6	0,0	50,0	50,0	0,0
Solução	Mg ----- (%) -----			
	S1	0,0	50,0	50,0
S2	0,0	37,5	62,5	0,0
S3	0,0	37,5	62,5	0,0
S4	0,0	37,5	62,5	0,0
S5	0,0	37,5	62,5	0,0
S6	0,0	37,5	62,5	0,0
Solução	S ----- (%) -----			
	S1	25,0	12,5	62,5
S2	37,5	12,5	50,0	0,0
S3	37,5	12,5	50,0	0,0
S4	25,0	25,0	50,0	0,0
S5	25,0	25,0	50,0	0,0
S6	12,5	25,0	62,5	0,0

Cerca de 50% dos teores foliares de K foram considerados como baixos da 1^a até a 4^a coleta de brotações, sendo um problema a ser considerado em termos de reposição via solução nutritiva nas épocas mais quentes do ano. O restante dos valores dos teores foliares, cerca de

50%, ficou compreendido entre adequado e baixo (5ª a 8ª coleta de brotações), variando de acordo com a coleta de brotações ao longo do tempo (Tabela 8).

De acordo com a análise de variância houve interação entre a coleta de brotações e solução nutritiva para os teores foliares de boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) em brotações de minicepas de *Eucalyptus benthamii* conduzidas em sistema de vaso com areia, ou seja, o teor foliar de micronutrientes variou ao longo das sucessivas coletas de brotações (Tabela 9).

Tabela 9 - Resumo da análise de variância para o teor foliar de boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) em brotações de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação aos tratamentos avaliados ao longo de 316 dias de coletas sucessivas de brotações

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios				
		B ⁽¹⁾ (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Fe (mg kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)	Zn ⁽¹⁾ (mg kg ⁻¹)
Coleta (COL)	7	1,2666**	17,8984**	81.925,61**	3.068.380,9**	0,4829**
Resíduo-COL	16	0,0077 ^{ns}	3,3563**	243,86 ^{ns}	20.487,9**	0,0231**
Parcela	23	–	–	–	–	–
Solução (SOL)	5	13,4109**	3,1654**	1.409,46**	106.896,7**	0,0272**
COL*SOL	35	0,5966**	1,5334**	630,27**	17.298,7**	0,0213**
Resíduo	80	0,0174	0,4493	231,11	3.909,6	0,0036
Subparcela	143	–	–	–	–	–
Média	–	38,32	7,96	124,11	912,65	40,37
CV _{exp.} (%)	–	8,85	8,41	12,24	6,85	6,36

^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ** Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F. ⁽¹⁾ Dados transformados por $\ln(n+0,5)$, onde n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental

O teor foliar de B apresentou variação ao longo das coletas de brotações, sendo que os menores acúmulos foram registrados nas soluções S1 e S2, as quais não continham B na sua composição (Tabela 10). O teor foliar de B aumentou com o aumento da concentração na composição da solução nutritiva, sendo que a solução S6 apresentou o maior acúmulo em relação as demais soluções nutritivas para a maioria das coletas de brotações. O teor foliar de B variou de 108,0 a 3,0 mg kg⁻¹ ao longo das oito coletas de brotações (Tabela 10), sendo constatados sintomas de deficiência nutricional.

O teor foliar de Cu das brotações de minicepas de *Eucalyptus benthamii* apresentou variação ao longo das coletas efetuadas. Os menores valores do teor foliar de Cu ocorreram na 4ª e 5ª coleta de brotações. O teor foliar de Cu variou de 10,3 a 5,2 mg kg⁻¹ ao longo das oito coletas de brotações (Tabela 10).

O teor foliar de Fe apresentou aumento até a 8ª coleta de brotações, sendo que os maiores valores foram registrados na 7ª e 8ª coletas de brotações. O teor foliar de Fe variou de

296,0 a 54,7 mg kg⁻¹ ao longo das oito coletas de brotações (Tabela 10). O teor foliar de Mn apresentou redução até a 8ª coleta de brotações. Os maiores acúmulos foram registrados na 1ª, 2ª e 3ª coleta de brotações. O teor foliar de Mn variou de 1.783,3 a 462,3 mg kg⁻¹ ao longo das oito coletas de brotações (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores médios do teor foliar de boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) em brotações de minicepas de *Eucalyptus benthamii*

Solução	Coleta							
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª
B								
----- (mg kg ⁻¹) -----								
S1	31,6±2,3 BCa	26,0±1,7 Dab	23,0±1,0 Cab	16,9±0,8 Dbc	5,0±1,7 Dd	9,0±1,7 Ccd	3,6±1,1 Cd	7,6±1,1 Ccd
S2	28,3±1,1 Ca	27,0±2,0 Da	25,3±2,8 Cab	14,2±2,0 Dbc	4,6±2,5 Dc	8,0±0,1 Cc	3,0±0,1 Cc	7,6±1,1 Cc
S3	36,6±2,8 ABCbc	43,6±2,8 BCab	45,6±1,5 Bab	41,6±3,4 BCab	34,3±1,1 Cbc	42,6±4,0 Bab	47,6±2,3 Ba	29,0±1,0 Bc
S4	36,0±3,6 ABCab	41,3±1,1 Ca	42,6±3,0 Ba	37,5±2,0 BCab	33,6±2,3 Cab	40,6±2,3 Ba	44,0±1,7 Ba	27,3±2,0 Bb
S5	40,0±0,1 ABbc	55,0±3,0 Ba	51,6±3,0 Ba	52,2±0,1 Ba	54,0±5,5 Ba	47,6±5,0 Bab	55,0±4,5 Ba	35,6±3,5 Bc
S6	47,0±5,5 Ad	72,3±2,0 Ac	67,0±5,1 Ac	68,3±5,9 Ac	68,0±0,1 Ac	90,6±8,2 Ab	108,0±8,6 Aa	61,3±2,0 Ac
Cu								
----- (mg kg ⁻¹) -----								
S1	8,5±0,2 Aabc	10,3±1,5 Aa	9,1±0,5 Aab	6,8±0,3 Ac	7,3±1,0 Abc	7,0±0,7 Abc	10,0±1,6 Aa	9,2±0,6 Aab
S2	7,1±0,4 ABab	9,3±0,5 ABa	8,1±0,9 Aab	6,7±0,5 Ab	6,7±0,7 Ab	6,3±0,1 Ab	9,1±1,2 Aa	8,5±0,3 Aab
S3	8,4±2,0 Aa	8,6±0,5 ABa	8,2±0,3 Aa	7,5±0,6 Aa	7,6±0,5 Aa	7,3±1,0 Aa	9,4±1,0 Aa	8,6±0,1 Aa
S4	7,1±2,3 ABb	7,6±1,1 Bab	8,2±0,4 Aab	6,7±0,7 Ab	7,2±0,9 Ab	7,4±1,7 Aab	8,7±1,4 Aab	9,4±0,4 Aa
S5	5,6±0,2 Bc	7,6±0,5 Babc	8,7±0,7 Aab	7,0±0,7 Abc	6,5±0,3 Abc	7,8±1,0 Aabc	9,5±1,3 Aa	9,7±0,7 Aa
S6	5,2±0,4 Bc	7,3±0,5 Babc	7,8±0,3 Aab	6,9±0,5 Abc	6,4±0,3 Abc	8,4±1,7 Aab	9,2±1,6 Aa	9,2±0,7 Aa
Fe								
----- (mg kg ⁻¹) -----								
S1	61,4±1,9 Ad	61,6±1,5 Ad	105,7±6,1 Acd	113,7±20,6 Ac	91,3±4,7 Acd	101,1±4,3 Acd	168,2±11,0 Bb	219,0±15,6 Ca
S2	61,3±4,8 Ac	61,3±3,2 Ac	100,3±5,8 Abc	106,5±12,4 Abc	94,8±3,4 Ac	98,6±7,0 Ac	150,5±14,9 Bb	247,6±32,2 ABCa
S3	64,3±4,8 Ac	62,3±3,2 Ac	103,5±9,2 Abc	100,3±5,7 Abc	106,8±10,2 Abc	117,9±13,2 Ab	191,6±12,1 ABa	236,3±13,9 BCa
S4	56,9±2,8 Ac	65,6±4,9 Ac	93,4±3,0 Ac	101,8±7,0 Ac	102,6±8,7 Ac	107,5±6,0 Ac	196,3±5,4 ABb	296,0±6,0 Aa
S5	62,4±7,0 Ac	63,3±1,1 Ac	121,8±15,4 Ab	103,5±2,8 Abc	99,9±3,6 Abc	118,3±7,2 Ab	219,4±19,1 Aa	267,2±33,9 ABCa
S6	54,7±2,0 Ae	60,6±3,5 Ade	104,4±11,4 Acde	97,6±3,0 Acde	110,0±8,6 Acd	121,0±4,4 Ac	224,8±6,2 Ab	281,1±26,7 ABa
Mn								
----- (mg kg ⁻¹) -----								
S1	1675,0±72,5 Aa	1783,3±123,9 Aa	1351,6±26,3 Ab	648,1±88,4 Ac	576,0±21,1 Ad	663,3±100,2 Acd	819,3±116,3 Ac	699,6±12,0 Acd
S2	1540,0±11,3 ABa	1608,3±45,3 ABa	1211,3±127,4 ABb	613,6±68,6 Acd	462,3±42,6 Ad	541,6±60,9 Ad	788,3±128,0 Ac	753,0±11,7 Ac
S3	1471,6±11,7 ABa	1375,0±65,3 CDa	1053,6±91,3 BCb	644,0±96,5 Ac	590,6±132,2 Ac	624,6±108,8 Ac	703,3±72,5 Ac	632,0±19,1 Ac
S4	1461,6±56,0 Ba	1236,6±10,4 Db	941,3±68,4 Cc	511,8±20,4 Ad	524,6±36,7 Ad	567,3±28,1 Ad	698,0±29,3 Ad	707,6±1,1 Ad
S5	1522,3±99,6 ABa	1486,6±143,6 BCa	1152,6±226,3 ABb	571,9±85,1 Acd	506,6±62,0 Ad	616,6±43,6 Acd	780,3±75,5 Ac	658,0±6,0 Acd
S6	1577,6±171,9 ABa	1403,3±80,2 BCDA	1047,6±13,6 BCb	564,1±31,5 Ac	516,0±81,6 Ac	585,3±48,8 Ac	700,0±78,7 Ac	639,6±10,1 Ac
Zn								
----- (mg kg ⁻¹) -----								
S1	37,0±2,6 ABb	40,3±6,6 Ab	38,6±3,0 Ab	35,5±2,8 Ab	36,3±2,0 Ab	37,3±2,3 Ab	37,0±2,0 Cb	53,3±3,7 Ba
S2	30,3±1,1 Bc	34,0±2,6 ABbc	35,3±2,5 Abc	37,4±3,3 Abc	37,6±1,5 Abc	38,0±1,7 Abc	39,0±2,6 Cb	58,3±3,0 ABa
S3	39,0±2,6 Abc	32,0±2,6 ABc	34,0±2,0 Abc	41,5±9,4 Ab	40,3±2,0 Abc	38,6±1,1 Abc	38,0±1,7 Cbc	50,6±1,5 Ba
S4	36,6±2,0 ABbcd	31,3±4,5 Bd	34,6±1,5 Acd	37,6±6,0 Abcd	39,3±2,8 Abcd	43,3±1,5 Ab	42,0±2,0 BCbc	56,6±6,3 ABa
S5	35,0±2,0 Abc	34,0±2,0 Abc	38,6±1,5 Ac	41,3±3,1 Abc	38,3±0,5 Ac	42,3±2,5 Abc	48,3±3,5 ABb	62,0±0,1 Aa
S6	30,6±5,0 Abe	31,3±3,2 Bde	39,0±2,6 Acde	37,4±5,9 Acde	39,3±2,0 Acd	43,6±2,0 Ac	52,3±3,7 Ab	62,6±6,4 Aa

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e, nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média ± desvio padrão

O teor foliar de Zn apresentou a maior variação significativa entre as soluções nutritivas na 7ª e 8ª coletas de brotações, sendo determinado o maior acúmulo para as soluções S5 e S6. O teor foliar de Zn variou de 62,6 a 30,3 mg kg⁻¹ ao longo das oito coletas de brotações (Tabela 10).

Considerando as soluções S1 e S2 (ambas isentas de B) verifica-se que 62,5% dos teores foliares de B foram classificados como deficientes (5ª a 8ª coleta de brotações) e 37,5%

como baixos (1^a a 4^a coleta de brotações), o que denota forte resposta das minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação aos tratamentos que apresentaram omissão de B na solução nutritiva (Tabela 11).

Tabela 11 - Porcentagem de frequência dos teores foliares para os micronutrientes considerados alto, adequado, baixo e deficiente de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação a solução nutritiva em oito coletas de brotações

Solução	Alto	Adequado	Baixo	Deficiente
	B			
----- (%) -----				
S1	0,0	0,0	37,5	62,5
S2	0,0	0,0	37,5	62,5
S3	0,0	75,0	25,0	0,0
S4	0,0	75,0	25,0	0,0
S5	0,0	100,0	0,0	0,0
S6	37,5	62,5	0,0	0,0
Solução	Cu			
	----- (%) -----			
S1	0,0	62,5	37,5	0,0
S2	0,0	50,0	50,0	0,0
S3	0,0	62,5	37,5	0,0
S4	0,0	37,5	62,5	0,0
S5	0,0	37,5	62,5	0,0
S6	0,0	37,5	62,5	0,0
Solução	Fe			
	----- (%) -----			
S1	0,0	50,0	25,0	25,0
S2	12,5	25,0	37,5	25,0
S3	12,5	50,0	12,5	25,0
S4	12,5	50,0	12,5	25,0
S5	12,5	37,5	25,0	25,0
S6	25,0	25,0	25,0	25,0
Solução	Mn			
	----- (%) -----			
S1	50,0	50,0	0,0	0,0
S2	62,5	37,5	0,0	0,0
S3	50,0	50,0	0,0	0,0
S4	50,0	50,0	0,0	0,0
S5	50,0	50,0	0,0	0,0
S6	50,0	50,0	0,0	0,0
Solução	Zn			
	----- (%) -----			
S1	0,0	100,0	0,0	0,0
S2	0,0	100,0	0,0	0,0
S3	0,0	100,0	0,0	0,0
S4	0,0	100,0	0,0	0,0
S5	0,0	100,0	0,0	0,0
S6	0,0	100,0	0,0	0,0

Os teores foliares de B das minicepas que receberam as soluções S3 (0,5 mg L⁻¹ de B) e S4 (0,5 mg L⁻¹ de Zn e B) ficaram compreendidos em adequados e baixos, variando ao longo das coletas de brotações. As minicepas que receberam a solução S5 (1,0 mg L⁻¹ de Zn e B) apresentaram teores foliares considerados adequados em todas as coletas de brotações. Porém, as minicepas que receberam fertirrigação com a solução S6 (2 mg L⁻¹ de Zn e B) apresentaram teores foliares de B compreendidos entre alto e adequados, podendo causar toxidez a longo prazo (Tabela 11).

Os valores dos teores foliares de Cu ficaram compreendidos em adequados e baixos e, para o Mn entre alto e adequado. O Zn foi o único micronutriente que apresentou 100% dos teores foliares ao longo das coletas de brotações considerados como adequados (Tabela 11), apesar das variações das concentrações desse elemento entre as soluções nutritivas avaliadas.

De todos os micronutrientes, o Fe foi o que apresentou a maior variação dos teores foliares ao longo das coletas de brotações, sendo que os valores foram classificados como alto, adequado, baixo e deficiente (Tabela 11). Dessa forma, o Fe apresenta-se como um dos nutrientes que necessita maior cuidado durante o manejo da solução nutritiva para minijardins clonais de *Eucalyptus benthamii*, ao considerar as sucessivas coletas de brotações ao longo do ano, bem como, a variação da temperatura condicionada pela sazonalidade.

Pela análise da Matriz de Correlação de Pearson pode-se verificar elevada correlação das médias das temperaturas do ar máximas (TMAX), médias (TMED) e mínimas (TMIN) com os teores foliares de N, P, K, Mg, S, Fe e Mn (Tabela 12). Quanto maior foi a temperatura registrada dentro da casa de vegetação que continha o minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii* houve redução dos teores foliares de N, P, K e Fe, ou seja, a correlação foi negativa. Contudo, os teores foliares dos nutrientes Mg, S e Mn aumentaram com o aumento da temperatura, sendo observada correlação positiva (Tabela 12).

Existiu correlação positiva com valor superior a 0,60 para P*N, Mg*Ca, Fe*K e Mn*S, denotando aumento dos teores foliares desses nutrientes. Contudo, ocorreu correlação negativa com valor inferior a -0,60 somente para Mn*N, ou seja, o aumento do teor foliar de um dos nutrientes (Mn ou N) foi seguido da redução do outro (Tabela 12).

Tabela 12 - Resumo da Matriz Correlação de Pearson para a temperatura do ar máxima (TMAX), temperatura média (TMED), temperatura mínima (TMIN), teor foliar de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), cobre (Cu), ferro (Fe) e manganês (Mn) de brotações de minicepas de *Eucalyptus benthamii* ao longo de 316 dias de coletas sucessivas de brotações

Variável	TMAX	TMED	TMIN	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn
TMAX	1											
TMED	0,99 ^{**}	1										
TMIN	0,97 ^{**}	0,99 ^{**}	1									
N	-0,78 ^{**}	-0,77 ^{**}	-0,76 ^{**}	1								
P	-0,48 ^{**}	-0,46 ^{**}	-0,45 ^{**}	0,74 ^{**}	1							
K	-0,78 ^{**}	-0,85 ^{**}	-0,87 ^{**}	0,52 ^{**}	0,25 ^{**}	1						
Ca	0,16 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,22 ^{**}	-0,02 ^{ns}	0,29 ^{**}	1					
Mg	0,54 ^{**}	0,47 ^{**}	0,43 ^{**}	-0,59 ^{**}	-0,46 ^{**}	-0,01 ^{ns}	0,71 ^{**}	1				
S	0,62 ^{**}	0,64 ^{**}	0,65 ^{**}	-0,51 ^{**}	-0,09 ^{ns}	-0,47 ^{**}	0,28 ^{**}	0,43 ^{**}	1			
Cu	-0,18 ^{ns}	-0,20 [*]	-0,21 [*]	0,21 [*]	0,02 ^{ns}	0,39 ^{**}	0,20 [*]	0,27 ^{**}	0,01 ^{ns}	1		
Fe	-0,61 ^{**}	-0,68 ^{**}	-0,72 ^{**}	0,40 ^{**}	0,01 ^{ns}	0,86 ^{**}	0,29 ^{**}	0,11 ^{ns}	-0,54 ^{**}	0,44 ^{**}	1	
Mn	0,68 ^{**}	0,71 ^{**}	0,73 ^{**}	-0,67 ^{**}	-0,38 ^{**}	-0,52 ^{**}	0,35 ^{**}	0,53 ^{**}	0,78 ^{**}	0,05 ^{ns}	-0,48 ^{**}	1

^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ^{**} Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F

Nota: Os microelementos Zn e B não foram incluídos devido a serem considerados fatores de variações para a composição dos tratamentos das soluções nutritivas

2.3.3 Teor foliar de carboidratos solúveis não estruturais

De acordo com a análise de variância houve interação entre a coleta de brotações e solução nutritiva para o teor foliar de sacarose, glicose e total de carboidratos contidos em minicepas de *Eucalyptus benthamii*. O teor foliar de frutose variou significativamente em relação a solução nutritiva, independente da coleta de brotações (Tabela 13).

Tabela 13 - Resumo da análise de variância para o teor foliar de sacarose (SAC), glicose (GLI), frutose (FRU) e total de carboidratos solúveis não estruturais (TOTAL) em brotações de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação a coleta de brotações e concentrações de Zn e B

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios			
		SAC ⁽¹⁾ (mg g ⁻¹)	GLI ⁽¹⁾ (mg g ⁻¹)	FRU ⁽¹⁾ (mg g ⁻¹)	TOTAL ⁽¹⁾ (mg g ⁻¹)
Coleta (COL)	3	0,9361**	0,1388 ^{ns}	0,3928 ^{ns}	0,1426 ^{ns}
Resíduo-COL	8	0,0727 ^{ns}	0,0733**	0,1052 ^{ns}	0,0861 ^{ns}
Parcela	11	—	—	—	—
Solução-SOL	5	0,2288**	0,0515 ^{ns}	0,1661*	0,0931 ^{ns}
COL*SOL	15	0,2288**	0,0607**	0,0877 ^{ns}	0,0885*
Resíduo	40	0,0465	0,0215	0,0620	0,0397
Subparcela	71	—	—	—	—
Média	—	0,12	3,57	5,51	9,21
CV _{exp.} (%)	—	37,26	16,69	14,24	8,88

^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. * e ** Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. ⁽¹⁾ Dados transformados por $\log(n+0,5)$, onde n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental, TOTAL corresponde ao somatório de sacarose, glicose e frutose

O teor foliar de frutose diferiu significativamente entre as soluções S1 e S6, apresentando valores de 6,84 e 4,86 mg g⁻¹, respectivamente. As minicepas que receberam o tratamento com solução S1 (isento de Zn e B) apresentaram cerca de 40% a mais de teor foliar de frutose em relação as minicepas que receberam a solução S6 (maior concentração de Zn e B). As soluções S2, S3, S4 e S5 não apresentaram diferença significativa do teor foliar de frutose em relação as demais soluções nutritivas (Tabela 14).

Tabela 14 - Teor foliar de frutose (FRU) em brotações de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação a solução de Zn e B

Solução	FRU (mg g ⁻¹)
S1	6,84±1,74 A
S2	5,37±2,13 AB
S3	5,49±2,00 AB
S4	5,09±1,65 AB
S5	5,43±1,27 AB
S6	4,86±1,97 B

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média ± desvio padrão

Ao analisar os teores foliares de sacarose verifica-se que os valores foram reduzidos em relação a solução nutritiva e coleta de brotações (Tabela 15). Apenas na 8ª coleta de brotações

foi detectada a presença de teor foliar de sacarose nas brotações das minicepas de *Eucalyptus benthamii*, onde o maior acúmulo ocorreu para as minicepas que foram submetidas as soluções S5 (1,54 mg g⁻¹) e S6 (1,02 mg g⁻¹), as quais não diferiram significativamente. Considerando a 8ª coleta de brotações, os menores teores foliares de sacarose foram verificados para as soluções S1, S2, S3 e S4, as quais não diferiram significativamente (Tabela 15).

Tabela 15 - Teor foliar de sacarose (SAC), glicose (GLI) e total de carboidratos solúveis não estruturais (TOTAL) em brotações de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em relação a coleta de brotações e solução de Zn e B

Coleta	Solução					
	S1	S2	S3	S4	S5	S6
SAC ----- (mg g ⁻¹) -----						
2 ^a	0,00±0,00 Aa	0,00±0,00 Aa	0,00±0,00 Aa	0,00±0,00 Aa	0,00±0,00 Ba	0,00±0,00 Ba
4 ^a	0,00±0,00 Aa	0,00±0,00 Aa	0,00±0,00 Aa	0,00±0,00 Aa	0,00±0,00 Ba	0,00±0,00 Ba
6 ^a	0,00±0,00 Aa	0,00±0,00 Aa	0,00±0,00 Aa	0,00±0,00 Aa	0,00±0,00 Ba	0,00±0,00 Ba
8 ^a	0,00±0,00 Ab	0,00±0,00 Ab	0,12±0,21 Ab	0,22±0,38 Ab	1,54±0,88 Aa	1,02±0,89 Aa
GLI ----- (mg g ⁻¹) -----						
2 ^a	3,27±0,60 Aa	4,28±1,19 ABa	3,29±1,03 Aa	2,59±0,62 Ba	2,80±0,56 Aa	3,05±0,35 Aa
4 ^a	4,49±0,69 Aa	4,50±0,94 Aa	3,47±1,24 Aa	4,71±0,87 Aa	3,98±0,44 Aa	3,15±0,50 Aa
6 ^a	3,37±0,89 Aa	4,03±0,97 ABa	3,85±0,46 Aa	3,68±0,15 ABa	3,93±0,38 Aa	2,77±0,36 Aa
8 ^a	3,77±0,60 Aa	2,49±0,33 Ba	3,77±0,43 Aa	3,45±0,62 ABa	3,82±0,84 Aa	3,14±0,58 Aa
TOTAL ----- (mg g ⁻¹) -----						
2 ^a	11,73±1,71 Aa	11,29±3,46 Aa	8,25±2,08 Bc	6,49±1,59 Dd	8,31±1,31 Cc	9,93±3,39 Ab
4 ^a	12,12±1,75 Aa	10,90±2,81 Ab	9,76±5,24 Ac	12,10±0,74 Aa	10,40±1,32 Ab	7,34±1,00 Bd
6 ^a	8,99±1,82 Bbc	8,92±2,17 Bbc	9,76±0,98 Aa	8,62±0,95 Bc	9,26±0,71 Bab	7,44±1,59 Bd
8 ^a	9,44±1,94 Bb	5,67±0,28 Cd	8,73±1,63 Bb	7,82±1,15 Cc	9,86±1,48 ABa	7,86±2,14 Bc

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúsculas e, nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. TOTAL corresponde ao somatório de sacarose, glicose e frutose. Dados apresentados como: média ± desvio padrão

Considerando cada coleta de brotações, o teor foliar de glicose das minicepas de *Eucalyptus benthamii* não variou significativamente em relação as soluções nutritivas avaliadas. Contudo, ao comparar as coletas de brotações dentro de cada solução nutritiva, pode-se verificar variação significativa do teor foliar de glicose para as soluções S2 e S4. A solução S2 apresentou diferença significativa entre a 4ª e 8ª coleta de brotações, sendo determinado 4,50 e 2,49 mg g⁻¹ de glicose, respectivamente. Ao considerar a solução S4, pode-se observar diferença significativa entre a 4ª e 2ª coleta de brotações, apresentando 4,71 e 2,59 mg g⁻¹ de glicose, respectivamente (Tabela 15).

O teor foliar total de carboidratos solúveis não estruturais (somatório dos teores foliares de sacarose, frutose e glicose) apresentou diferença significativa tanto ao considerar as coletas de brotações dentro das soluções nutritivas, quanto ao considerar as soluções nutritivas dentro

das coletas de brotações (Tabela 15). Durante a 2ª coleta de brotações o maior valor do teor total de carboidrato ocorreu para as soluções S1 (11,73 mg g⁻¹) e S2 (11,29 mg g⁻¹), as quais não diferiram significativamente. Na 4ª coleta de brotações o maior valor do teor total de carboidrato ocorreu para as soluções S1 (12,12 mg g⁻¹) e S4 (12,10 mg g⁻¹), que não diferiram significativamente. Na 6ª coleta de brotações verifica-se que o maior valor do teor total de carboidrato ocorreu nas soluções S3 (9,76 mg g⁻¹) e S5 (9,26 mg g⁻¹), que não diferiram significativamente. Na 8ª coleta de brotações o maior valor do teor total de carboidrato foi registrado somente para a solução S5 (9,86 mg g⁻¹), a qual apresentou diferença significativa em relação as demais soluções nutritivas.

Ao analisar a variação do teor total de carboidrato solúvel não estrutural em relação a cada solução nutritiva, verifica-se que as soluções S1 e S2 apresentaram os maiores valores durante a 2ª e 4ª coletas de brotações, sendo registrada redução do teor total de carboidrato até a 8ª coleta de brotações. A solução S3 apresentou o maior valor do teor total de carboidrato durante a 4ª e 6ª coletas de brotações, as quais não diferiram significativamente. Em relação a solução S4, o maior valor do teor total de carboidrato ocorreu somente na 4ª coleta de brotações. Em relação a solução S5 o maior valor do teor total de carboidrato ocorreu na 4ª e 8ª coletas de brotações. A solução S6 apresentou o maior valor do teor total de carboidrato somente na 2ª coleta de brotações (Tabela 15). Em termos gerais, com o aumento das concentrações de Zn e B na solução nutritiva ocorreu redução dos teores foliares de carboidratos solúveis não estruturais, sendo que a frutose foi a mais afetada.

2.4 Discussão

Em termos gerais, os valores da porcentagem de sobrevivência das minicepas de *Eucalyptus benthamii* até a 7ª coleta de brotações podem ser considerados elevados e adequados para a condução de minijardins clonais de *Eucalyptus* (ALFENAS et al., 2004; ASSIS; MAFIA, 2007), denotando viabilidade das minicepas como fonte fornecedora de brotações durante o período experimental. Esse resultado corrobora as observações de Cunha; Wendling e Souza Junior (2005), que também relataram elevada sobrevivência de minicepas de *Eucalyptus benthamii* em sistema de minijardim clonal (tubete e canaletão com areia).

Demais trabalhos reportam a ocorrência de elevadas porcentagens de sobrevivência de minicepas em minijardins clonais de *Eucalyptus*, sendo comuns valores superiores a 90%. Brondani (2008) observou elevada porcentagem de sobrevivência (>90%) de minicepas de

Eucalyptus benthamii x *Eucalyptus dunnii* conduzidas em sistema de minijardim clonal durante 352 dias de sucessivas coletas de brotações (27 coletas de brotações), constatando longevidade das minicepas como fonte fornecedora de brotações. Resultados semelhantes também foram reportados para *Eucalyptus* spp. (WENDLING, 1999) e *Eucalyptus grandis* (TITON et al., 2003; WENDLING; XAVIER; PAIVA, 2003) reforçando as observações do presente estudo.

Contudo, ao considerar o aspecto nutricional, houve diferença significativa da sobrevivência de minicepas entre os genótipos e solução nutritiva na 8ª coleta de brotações, principalmente em relação a omissão de B (S1 e S2). O clone BP118 apresentou os maiores índices de sobrevivência de minicepas em relação aos clones BP101 e BP120, os quais foram mais sensíveis a omissão de B. Dessa forma, pode-se inferir que o clone BP118 apresentou maior adaptação ao tipo de manejo adotado para a condução do minijardim clonal em vaso com areia, tanto em termos de manejo de poda das brotações e variação nutricional de Zn e B, quanto em relação as condições ambientais da casa de vegetação. Essa diferença de resposta entre materiais genéticos em relação as técnicas de propagação é enfatizada por Hartmann et al. (2011), em que segundo o autor, é comum ser adotado um manejo específico no sistema de produção de miniestacas para cada clone de interesse (ALFENAS et al., 2004; ASSIS; MAFIA, 2007).

Embora em outras condições experimentais, a diferença de comportamento entre genótipos de *Eucalyptus* quanto as concentrações de Zn ou B em solução nutritiva também foi relatada em diversos trabalhos (BARRETTO et al., 2007; SGARBI et al., 1999; SILVEIRA et al., 2000; SILVEIRA et al., 2002; SILVEIRA; GONÇALVES; KRÜGNER, 1998; SILVEIRA; MOREIRA; HIGASHI, 2004), levando em consideração a essencialidade desses elementos para o metabolismo da planta (SAKYA; DELL; HUANG, 2002; MEDEIROS; BELTRÃO; MEDEIROS, 2003; EPSTEIN; BLOOM, 2004; DECHEN; NACHTIGALL, 2006; MALAVOLTA, 2006; CUNHA et al., 2009a; TAIZ; ZEIGER, 2009), o que compromete o crescimento e desenvolvimento do vegetal em condições de deficiência.

Em termos de miniestaquia, a deficiência de Zn ou B pode condicionar a adaptabilidade do genótipo ao sistema de produção no minijardim clonal, refletindo na capacidade da minicepa em produzir brotações aptas para serem submetidas ao enraizamento. Dessa forma, as soluções nutritivas devem ser ajustadas para os clones mais sensíveis a deficiência de um determinado nutriente, a fim de manter a produção de brotos em níveis adequados. Considerando esse aspecto, as soluções S5 (1 mg L⁻¹ de B e Zn) e S6 (2 mg L⁻¹ de B e Zn)

foram as mais adequadas para a sobrevivência de minicepas de *Eucalyptus benthamii* submetidas a sucessivas coletas de brotações.

Ao considerar a qualidade do broto, a solução nutritiva influenciou o número de nós e o número de folhas emitidas pelas minicepas de *Eucalyptus benthamii* ao longo das sucessivas coletas de brotações, semelhante ao reportado para *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (BARRETTO et al., 2007; SGARBI et al., 1999; SILVEIRA et al., 2002), *Eucalyptus citriodora* (SILVEIRA et al., 2000; SILVEIRA; GONÇALVES; KRÜGNER, 1998) e para *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus grandis* (SILVEIRA; MOREIRA; HIGASHI, 2004), os quais foram sensíveis a omissão de B em solução nutritiva. Sgarbi et al. (1999) classificaram o B como um dos nutrientes que mais limitou o crescimento de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, reduzindo o crescimento em altura e a produção de matéria seca, além de comprometer a sobrevivência das mudas.

O comprimento de broto e o intervalo de entrenós, não apresentaram variação em relação a solução nutritiva, mas somente em relação a coleta de brotações e entre os genótipos de *Eucalyptus benthamii*, verificando efeito da sazonalidade na qualidade do broto produzido ao longo do ano. Esse efeito está de acordo com o relatado na literatura, em que a qualidade das brotações está intimamente ligada aos fatores ambientais, como a luminosidade (ALFENAS et al., 2004), temperatura do ar (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2005) e fotoperíodo (ASSIS; MAFIA, 2007), os quais são condicionados pela sazonalidade (CUNHA et al., 2009a) e influenciam significativamente a produção e a qualidade de brotações ao longo do ano em diferentes condições de manejo. Além disso, pode-se verificar correlação dos dados da temperatura do ar com o comprimento de broto, número de folhas, número de nós e intervalo de entrenós (Tabela 4), reforçando as observações do presente estudo com *Eucalyptus benthamii*. Apesar da variação da qualidade, as brotações das minicepas apresentaram-se aptas para serem usadas para a confecção de miniestacas durante todo o ano, não ocorrendo perda de amostragem das unidades experimentais.

Outra característica biométrica que apresentou variação em relação a solução nutritiva, principalmente na omissão de B (S1 e S2), foi a produção de miniestacas por metro quadrado ao ano das minicepas de *Eucalyptus benthamii* conduzidas em sistema de vasos. Geralmente, a produção de miniestacas por metro quadrado ao ano em sistema de minijardim clonal de *Eucalyptus* oscila de acordo com as coletas ao longo do tempo, sendo comum a ocorrência de picos de produção seguidos de decréscimos, ou seja, efeito cíclico (CUNHA et al., 2008; CUNHA; WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2005; TITON et al., 2003). Esse efeito foi observado ao longo das coletas de brotações de miniestacas de *Eucalyptus benthamii*, o qual

não parece seguir um comportamento constante de produção (elevada variância dentro e entre as coletas de brotações), semelhante ao observado por Brondani (2008), Cunha et al. (2009a), Cunha; Wendling e Souza Junior (2005), Wendling e Xavier (2003) e Wendling; Xavier e Paiva (2003). Essa característica de comportamento está associada ao manejo de poda (ALFENAS et al., 2004; WENDLING; XAVIER; PAIVA, 2003), variações da temperatura (BRONDANI, 2008), fotoperíodo (CUNHA et al., 2009a; CUNHA; WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2005), fatores genéticos (WENDLING; XAVIER, 2003), intervalo entre coletas (WENDLING; XAVIER; PAIVA, 2003), aspectos nutricionais (CUNHA et al., 2008; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2005; ROSA et al., 2009; TITON et al., 2003), juvenilidade da minicepa (WENDLING; XAVIER, 2003; WENDLING; XAVIER; PAIVA, 2003), os quais afetam significativamente a produção de miniestacas ao longo do tempo.

Ao considerar a miniestaca apical como propágulo oriundo de minicepas manejadas em minijardim clonal existe variação de 7.488 a 41.480 miniestacas por metro quadrado ao ano, sendo essa produção muito dependente do genótipo e do tipo de minijardim clonal (ALFENAS et al., 2004). Dessa forma, pode-se inferir que os valores médios do número de miniestacas por metro quadrado ao ano das minicepas de *Eucalyptus benthamii* que foram fertirrigadas com as soluções S3 (0,5 mg L⁻¹ de B), S4 (0,5 mg L⁻¹ de Zn e B), S5 (1,0 mg L⁻¹ de Zn e B) e S6 (2,0 mg L⁻¹ de Zn e B) estão adequados em relação aos padrões registrados na literatura para *Eucalyptus*. Contudo, as soluções S1 (omissão de Zn e B) e S2 (omissão de B) estão próximas ao limite inferior de produção de miniestacas por metro quadrado ao ano, podendo ser considerados reduzidos e podem comprometer o padrão da produção de brotações com o passar do tempo.

Apesar da não constatação de diferença significativa para todas as coletas de brotações, em termos médios, a omissão de B na solução nutritiva representou perdas de até 13,27% da produção de miniestacas por metro quadrado ao ano, denotando a importância desse nutriente para o tipo de sistema empregado.

Ao considerar as condições experimentais, a omissão de Zn na presença de 0,5 mg L⁻¹ de B na forma como foi aplicada na solução nutritiva (S3), não influenciou significativamente a produção de miniestacas por metro quadrado ao ano de *Eucalyptus benthamii*, assemelhando-se aos valores das soluções S4 (0,5 mg L⁻¹ de Zn e B), S5 (1,0 mg L⁻¹ de Zn e B) e S6 (2,0 mg L⁻¹ de Zn e B). Sgarbi et al. (1999) também não verificaram influência significativa das características de crescimento em *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* ao omitir Zn em solução nutritiva. O Zn é classificado como traço, sendo requerido em baixa concentração pelas plantas (MALAVOLTA, 2006) e, por apresentar intermediária

redistribuição entre os tecidos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009), as minicepas podem não ter apresentado sintomas de deficiência dentro do período experimental. Outro aspecto a ser considerado, refere-se ao teor de Zn existente na água utilizada para a composição da solução nutritiva, o qual foi de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$. Provavelmente, as irrigações diárias (variando de 600 a 1.000 mL por vaso de acordo com a época do ano) e as lavagens semanais para reduzir a salinização no substrato podem ter suprido a disponibilidade de Zn para as minicepas, mesmo que esse elemento tenha apresentado baixa concentração na água, caracterizando efeito contaminante no tratamento isento de Zn. Esses fatores podem ter influenciado para o não surgimento de sintomas de deficiência nutricional mais característicos de Zn nas folhas (DELL; MALAJCZUK; GROVE, 1995), bem como alterações significativas nas características de crescimento das minicepas de *Eucalyptus benthamii*. No caso de haver novas pesquisas com o mesmo tipo de sistema de manejo adotado no presente estudo, esses fatores de variação deverão ser considerados e controlados com maior rigor a fim de estudar o efeito do Zn nas características de crescimento de minicepas, sobretudo em relação ao tipo de substrato e controle da pureza da água de irrigação e fertirrigação.

A temperatura apresenta papel fundamental para a atividade metabólica do vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2009), influenciando inúmeros fatores, como a disponibilidade e absorção de nutrientes (MALAVOLTA, 2006), velocidade de crescimento (HARTMANN et al., 2011), ativação e inativação de enzimas (EPSTEIN; BLOOM, 2004), os quais interferem no crescimento e desenvolvimento do vegetal. O efeito da temperatura na miniestaquia de *Eucalyptus* foi reportado por Cunha et al. (2009a) e está muito condicionado a disposição geográfica, altitude e variações da sazonalidade ao longo do ano (ALFENAS et al., 2004; ASSIS; MAFIA, 2007; HARTMANN et al., 2011). A influência da temperatura na técnica de miniestaquia também foi confirmada no presente estudo ao verificar correlação significativa com as características de crescimento (comprimento de broto, número de folhas, número de nós e intervalo de entrenós) das minicepas de *Eucalyptus benthamii* (Tabela 4), as quais condicionaram em grande parte as respostas obtidas em termos de qualidade das brotações.

Em relação a omissão de Zn e B na solução nutritiva, os sintomas de deficiência nutricional de B foram caracterizados como o mais frequentes nas minicepas de *Eucalyptus benthamii*, denotando a eficiência da metodologia aplicada para estudar o efeito do B. Porém o Zn não foi afetado de acordo com as soluções nutritivas, sendo os teores foliares classificados como adequados em todos os tratamentos, assemelhando-se ao reportado por Sgarbi et al. (1999) para *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

De acordo com a literatura, os sintomas mais comuns de deficiência de B em *Eucalyptus* são caracterizados pela: (i) morte dos meristemas apicais seguida de superbrotamento das gemas laterais devido a perda da dominância apical, (ii) folhas novas de tamanho reduzido, deformadas, encarquilhadas e coriáceas, (iii) clorose marginal e (iv) presença de nervuras salientes nas folhas medianas intermediárias (SGARBI et al., 1999; SILVEIRA et al., 2000; SILVEIRA et al., 2002; SILVEIRA; GONÇALVES; KRÜGNER, 1998). Esses sintomas foram registrados nas minicepas submetidas ao tratamento com as soluções S1 (omissão de Zn e B) e S2 (omissão de B) a partir da 5ª coleta de brotações (Figura 12), não sendo verificados para as demais soluções nutritivas. Esse fato indica que a deficiência de B foi mais pronunciada e refletiu em alterações morfofisiológicas das minicepas de *Eucalyptus benthamii*.

Um dos fatores determinantes para o sucesso da propagação refere-se ao estado nutricional da planta doadora de propágulos para o enraizamento (HARTMANN et al., 2011; CUNHA et al., 2009c). Quando se utilizam soluções nutritivas balanceadas em sistemas de minijardins clonais, garante-se o equilíbrio nutricional da minicepa. Contudo, os padrões ideais das concentrações de nutrientes não estão estabelecidos para minicepas de *Eucalyptus* (ALFENAS et al., 2004), sendo necessários ajustes de acordo com as condições de manejo e material genético de interesse.

Pelas análises dos teores nutricionais das folhas pode-se verificar que as concentrações de nitrogênio (N) foram classificadas como deficientes em 12,5% das observações (estação mais quente), independente da solução nutritiva. Esse resultado indica que a concentração de N na solução nutritiva básica poderá ser aumentada conforme a necessidade nutricional do material genético e época do ano. O N é constituinte de aminoácidos, amins, amidas, bases nitrogenadas, alcalóides, clorofilas e muitas coenzimas (EPSTEIN; BLOOM, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2009) e apresenta correlação com o enraizamento (CUNHA et al., 2009c). Sua deficiência em folhas de *Eucalyptus* é caracterizada por clorose gradual e generalizada das folhas mais velhas e estiolamento (DELL; MALAJCZUK; GROVE, 1995; EPSTEIN; BLOOM, 2004; MALAVOLTA, 2006).

A influência do N no sistema de produção de miniestacas para *Eucalyptus* é reportado em diversos trabalhos, sendo que o controle das concentrações desse macronutriente na solução nutritiva requer muitos cuidados, tendo em vista a especificidade de cada material genético. Rosa et al. (2009) observaram que a adubação nitrogenada influenciou significativamente a produtividade de brotações em minicepas de *Eucalyptus dunnii*, levando em consideração a essencialidade desse nutriente para o adequado metabolismo da planta

afim de garantir a produtividade de brotações em quantidade e qualidade adequadas. Carvalho Neto et al. (2011) verificaram efeito significativo das concentrações de N na solução de fertirrigação para a matéria seca de miniestacas de *Eucalyptus urophylla*, com efeito linear decrescente com o aumento das concentrações de N. Cunha et al. (2008) observaram correlação positiva do teor de nitrogênio com o número de miniestacas no minijardim clonal em leito de areia para um híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, indicando que para aumentar a produtividade de miniestacas seria necessário aumentar a concentração de nitrogênio para o referido material genético. Contudo, Higashi; Silveira e Gonçalves (2002) salientam que o aumento excessivo das concentrações de N na solução nutritiva de fertirrigação em minijardins clonais de *Eucalyptus* pode provocar reduções das concentrações de B, Cu, Fe, Mn e Zn, o que demonstra a importância de se conhecer os níveis críticos para cada material genético de interesse.

Outro macronutriente que apresentou elevados índices de deficiência nutricional foi o potássio (K), chegando a 50% das observações a serem classificadas como deficientes para todas as soluções nutritivas, podendo ser necessário aumentar a concentração desse nutriente na solução nutritiva básica. O potássio atua na ativação de grande número de enzimas e está envolvido no controle estomático e transporte de carboidratos (EPSTEIN; BLOOM, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2009). Além de sua participação na ativação enzimática, o potássio realiza três funções inter-relacionadas: (i) participação no transporte através da membrana, (ii) neutralização de ânions e (iii) manutenção do potencial osmótico (MALAVOLTA, 2006; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009). A deficiência de potássio caracteriza-se por apresentar folhas verde-secura ou azul-esverdeadas com necrose marginal ou murcha da folha, podendo ocasionar, sob condições severas, mortalidade das gemas laterais e terminais (DELL; MALAJCZUK; GROVE, 1995; EPSTEIN; BLOOM, 2004; MALAVOLTA, 2006).

Cunha et al. (2008) verificaram correlação positiva dos teores foliares de K para um híbrido de *Eucalyptus grandis* (clone 57) e para um genótipo de *Eucalyptus grandis* (clone 7074), destacando que os níveis de adequação propostos na literatura não se aplicaram a todos os materiais genéticos estudados, considerando que os teores ideais foram diferentes entre os clones. Contudo, no mesmo estudo, os autores verificaram efeitos negativos das concentrações de K na solução nutritiva para um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, recomendando redução da concentração de K na solução de fertirrigação. Esses efeitos podem estar associados a elevada mobilidade do K (TAIZ; ZEIGER, 2009), o qual é facilmente absorvido e translocado na planta (EPSTEIN; BLOOM, 2004; MALAVOLTA,

2006), o que também pode ter influenciado as respostas apresentadas pelo *Eucalyptus benthamii*.

Dos micronutrientes avaliados, somente o ferro (Fe) apresentou deficiência nutricional para todas as soluções nutritivas, chegando a 25% das observações serem classificadas como deficiente, sendo necessário aumentar sua concentração na solução nutritiva básica conforme a necessidade do material genético e época do ano. A principal função do Fe refere-se a ativação de enzimas, atuando como grupo prostético. Participa em reações de oxiredução, tanto em homeoproteínas (citocromos, leguemoglobina, catalase, peroxidase e superóxido dismutase) quanto em proteínas não-hémicas com ligação de F-S, tais como a ferredoxina e enzimas redutase, nitrogenase e sulfato redutase. Além disso, o Fe catalisa a biossíntese de clorofila, tendo em vista a sua participação em enzimas responsáveis pela síntese de clorofila (EPSTEIN; BLOOM, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2009). A deficiência de Fe é caracterizada pela incapacidade das folhas jovens em sintetizar clorofila, apresentando clorose internerval, onde somente os vasos condutores permanecem com coloração verde, presença de zonas necróticas nos bordos do limbo, seguido de queda precoce das folhas; redução do crescimento, apresentando talos finos e curvados (DELL; MALAJCZUK; GROVE, 1995; EPSTEIN; BLOOM, 2004; MALAVOLTA, 2006).

Cunha et al. (2008) reportaram correlações negativas entre os teores de Fe com a produtividade de brotações das minicepas de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e para *Eucalyptus grandis*, quando conduzidos em minijardim clonal em leito de areia. Semelhante ao constatado no presente estudo para minicepas de *Eucalyptus benthamii*, Cunha et al. (2008) destacaram que houve grande variação da frequência de casos da concentração de Fe ter sido considerada como adequado, baixo e deficiente, indicando a necessidade de outros estudos relacionados a nutrição com Fe para a indução de brotações. Tal necessidade também é essencial para gerar maior conhecimento a respeito da qualidade nutricional de brotações para serem utilizadas como miniestacas, tendo em vista a elevada variação dos teores foliares de Fe contidos nas brotações das minicepas de *Eucalyptus benthamii*.

Outro efeito importante em relação aos aspectos nutricionais referem-se as elevadas correlações apresentadas entre os nutrientes N (>0,76), K (>0,78) e Fe (>0,61) com os valores das temperaturas do ar máximas, médias e mínimas da casa de vegetação que continha o minijardim clonal (Tabela 12), onde todas as correlações foram negativas. Essa observação indica que o aumento da temperatura do ar pode ter induzido a deficiência desses nutrientes nas minicepas de *Eucalyptus benthamii*. O efeito da temperatura em relação a absorção de

nutrientes é reportado por diversos autores (EPSTEIN; BLOOM, 2004; MALAVOLTA, 2006), inclusive em sistemas de minijardins clonais de *Eucalyptus* (ALFENAS et al., 2004; CUNHA et al., 2009a). A temperatura influencia a mobilidade de nutrientes na solução nutritiva, sítios de absorção da membrana plasmática, velocidade de absorção, translocação e redistribuição nos tecidos (EPSTEIN; BLOOM, 2004; MALAVOLTA, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2009), bem como, interfere na atividade enzimática (TAIZ; ZEIGER, 2009), e dessa forma, na funcionalidade do metabolismo da planta. Essas observações reforçam que a temperatura do ar durante o sistema de produção de mudas de *Eucalyptus benthamii* deve ser controlada com maior rigor em busca da otimização do sistema de produção de mudas clonais, sobretudo nas épocas mais quentes do ano.

De acordo com as determinações dos teores nutricionais das folhas de minicepas de *Eucalyptus benthamii*, recomenda-se que as concentrações de N, K e Fe da solução nutritiva básica (Tabela 1) devem ser ajustadas com base na realização de futuros experimentos que apresentem maior rigor de controle em relação a metodologia adotada no presente estudo. Em termos gerais a respeito da nutrição das brotações de *Eucalyptus benthamii*, as soluções nutritivas S5 e S6 foram as que proporcionaram os melhores resultados.

Os carboidratos são importantes fontes de energia e carbono estrutural para o metabolismo vegetal, regulando reações bioquímicas para a manutenção do crescimento e desenvolvimento vegetal (CORRÊA et al., 2005; PAVLINOVA et al., 2002; STENVALL; PIISILÄ; PULKKINEN, 2009; TAIZ; ZEIGER, 2009; VEYRES et al., 2008). Além disso, existem evidências de uma forte interação do teor de carboidratos com o nível hormonal endógeno, sendo que esse efeito está diretamente relacionado com o processo morfogênico e/ou organogênico (CORUZZI; ZHOU, 2001; KOMATSU et al., 2011). Adicionalmente, o enraizamento em propágulos demanda consumo de energia, e o manejo do minijardim clonal visando adequar os teores de carboidratos na planta matriz se torna essencial para a obtenção de resultados satisfatórios durante a clonagem de genótipos selecionados (AGULLÓ-ANTÓN et al., 2011; RAGONEZI et al., 2010; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

A solução nutritiva isenta de Zn e B (S1) induziu maior acúmulo de frutose nos tecidos foliares das minicepas de *Eucalyptus benthamii*, indicando uma correlação da nutrição mineral com o acúmulo dessa forma de carboidrato nos tecidos foliares apicais. Resultado semelhante foi reportado por Leite et al. (2008) que verificaram aumento do teor foliar de arabinose na ausência de boro para *Eucalyptus grandis*. Contudo, em outro estudo, a suplementação de B na solução nutritiva induziu aumento do acúmulo dos teores foliares de manitol e sorbitol para *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis*

(LEITE; MARINO; BONINE, 2010), sendo que os autores sugerem estreita correlação do elemento B com a síntese de carboidratos específicos e a sua mobilidade na planta.

Os teores reduzidos de sacarose eram esperados, tendo em vista as amostras foliares serem oriundas da ponteira (meristema apical) das brotações das minicepas de *Eucalyptus benthamii*. Nessas regiões meristemáticas a atividade metabólica é mais elevada (regiões fisiologicamente ativas), sendo comum ocorrer formas de carboidratos mais reduzidos que são utilizados como fontes energéticas para as diversas reações bioquímicas, como a frutose e glicose (VEYRES et al., 2008). O carboidrato na forma de sacarose apresenta mobilidade na planta, sendo facilmente translocado para outras regiões de crescimento não-fotossintetizantes, como caule e raiz (MINDÉLLO NETO, 2005) onde geralmente, apresenta-se em maior concentração (TAIZ; ZEIGER, 2009).

O teor de foliar de glicose não variou em relação as soluções nutritivas, contudo a maior diferença ocorreu entre as épocas de amostragem. Esse resultado está de acordo com o relatado para diversas espécies de plantas, onde o acúmulo de carboidrato varia em relação aos efeitos da sazonalidade ao longo do ano (KERSTEN; LUCCHESI; GUTIERREZ, 1993; MINDÉLLO NETO, 2005). Além disso, o manejo de poda do minijardim clonal também pode ter contribuído para ocasionar alterações dos teores de carboidratos (BORBA; SCARPARE FILHO; KLUGE, 2005). Nesse sentido, Torres (2003) observou que as brotações mais aptas para o emprego da miniestaquia estão diretamente relacionadas ao aumento dos níveis de carboidratos de acordo com a época do ano e do intervalo entre as coletas de brotações. O autor salienta que o aumento da periodicidade entre as coletas de brotações resulta no aumento da área foliar específica, permitindo assim, maior produção de fotoassimilados, incrementando os teores endógenos de carboidratos.

Em termos gerais, os teores foliares dos carboidratos solúveis não estruturais (glicose, frutose e sacarose) para as minicepas de *Eucalyptus benthamii* foram afetados pelas soluções nutritivas e coletas de brotações ao longo do tempo, e os valores assemelham-se aos reportados para estudos *in vitro* com *Eucalyptus grandis*, o qual apresentou variação de 5,50 a 14,90 mg g⁻¹ em diferentes meios de cultura (CORREIA, 2006), para *Eucalyptus urophylla*, que apresentou variação de 6,9 a 11,7 mg g⁻¹ em relação a diferentes concentrações de boro (TREVISAM, 2001) e para *Eucalyptus urophylla* que variou de 2,2 a 12,2 mg g⁻¹ em relação a diferentes concentrações de boro e cálcio (TREVISAM, 2005).

Outros efeitos em relação ao acúmulo de carboidratos também podem estar relacionados as variações da temperatura. Floriani; Steffens e Chaves (2011) verificaram correlação negativa entre a elevada temperatura com a concentração de carboidratos solúveis totais no

tecido foliar de *Eucalyptus dunnii*, bem como, correlação com a tolerância ao frio com o aumento do acúmulo de carboidrato. Os autores sugeriram que a determinação da concentração foliar de carboidratos solúveis totais em mudas de *Eucalyptus dunnii* pode ser característica quantitativa a ser considerada na seleção de espécies tolerantes ao frio em programas de melhoramento. Futuros estudos poderão demonstrar a aplicabilidade desse efeito para o *Eucalyptus benthamii* em termos de sua tolerância a baixas temperaturas, tendo em vista que os efeitos em nível fisiológico na propagação clonal de plantas com as interações entre os teores de carboidratos, hormônios, nutrientes, bem como, fatores ambientais como luz e temperatura, não estão totalmente compreendidos (HARTMANN et al., 2011; RAGONEZI et al., 2010).

2.5 Conclusões

- A sobrevivência das minicepas variou significativamente em relação ao clone e solução nutritiva e, também de acordo com a coleta de brotações. O clone BP118 apresentou a maior porcentagem de sobrevivência de minicepas. As soluções S5 (1,0 mg L⁻¹ de Zn e B) e S6 (2,0 mg L⁻¹ de Zn e B) favoreceram a sobrevivência de minicepas para todos os clones;
- A produção de miniestacas variou significativamente conforme a coleta de brotações e solução nutritiva e, também clone e solução nutritiva. As soluções S5 (1,0 mg L⁻¹ de Zn e B) e S6 (2,0 mg L⁻¹ de Zn e B) favoreceram a produção de miniestacas por metro quadrado ao ano para a maioria das coletas de brotações;
- Os teores foliares de macro e micronutrientes variaram significativamente em relação a coleta de brotações e solução nutritiva. As soluções S5 (1,0 mg L⁻¹ de Zn e B) e S6 (2,0 mg L⁻¹ de Zn e B) favoreceram o acúmulo foliar de macro e micronutrientes das minicepas;

- O teor foliar de sacarose, glicose e total de carboidratos solúveis não estruturais em minicepas de *Eucalyptus benthamii* variou em relação a coleta de brotações e solução nutritiva. O teor foliar de frutose variou somente em relação a solução nutritiva. Em termos gerais, com o aumento das concentrações de Zn e B na solução nutritiva ocorreu redução dos teores foliares totais de carboidratos solúveis não estruturais, sendo que a frutose foi a mais afetada.

Referências

- AGULLÓ-ANTÓN, M.A.; SÁNCHEZ-BRAVO, J.; ACOSTA, M.; DRUEGE, U. Auxins or sugars: what makes the difference in the adventitious rooting of stored carnation cuttings? **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 30, n. 1, p. 100–113, 2011. DOI: 10.1007/s00344-010-9174-8
- ALABADÍ, D.; BLÁZQUEZ, M.A. Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 409–417, 2009. DOI: 10.1007/s11103-008-9400-y
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442 p.
- ALMEIDA, F.D.; XAVIER, A.; DIAS, J.M.M.; PAIVA, H.N. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 455–463, 2007. DOI: 10.1590/S0100-67622007000300011
- ASSIS, T.F.; MAFIA, R.G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotechnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 93–121.
- BARRETTO, V.C.M.; VALERI, S.V.; SILVEIRA, R.L.V.A.; TAKAHASHI, E.N. Eficiência de uso de boro no crescimento de clones de eucalipto em vasos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 76, p. 21–33, 2007.
- BORBA, M.R.C.; SCARPARE FILHO, J.A.; KLUGE, R.A. Teores de carboidratos em pessegueiros submetidos a diferentes intensidades de poda verde em clima tropical. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 68–72, 2005. DOI: 10.1590/S0100-29452005000100019
- BRONDANI, G.E. **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2008. 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BRONDANI, G.E.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Determinação do tempo ótimo de enraizamento para miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. In: REUNIÓN ARGENTINA DE FISILOGÍA VEGETAL, 28., 2010, La Plata. **Libro de Resúmenes...** La Plata: Asociación Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal, 2010. p. 194. 1 CD-ROM.

BRONDANI, G.E.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; DUTRA, L.F.; ARAUJO, M.A. Aplicação de IBA para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 667–674, 2010a. DOI: 10.4025/actasciagron.v32i4.4879

BRONDANI, G.E.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; DUTRA, L.F.; ARAUJO, M.A. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*: (II) sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das coletas e estações do ano. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 3, p. 453–465, 2010b.

CARVALHO NETO, J.P.; SILVA, E.B.; SANTANA, R.C.; GRAZZIOTTI, P.H. Effect of NPK fertilization on production and leaf nutrient content of *Eucalyptus* minicuttings in nutrient solution. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, p. 249–254, 2011. DOI: 10.1590/S0100-06832011000100023

CORRÊA, L.R.; PAIM, D.C.; SCHWAMBACH, J.; FETT-NETO, A.G. Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 45, n. 1, p. 63–73, 2005. DOI: 10.1007/s10725-004-6125-z

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

CORUZZI, G.M.; ZHOU, L. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging ‘matrix effects’. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, n. 3, p. 247–53, 2001. DOI: 10.1016/S1369-5266(00)00168-0

CUNHA, A.C.M.C.M.; WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. Produtividade e sobrevivência de minicepas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage em sistema de hidroponia e em tubete. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 307–310, 2005.

CUNHA, A.C.M.C.M.; PAIVA, H.N.; BARROS, N.F.; LEITE, H.G.; LEITE, F.P. Relação do estado nutricional de miniestacas com o número de miniestacas de eucalipto. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 36, n. 79, p. 203–213, 2008.

_____. Relação do estado nutricional de minicepas com o enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 3, p. 591–599, 2009c. DOI: 10.1590/S0100-06832009000300012

CUNHA, A.C.M.C.M.; PAIVA, H.N.; LEITE, H.G.; BARROS, N.F.; LEITE, F.P. Relações entre variáveis climáticas com produção e enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 2, p. 195–203, 2009a. DOI: 10.1590/S0100-67622009000200001

_____. Influência do estado nutricional de minicepas no enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 607–615, 2009b. DOI: 10.1590/S0100-67622009000400003

DECHEN, A.R.; NACHTIGALL, G.R. Micronutrientes. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 327–354.

DELL, B.; MALAJCZUK, N.; GROVE, T.S. **Nutrient disorders in plantation eucalypts**. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research, 1995. 110 p. (ACIAR. Monograph, 31).

DIONEX. **Analysis of carbohydrates by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD)**. Atlanta: Dionex, 2000. 14 p. (DIONEX. Technical Note, 20).

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; VAN WYK, G. Mass vegetative propagation. In: _____. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1994. p. 228–246.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Programa SOC - software científico: versão 2.1**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 1990.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. NUNES, M.E.T. (Trad.). Londrina: Editora Planta, 2004. 403 p.

FLORIANI, M.M.P.; STEFFENS, C.A.; CHAVES, D.M. Rustificação de plantas de *Eucalyptus dunnii* Maiden e a relação entre as concentrações de carboidratos solúveis totais e de prolina foliar e a tolerância ao frio. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 1, p. 21–29, 2011. DOI: 10.1590/S0100-67622011000100003

GHNAYA, A.B.; HOURMANT, A.; CERANTOLA, S.; KERVAREC, N.; CABON, J.Y., BRANCHARD, M.; CHARLES, G. Influence of zinc on soluble carbohydrate and free amino acid levels in rapeseed plants regenerated *in vitro* in the presence of zinc. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, n. 2, p. 191-197, 2010. DOI: 10.1007/s11240-010-9721-9

GIANFAGNA, T. Natural and synthetic growth regulators and their use in horticultural and agronomic crops. In: DAVIES, J. (Ed.). **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 751-773.

GRAÇA, M.E.C.; SHIMIZU, J.Y.; TAVARES, F.R. Capacidade de rebrota e de enraizamento de *Eucalyptus benthamii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 39, p. 135–138, 1999.

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

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N. **Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de *Eucalyptus***. Piracicaba: IPEF, 2002. 21 p. (IPEF. Circular Técnica, 194).

_____. Monitoramento nutricional e fertilização em macro, mini e microjardim clonal de *Eucalyptus*. In: GONÇALVES, J.L.M.; BENEDETTI, V. (Eds.). **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2005. p. 191–217.

ISHIHARA, A.; MATSUDA, F.; MIYAGAWA, H.; WAKASA, K. Metabolomics for metabolically manipulated plants: effects of tryptophan overproduction. **Metabolomics**, Boston, v. 3, n. 3, p. 319–334, 2007. DOI: 10.1007/s11306-007-0072-4

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

KERSTEN, E.; LUCCHESI, A.A.; GUTIERREZ, L.E. Efeitos do boro e zinco no teor de carboidratos solúveis, aminoácidos totais e no enraizamento de estacas de ramos de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, n. 1, p. 13–18, 1993. DOI: 10.1590/S0103-90161993000100003

KOMATSU, Y.H.; BATAGIN-PIOTTO, K.D.; BRONDANI, G.E.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. *In vitro* morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides*. **Journal of Forestry Research**, Harbin, v. 22, n. 2, p. 209–215, 2011. DOI: 10.1007/s11676-011-0152-1

KUMAR, A.; SOOD, A.; PALNI, L.M.S.; GUPTA, A.K. *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort.: synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 57, n. 2, p. 105–112, 1999. DOI: 10.1023/A:1006373314814

LEITE, S.M.M.; MARINO, C.L.; BONINE, C.A.V. Respostas de clones de *Eucalyptus grandis* e *E. grandis* x *E. urophylla* à supressão de boro. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 85, p. 19–25, 2010.

LEITE, S.M.M.; VALLE, C.F.; BONINE, C.A.V.; MARINO, C.L. Boron influence on concentration of polyols and other sugars in *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 5, p. 815–820, 2008. DOI: 10.1590/S0100-67622008000500005

LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 32, n. 2/3, p. 219–230, 2000. DOI: 10.1023/A:1010746806891

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201 p.

MALTA, M.R.; FURTINI NETO, A.E.; ALVES, J.D.; GUIMARÃES, P.T.G. Efeito da aplicação de zinco via foliar na síntese de triptofano, aminoácidos e proteínas solúveis em mudas de cafeeiro. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 14, n. 1, p. 31–37, 2002. DOI: 10.1590/S1677-04202002000100004

MEDEIROS, J.F.; BELTRÃO, N.E.M.; MEDEIROS, J.C. Boro no metabolismo vegetal e adubação boratada no algodoeiro herbáceo. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 7, n. 2/3, p. 743–752, 2003.

MINDÉLLO NETO, U.R. Enraizamento de estacas de pessegueiro em função do uso de ácido indolbutírico e fertilizante orgânico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 92–94, 2005. DOI: 10.1590/S0100-29452005000100025

MSTAT. **Statistical program**. Michigan, USA: Michigan State University, Crop and Soil Department Science, 1994.

MUJIU, L.; ARNOLD, R.; BOHAI, L.; MINSHENG, Y. Selection of cold-tolerant eucalypts for Hunan Province. In: TURNBULL, J.W. (Ed.). **Eucalypts in Asia**: proceedings of a international conference held in Zhanjiang, Guangdong, people's Republic of China. Canberra: Elect Printing, 2003. p. 107–116. (ACIAR. Proceedings, 111).

MÜLLER, A.; WEILER, E.W. IAA-synthase, an enzyme complex from *Arabidopsis thaliana* catalyzing the formation of indole-3-acetic acid from (S)-tryptophan. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 381, n. 8, p. 679–686, 2000. DOI: 10.1515/BC.2000.088

MÜLLER, A.; DÜCHTING, P.; WEILER, E.W. A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, Berlin, v. 216, n. 1, p. 44–56, 2002. DOI: 10.1007/s00425-002-0866-6

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

PAVLINOVA, O.A.; BALAKHONTSEV, E.N.; PRASOLOVA, M.F.; TURKINA, M.V. Sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase, and invertase in sugar beet leaves. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 49, n. 1, p. 68–73, 2002. DOI: 10.1023/A:1013712311720

POLLMANN, S.; DÜCHTING, P.; WEILER, E.W. Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. **Phytochemistry**, New York, v. 70, n. 4, p. 523–531, 2009. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.01.021

RAGONEZI, C.; KLIMASZEWSKA, K.; CASTRO, M.R.; LIMA, M.; OLIVEIRA, P.; ZAVATTIERI, M.A. Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors. **Trees - Structure and Function**, Berlin, v. 24, n. 6, p. 975–992, 2010. DOI: 10.1007/s00468-010-0488-8

ROSA, L.S.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; REISSMANN, C.B. Efeito da dose de nitrogênio e de formulações de substratos na miniestaquia de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1025–1035, 2009. DOI: 10.1590/S0100-67622009000600005

RUBIO, V.; BUSTOS, R.; IRIGOYEN, M.L.; CARDONA-LÓPEZ, X.; ROJAS-TRIANA, M.; PAZ-ARES, J. Plant hormones and nutrient signaling. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 361–373, 2009. DOI: 10.1007/s11103-008-9380-y

SAKYA, A.T.; DELL, B.; HUANG, L. Boron requirements for *Eucalyptus globulus* seedlings. **Plant and Soil**, The Hague, v. 246, n. 1, p. 87–95, 2002. DOI: 10.1023/A:1021589029492

SAN-FRANCISCO, S.; HOUDUSSE, F.; ZAMARREÑO, A.M.; GARNICA, M.; CASANOVA, E.; GARCÍA-MINA, J.M. Effects of IAA and IAA precursors on the development, mineral nutrition, IAA content and free polyamine content of pepper plants cultivated in hydroponic conditions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 38–52, 2005. DOI: 10.1016/j.scienta.2005.03.006

SCHWAMBACH, J.; RUEDELL, C.M.; ALMEIDA, M.R.; PENCHEL, R.M.; ARAÚJO, E.F.; FETT-NETO, A.G. Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* x *maidennii* mini-cuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. **New Forests**, Dordrecht, v. 36, n. 3, p. 261–271, 2008. DOI: 10.1007/s11056-008-9099-2

SGARBI, F.; SILVEIRA, R.L.V.A.; TAKAHASHI, E.N.; CAMARGO, M.A.F. Crescimento e produção de biomassa de clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em condições de deficiência de macronutrientes, B e Zn. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 56, p. 69–82, 1999.

SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N.; KRÜGNER, T.L. Estado nutricional de *Eucalyptus citriodora* Hook cultivado sob diferentes doses de boro e sua relação com a agressividade de *Botryosphaeria ribis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 53, p. 57–70, 1998.

SILVEIRA, R.L.V.A.; MOREIRA, A.; HIGASHI, E.N. Crescimento e sobrevivência de mudas de eucalipto sob doses de boro cultivadas em condições de viveiro e de campo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 366–371, 2004. DOI: 10.1590/S1413-70542004000200017

SILVEIRA, R.L.V.A.; MOREIRA, A.; TAKASHI, E.N.; SGARBI, F.; BRANCO, E.F. Sintomas de deficiência de macronutrientes e de boro em clones híbridos de *Eucalyptus grandis* com *Eucalyptus urophylla*. **Cerne**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 107–116, 2002.

SILVEIRA, R.L.V.A.; TAKAHASHI, E.N.; SGARBI, F.; CAMARGO, M.A.F.; MOREIRA, A. Crescimento e estado nutricional de brotações de *Eucalyptus citriodora* sob doses de boro em solução nutritiva. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 57, p. 53–67, 2000.

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

STAPE, J.L.; GONÇALVES, J.L.M.; GONÇALVES, A.N. Relationships between nursery practices and field performance for *Eucalyptus* plantations in Brazil. **New Forests**, Dordrecht, v. 22, n. 1/2, p. 19–41, 2001. DOI: 10.1023/A:1012271616115

STENVALL, N.; PIISILÄ, M.; PULKKINEN, P. Seasonal fluctuation of root carbohydrates in hybrid aspen clones and its relationship to the sprouting efficiency of root cuttings. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 39, n. 8, p. 1531–1537, 2009. DOI: 10.1139/X09-066

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

TITON, M.; XAVIER, A.; REIS, G.G.; OTONI, W.C. Eficiência das minicepas e microcepas na produção de propágulos de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 619–625, 2003.

TORRES, A.G.M. **Relação entre sazonalidade, desrama e carboidratos no crescimento do eucalipto na propagação vegetativa por miniestaquia**. 2003. 65 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

TREVISAM, R. **Atuação de concentrações de boro na morfogênese de *Eucalyptus urophylla* cultivados *in vitro***. 2001. 85 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

_____. **Análises histológicas e bioquímicas em calos de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake cultivados *in vitro* sob interação nutricional de boro e cálcio**. 2005. 167 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

VEYRES, N.; DANON, A.; AONO, M.; GALLIOT, S.; KARIBASAPPA, Y.B.; DIET, A.; GRANDMOTTET, F.; TAMAOKI, M.; LESUR, D.; PILARD, S.; BOITEL-CONTI, M.; SANGWAN-NORREEL, B.S.; SANGWAN, R.S. The *Arabidopsis* sweetie mutant is affected in carbohydrate metabolism and defective in the control of growth, development and senescence. **The Plant Journal**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 665–686, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03541.x

WENDLING, I. **Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia**. 1999. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Miniestaquia seriada no rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 4, p. 475–480, 2003. DOI: 10.1590/S0100-204X2003000400005

_____. Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 921–930, 2005.

WENDLING, I.; XAVIER, A.; PAIVA, H.N. Influência da miniestaquia seriada no vigor de minicepas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 611–618, 2003. DOI: 10.1590/S0100-67622003000500003

WIT ONDAS, H.W.; BRONDANI, G.E.; FIGUEIREDO, C.R.F.; ALMEIDA, C.V.; ALMEIDA, M. Exposição ao frio e análise histológica no enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 17., 2009, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: FMVZ, 2009. 1 CD-ROM.

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

3 ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE *Eucalyptus benthamii*: EFEITO DO GENÓTIPO, APLICAÇÃO DE AIB, ZN, B E COLETAS DE BROTAÇÕES

Resumo

O *Eucalyptus benthamii* é uma espécie de grande interesse para a composição de plantios florestais homogêneos, contudo ainda não existe protocolo eficiente para a indução da rizogênese em propágulos. Devido a essa problemática, poucos avanços foram conquistados na área de propagação da espécie, dificultando sobremaneira a obtenção de mudas clonais visando atender a demanda comercial. Objetivou-se avaliar o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* em relação ao genótipo, concentrações de Zn e B, coleta de brotações e aplicação de AIB. As brotações para a confecção das miniestacas foram oriundas de minicepas (clones BP101, BP118 e BP120) fertirrigadas com soluções nutritivas variando nas concentrações de Zn e B (S1 – isento de Zn e B, S2 – 0,5 mg L⁻¹ de Zn, S3 – 0,5 mg L⁻¹ de B, S4 – 0,5 mg L⁻¹ de Zn e B, S5 – 1,0 mg L⁻¹ de Zn e B, S6 – 2,0 mg L⁻¹ de Zn e B), sendo realizadas oito coletas de brotações do minijardim clonal. Em cada coleta de brotações, a região basal da miniestaca foi imersa durante 10 segundos em solução contendo 2.000 mg L⁻¹ de AIB, sendo uma solução isenta de AIB utilizada como controle. Ao longo do experimento avaliaram-se a sobrevivência das miniestacas na saída da casa de vegetação, na saída da casa de sombra e em área de pleno sol. Em área de pleno sol foram avaliadas apenas as miniestacas enraizadas, e destas, o comprimento total do sistema radicial. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x8x6x2) com parcelas subdivididas no tempo, contendo cinco repetições de 10 a 20 miniestacas por repetição. O enraizamento em miniestacas de *Eucalyptus benthamii* dependeu do material genético, da coleta de brotações, da aplicação de AIB e de concentrações de Zn e B. A porcentagem de enraizamento foi baixa, sendo que os materiais genéticos foram considerados de difícil propagação pela miniestaquia. Em termos gerais, as minicepas fertirrigadas com as soluções nutritivas S5 (1,0 mg L⁻¹ de Zn e B) e S6 (2,0 mg L⁻¹ de Zn e B) associadas a presença de AIB na concentração de 2.000 mg L⁻¹ apresentaram os maiores índices de enraizamento.

Palavras-chave: Miniestaquia; Rizogênese; Clonagem; Ácido indolbutírico; Minijardim clonal

Abstract

Eucalyptus benthamii is a species of interest to the composition of homogeneous forest plantations, but there is no effective protocol for induction of adventitious rooting in propagules. Due to this problem, few advances have been obtained in the clonal breeding of this species, difficulting the clone production to meet the commercial demand. The aim of this study was to evaluate the induction of adventitious rooting in *Eucalyptus benthamii* mini-cuttings regarding to genotype, Zn and B concentrations, shoot collections and IBA application. Shoots for the preparation of mini-cuttings were collected from mini-stumps (BP101, BP118 and BP120 clones) fertigated with nutrient solutions containing different concentrations of Zn and B (S1 – free of Zn and B, S2 – 0.5 mg L⁻¹ Zn, S3 – 0.5 mg L⁻¹ B, S4 – 0.5 mg L⁻¹ Zn and B, S5 – 1.0 mg L⁻¹ Zn and B, S6 – 2.0 mg L⁻¹ Zn and B). Eight shoot collections of the clonal mini-garden were performed. The basal portion of the mini-cuttings was immersed for 10 seconds in a solution containing 2,000 mg L⁻¹ IBA. A free IBA solution was used as control. The mini-cuttings survival in greenhouse, shade-house and in full sun area were evaluated. In full sun area, only the rooted mini-cuttings were evaluated, and of

these, the total length of the root system was measured. The experiment was conducted in completely randomized design in factorial arrangement (3x8x6x2) with split-plot in time, containing five replications of 10 at 20 mini-cuttings per replication. The adventitious rooting of *Eucalyptus benthamii* mini-cuttings depended of the genotype, Zn and B concentrations, shoots collections and IBA application. In general, the adventitious rooting percentage was low, and the genotypes were considered of difficult propagation by mini-cuttings technique. The mini-stumps fertigated with nutrient solutions S5 (1.0 mg L⁻¹ Zn and B) and S6 (2.0 mg L⁻¹ Zn and B) associated with the presence of IBA in the concentration of 2,000 mg L⁻¹ presented the greater adventitious rooting percentage.

Keywords: Mini-cutting technique; Rhizogenesis; Cloning; Indolbutiric acid; Clonal mini-garden

3.1 Introdução

A clonagem em larga escala do *Eucalyptus* iniciou-se em 1975 na República Popular do Congo (DELWAULLE; LAPLACE; QUILLET, 1983), sendo introduzida no Brasil no final da década de 70 (CAMPINHOS; IKEMORI, 1983). O desenvolvimento das técnicas de multiplicação clonal permitiu a manutenção das características genéticas da planta-mãe, o que proporcionou rápido crescimento e homogeneidade da produção (FERREIRA et al., 2004; SCHWAMBACH et al., 2008). De modo geral, as vantagens da clonagem estão relacionadas a uniformidade dos plantios, adaptações dos clones específicos para determinados sítios e maximização da produção de madeira em quantidade e qualidade adequadas para diversas finalidades, em comparação aos plantios florestais que são formados a partir de mudas produzidas por sementes (ALFENAS et al., 2004; HARTMANN et al., 2011; SCHWAMBACH et al., 2008; STAPE; GONÇALVES; GONÇALVES, 2001).

Em relação a rizogênese de propágulos, a técnica de miniestaquia é a mais utilizada pelas grandes empresas florestais para a clonagem de genótipos selecionados de *Eucalyptus*, possibilitando consideráveis ganhos de produtividade decorrentes do aumento dos índices de enraizamento e da redução do tempo na formação da muda (STAPE; GONÇALVES; GONÇALVES, 2001; TITON; XAVIER; OTONI, 2002) em comparação com a estaquia (ALFENAS et al., 2004).

A miniestaquia pode ser dividida nas fases de produção de brotos em minijardim clonal, indução do enraizamento adventício em casa de enraizamento sob nevoeiro intermitente e temperatura elevada, aclimatação à sombra, crescimento e rustificação (ALFENAS et al., 2004). A fundamentação teórica dessa técnica está baseada na seleção de clones de alta produtividade, que são selecionados em avaliações de testes clonais para, posteriormente,

proceder a propagação clonal em larga escala (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009). Contudo, existem espécies consideradas de difícil enraizamento, tal como o *Eucalyptus benthamii* (BRONDANI; GONÇALVES; ALMEIDA, 2010; GRAÇA; SHIMIZU; TAVARES, 1999; SILVA, 2008; WIT ONDAS et al., 2010), que apesar de ser uma espécie de grande interesse para a composição de plantios florestais homogêneos em regiões mais frias (JOVANOVIĆ; BOOTH, 2002; MUJIU et al., 2003; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006), ainda não existe protocolo eficiente para a obtenção em larga escala de mudas clonadas em nível comercial, o que limita avanços na área de melhoramento florestal da espécie.

Em sistemas de minijardim clonal os nutrientes são fornecidos, preferencialmente, por gotejamento a cada minicepa, regulando a vazão e concentração de nutrientes para garantir a produção de brotações com qualidade nutricional adequada (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2002). Seguindo esse princípio, Cunha; Wendling e Souza Junior (2005) avaliaram a produção e sobrevivência de minicepas de *Eucalyptus benthamii* conduzidas em sistemas de minijardins clonais em hidroponia e tubete. Os autores concluíram que ambos os tipos de manejo (tubete e hidroponia) foram tecnicamente viáveis para a produção de brotações para a confecção de miniestacas durante todo o ano. Contudo, o efeito da composição da solução nutritiva em relação aos índices de enraizamento não foi avaliado.

Segundo Higashi; Silveira e Gonçalves (2002) não existe uma solução nutritiva padrão que possa ser aplicada para todas as espécies florestais em condições de cultivo intensivo. Os nutrientes necessários para o desenvolvimento são os mesmos, porém as quantidades exigidas para cada espécie são diferenciadas. Nesse sentido, o Zn e B são micronutrientes que se destacam em relação a rizogênese de propágulos, sendo essenciais para diversas rotas metabólicas (CUNHA et al., 2009; LI et al., 2009; SOUZA; PEREIRA, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2009) e suas concentrações na solução nutritiva utilizada para a fertirrigação de minijardins clonais, se controladas adequadamente, podem influenciar a predisposição ao enraizamento (ALFENAS et al., 2004; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2002; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2005).

A indução da rizogênese em propágulos envolve inúmeras interações entre eventos fisiológicos e ambientais, tais como a atividade enzimática (BASAK; DAS; DAS, 2000), sazonalidade (FORD et al., 2002), temperatura, tipos de propágulos, substrato, luminosidade, umidade, oxigênio, nutrientes minerais (HARTMANN et al., 2011), material genético, presença de inibidores, aspectos nutricionais, fotoperíodo (ALFENAS et al., 2004), assim como, a expressão de determinados genes (DAI; CHENG; SARGENT, 2004; DEAN;

CASSON; LINDSEY, 2004). Contudo, os fatores influentes à rizogênese de *Eucalyptus* ainda não estão totalmente compreendidos (ALFENAS et al., 2004), principalmente em relação as espécies consideradas de difícil enraizamento, como os *Eucalyptus* subtropicais.

De acordo com a literatura, aplicações exógenas de reguladores de crescimento promovem efeitos positivos à rizogênese em espécies difíceis de enraizar, sendo que o ácido indolbutírico (AIB) é o mais utilizado nos sistemas de produção em larga escala de mudas clonais, variando em suas formas de aplicação, como veiculado em talco e líquido (ALMEIDA et al., 2007; BRONDANI, 2008; BRONDANI et al., 2010a; BRONDANI; GONÇALVES; ALMEIDA, 2010; WENDLING et al., 2000; WENDLING; XAVIER, 2005b) ou via gel (BRONDANI et al., 2008). A preferência pelo uso do ácido indolbutírico em termos operacionais está relacionado a sua maior estabilidade química em comparação com o ácido indolacético (AIA), mantendo sua atividade por maior intervalo de tempo (GIANFAGNA, 1995).

As concentrações de AIB para induzir a rizogênese variam muito entre as espécies de *Eucalyptus* (ALMEIDA et al., 2007; BRONDANI et al., 2010a; BRONDANI et al., 2010b; CORRÊA; FETT-NETO, 2004; FOGAÇA; FETT-NETTO, 2005; TITON et al., 2003; WENDLING et al., 2000), sendo necessário estabelecer concentrações ideais de acordo com cada situação de manejo no viveiro e tipo de material genético.

Com base no exposto, o presente trabalho apresenta as seguintes hipóteses e objetivos:

3.1.1 Hipótese

- A indução do enraizamento em miniestacas varia de acordo com o material genético, concentrações de Zn e B, coleta de brotações e aplicação de AIB.

3.1.2 Objetivo

- Avaliar a indução do enraizamento em miniestacas em relação ao material genético, concentrações de Zn e B, coleta de brotações e aplicação de AIB.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Caracterização geral

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia das Árvores e Viveiro Florestal, ambos pertencentes ao Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

3.2.2 Constituição do minijardim clonal

Mudas clonais identificadas como BP101, BP118 e BP120 dos genótipos superiores de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage foram utilizadas para a instalação dos experimentos. As plantas matrizes foram provenientes de teste de progênies com dois anos e seis meses de idade, o qual foi estabelecido no espaçamento 2,0 x 3,0 m em Concórdia-SC. O lote de sementes foi adquirido da população base genética de *Eucalyptus benthamii* da Embrapa Florestas-CNPQ, Colombo-PR.

As unidades experimentais foram compostas por mudas clonais propagadas pelo processo de miniestaquia com aplicação de 2.000 mg L⁻¹ de AIB e cultivadas em vasos plásticos (18 x 16 x 45 cm) com duas aberturas na porção inferior (Figura 1 A). O substrato foi composto por areia, fração fina (0,10 mm < diâmetro de partícula < 0,25 mm), o qual foi peneirado (peneira de malha 3 mm), lavado com água deionizada por cinco vezes e autoclavado durante 20 minutos a 121°C ($\approx 1,0 \text{ kgf cm}^{-2}$), a fim de erradicar plantas daninhas e patógenos, como fungos e bactérias. Previamente ao plantio das mudas nos vasos, procedeu-se a lavagem do sistema radicular das mudas com água deionizada durante 10 minutos, com a finalidade de lixiviar nutrientes e demais componentes aderidos.

Os vasos foram suspensos por grades metálicas a 85 cm do solo, sendo plantadas seis mudas por vaso no espaçamento 10 x 8 cm, os quais foram compostos por duas mudas de cada clone dispostas sequencialmente. Após sete dias efetuou-se a quebra do caule das mudas a 10 cm acima da porção basal, com a finalidade de reduzir a dominância apical e favorecer o crescimento de brotações axilares, as quais foram emitidas aos 21 dias após a quebra do caule (Figura 1 B).



Figura 1 - Unidade experimental para a constituição do minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii*. (A) detalhe do vaso contendo areia fina; (B) detalhe da indução de brotações axilares pela quebra do caule aos 21 dias; (C) disposição dos vasos contendo as minicepas aos 50 dias; (D) minicepas emitindo brotações aptas para a coleta aos 50 dias

Para a formação das minicepas, foi realizada poda da parte aérea a 7 cm acima da base da muda, aos 15 dias após a quebra do caule, conforme metodologia descrita por Brondani (2008), constituindo o minijardim clonal em sistema de vaso (Figura 1 C-D).

3.2.3 Manejo das minicepas

O minijardim clonal foi instalado em condições de casa de vegetação recoberta com polietileno transparente e composta por dois sistemas de ventiladores, sendo que os dados da temperatura do ar foram coletados diariamente (Anexo A). A cada sete dias adicionou-se 100 mL de solução nutritiva básica por minicepa (Tabela 1), sendo realizada irrigação com água deionizada diariamente, visando suprir a perda excessiva por evapotranspiração. A cada semana foi realizada lavagem da areia com água deionizada para evitar o excesso de salinização.

Tabela 1 - Composição da solução nutritiva básica para a fertirrigação do minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii*

Nutriente	Solução Nutritiva* (mg L ⁻¹)	
N-NO ₃ ⁻	60,00	
N-NH ₄ ⁺	30,00	
P	12,00	
Ca	40,00	
K	80,00	
S	10,00	
Mg	12,00	
Cu	0,10	
Fe	2,00	
Mo	0,02	
Mn	1,60	
Fonte de Macro e Micronutriente	FQ / PM (mg L ⁻¹)	
Nitrato de potássio (Nuclear [®])	KNO ₃ / 101,10	206,85
Monoamônio fostato (Mallinckrodt [®])	NH ₄ H ₂ PO ₄ / 115,03	44,57
Nitrato de amônio (Reagex [®])	NH ₄ NO ₃ / 80,04	140,50
Cloreto de cálcio (Synth [®])	CaCl ₂ .2H ₂ O / 147,02	111,13
Nitrato de cálcio (Labsynth [®])	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O / 236,15	57,18
Cloreto de magnésio (Synth [®])	MgCl ₂ .6H ₂ O / 203,30	50,46
Sulfato de magnésio (Mallinckrodt [®])	MgSO ₄ .7H ₂ O / 246,48	60,49
Sulfato de manganês (Ecibra [®])	MnSO ₄ .H ₂ O / 169,01	4,9223
Sulfato de cobre (Mallinckrodt [®])	CuSO ₄ .5H ₂ O / 249,68	0,3929
Sulfato de ferro (Synth [®])	FeSO ₄ .7H ₂ O / 278,02	9,9520
Sódio - EDTA (Nuclear [®])	Na ₂ -EDTA.2H ₂ O / 372,24	13,3110
Molibdato de sódio (Merck [®])	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O / 241,95	0,0504

* O pH foi ajustado para 6,2 a 25°C com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH), ambos a 1M. FQ = fórmula química, PM = peso molecular

3.2.4 Coleta das brotações e preparo das miniestacas

As brotações foram coletadas de modo seletivo, com intervalos variados de acordo com a padronização da produção, preferencialmente pelo turno matinal. As brotações que apresentaram comprimento inferior a 3 cm e a dois pares de gemas foram mantidas para as coletas posteriores. No instante da coleta, as brotações foram armazenadas em caixas de isopor contendo água deionizada, visando manter a turgescência celular pela perda do potencial hídrico após a abscisão. As miniestacas foram preparadas com um corte reto na região basal, mantendo-se o ápice. Cada miniestaca teve um comprimento médio de 7 cm (\pm 2 cm) contendo a ponteira com dois pares de folhas reduzida a 50% da sua área total e dois pares de gemas sem as folhas na porção inferior (Figura 2 A-B).

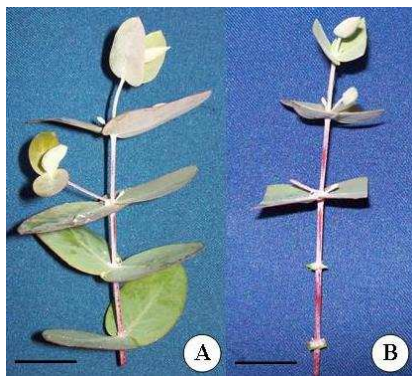


Figura 2 - Detalhe do preparo das miniestacas de *Eucalyptus benthamii*. (A) brotação contendo quatro pares de gemas e a ponteira; (B) miniestaca padronizada. Barra = 1,5 cm

3.2.5 Tratamentos e delineamento experimental

3.2.5.1 Variação de Zn e B na solução nutritiva

Como tratamentos foram aplicados diferentes concentrações de zinco (Zn) e boro (B), os quais foram fornecidos por meio de solução nutritiva (Tabela 2). O experimento foi conduzido com base na solução nutritiva apresentada na Tabela 1, variando somente as concentrações dos elementos Zn e B de acordo com as combinações apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Combinação das concentrações de Zn e B para a composição das soluções nutritivas

Solução Nutritiva	Zn ⁽¹⁾ (mg L ⁻¹)	B ⁽²⁾ (mg L ⁻¹)
S1	0,00	0,00
S2	0,50	0,00
S3	0,00	0,50
S4	0,50	0,50
S5	1,00	1,00
S6	2,00	2,00

⁽¹⁾ Fornecido na forma de sulfato de zinco (Mallinckrodt® / ZnSO₄.7H₂O / 287,54). ⁽²⁾ Fornecido na forma de ácido bórico (Ecibra® / H₃BO₃ / 61,83)

3.2.5.2 Aplicação de AIB

No total foram realizadas oito coleta de brotações das minicepas. Em cada coleta de brotações, a região basal da miniestaca (Figura 2 A-B) foi imersa durante 10 segundos em solução hidroalcoólica (1:1, água:álcool, v/v) nas concentrações de 0 (isento de AIB) e 2.000 mg L⁻¹ de AIB. Ao longo do experimento avaliou-se a sobrevivência das miniestacas na saída da casa de vegetação (SCV), na saída da casa de sombra (SCS) e em área de pleno sol (EPS). Em área de pleno sol (EPS) foram avaliadas apenas as miniestacas enraizadas, e destas, o comprimento total do sistema radicial a partir do software SIARCS (EMBRAPA, 1996). O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x8x6x2) com parcelas subdivididas no tempo, sendo os fatores constituídos por três clones

(BP101, BP118 e BP120), oito coletas de brotações, seis combinações de Zn e B (Tabela 2), na ausência e presença de AIB (0 e 2.000 mg L⁻¹), com cinco repetições contendo de 10 a 20 miniestacas por repetição.

3.2.6 Condições de enraizamento

As miniestacas foram inseridas a 2 cm de profundidade em substrato composto pela mistura de vermiculita média e Basaplant Florestal[®] (composição: casca de pinus, fibra de coco, turfa fibrosa, vermiculita, adubação inicial com NPK e micronutrientes) (2:1, v/v). Não foi realizada adubação de incorporação. Como recipiente de cultivo utilizou-se tubete cônico (55 cm³), que foi previamente desinfestado com solução contendo hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,25% de cloro ativo (v/v) por 48 horas. Para o enraizamento, as miniestacas permaneceram entre 35 a 42 dias em casa de vegetação automatizada com nebulização intermitente. Os dados da temperatura do ar referente a casa de vegetação utilizada para o enraizamento dos propágulos foram coletados diariamente (Anexo B). Após, as miniestacas foram transferidas para casa de sombra coberta com sombrite de 50% para aclimação, onde permaneceram por 14 a 21 dias. O sistema de microaspersão funcionou com pressão de água da rede (2,0 kg cm⁻²) o qual foi controlado por timer em intervalos pré-estabelecidos. Após o processo de aclimação, as miniestacas foram transferidas para uma área de pleno sol, visando a rustificação e crescimento por 30 dias. O sistema de aspersão teve as mesmas características do utilizado durante a fase de aclimação. Da fase de aclimatização referente a casa de sombra até a avaliação em área de pleno sol, as miniestacas receberam fertirrigação semanal com a solução nutritiva básica (Tabela 1), acrescida de 0,1 mg L⁻¹ de Zn e 0,1 mg L⁻¹ de B.

3.2.7 Análise estatística dos dados

Os dados mensurados de todos os experimentos foram submetidos ao teste de Hartley ($P < 0,05$) e Lilliefors ($P < 0,05$) e transformados quando necessário. Em seguida, foi realizada análise de variância (ANOVA, $P < 0,01$ e $P < 0,05$). De acordo com a significância da ANOVA, os dados dos fatores qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Realizou-se análise de correlação de Pearson ($P < 0,01$ e $P < 0,05$) dos dados ambientais com as variáveis mensuradas. Utilizaram-se os pacotes SOC (EMBRAPA, 1990) e STATISTICAL PROGRAM (MSTAT, 1994) para a análise estatística dos dados.

3.3 Resultados

De acordo com a análise de variância houve interação significativa entre a coleta de brotações, clone, solução nutritiva e regulador de crescimento para a sobrevivência na saída da casa de vegetação (SCV), sobrevivência na saída da casa de sombra (SCS), enraizamento em área a pleno sol (EPS) e comprimento total do sistema radicial (CTSR) de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* (Tabela 3).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para a sobrevivência na saída da casa de vegetação (SCV), sobrevivência na saída da casa de sombra (SCS), enraizamento em área de pleno sol (EPS) e comprimento total do sistema radicial (CTSR) de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* em relação ao tempo de coleta de brotações, clone, solução nutritiva e regulador de crescimento

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios			
		SCV ⁽¹⁾ (%)	SCS ⁽¹⁾ (%)	EPS ⁽¹⁾ (%)	CTSR ⁽²⁾ (cm miniestaca ⁻¹)
Coleta (COL)	7	5,5986**	15,2872**	8,1885**	12,2700**
Resíduo-COL	16	0,0565**	0,0509**	0,0406**	0,5563**
Parcela-COL	23	—	—	—	—
Clone (CLO)	2	1,5865**	4,1141**	5,6444**	21,3048**
Solução (SOL)	5	0,4882**	0,2727**	0,1908**	0,7919**
Regulador (REG)	1	1,6997**	0,0761 ^{ns}	0,0372 ^{ns}	3,1720**
COL*CLO	14	0,3589**	0,4095**	0,6164**	2,0498**
COL*SOL	35	0,4121**	0,2775**	0,2870**	1,6129**
COL*REG	7	0,2193**	0,7945**	0,7006**	0,4614**
CLO*SOL	10	0,0782**	0,1433**	0,0883**	2,0008**
CLO*REG	2	0,0766**	0,0222 ^{ns}	0,0423 ^{ns}	0,5867*
SOL*REG	5	0,1575**	0,0608**	0,0063 ^{ns}	0,2973 ^{ns}
COL*CLO*SOL	70	0,1509**	0,1391**	0,1305**	1,0819**
COL*CLO*REG	14	0,2252**	0,1438**	0,1647**	0,3749**
COL*SOL*REG	35	0,1466**	0,0773**	0,0427**	0,3623**
CLO*SOL*REG	10	0,0322 ^{ns}	0,0518**	0,0717**	1,2927**
COL*CLO*SOL*REG	70	0,1041**	0,0765**	0,0957**	0,4479**
Resíduo	576	0,0251	0,0210	0,0195	0,1882
Subparcela	863	—	—	—	—
Média	—	90,82	64,27	43,56	125,05
CV _{exp.} (%)	—	7,97	14,84	26,66	27,60

^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. * e ** Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. ⁽¹⁾ Dados em porcentagem transformados por $\arcsen(n/100)$ e ⁽²⁾ dados transformados por $(n/10)^{0,5}$, onde n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental

A sobrevivência das miniestacas na saída da casa de vegetação (SCV) apresentou variabilidade de resposta ao considerar cada clone dentro das coletas de brotações, soluções nutritivas e aplicação de regulador de crescimento para promover o enraizamento, o que denota a forte influência desses fatores quanto a sobrevivência das miniestacas durante a permanência em casa de vegetação (Tabela 4).

O clone BP101 não apresentou diferença significativa para a SCV durante a 2^a, 3^a e 6^a coletas de brotações em relação as soluções nutritivas e aplicação de AIB. Porém, durante as demais coletas de brotações, o clone BP101 apresentou diferença significativa para a SCV de acordo com a solução nutritiva e aplicação de AIB (Tabela 4).

O clone BP118 não apresentou diferença significativa para a SCV durante a 2^a, 3^a, 4^a, 5^a e 6^a coletas de brotações em relação as soluções nutritivas e aplicação de AIB. Porém, durante as demais coletas de brotações o clone BP118 apresentou diferença significativa para a SCV de acordo com a solução nutritiva e aplicação de AIB (Tabela 4).

Para o clone BP120, não foi constatada diferença significativa da SCV durante a 2^a, 3^a, 5^a e 6^a coletas de brotações em relação as soluções nutritivas e aplicação de AIB. Porém, durante as demais coletas de brotações o clone BP120 apresentou diferença significativa para a SCV de acordo com a solução nutritiva e aplicação de AIB (Tabela 4).

Considerando as coletas de brotações onde ocorreu diferença significativa para a SCV em relação a solução nutritiva e aplicação de AIB, as soluções S1 e S2 apresentaram as maiores diferenças de resposta, independente do clone avaliado. Além disso, o clone BP118 apresentou os maiores índices de SCV em comparação com dos clones BP101 e BP120, denotando que a SCV também dependeu das características genéticas dos materiais avaliados. Em termos gerais os valores da SCV foram adequados, sendo que a média geral foi de 90,8%, e a aplicação de AIB na concentração de 2.000 mg L⁻¹ favoreceu a SCV (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores médios da porcentagem de sobrevivência na saída da casa de vegetação de *Eucalyptus benthamii* em relação aos tratamentos avaliados

Coleta	Solução 1		Solução 2		Solução 3		Solução 4		Solução 5		Solução 6	
	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB
1ª	91,0±7,7 Aa	39,2±3,0 Cc	64,8±9,1 Bbcd	65,4±5,1 Bcd	74,4±11,6 Bab	86,3±14,3 Aab	91,0±7,7 ABa	66,8±9,1 Bbcd	91,6±7,2 Aa	51,7±9,9 Bcde	73,2±15,2 Babc	47,6±4,1 Bde
2ª	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	79,1±19,0 Aa	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 Aa	100,0±0,0 Aa	86,9±1,0 Aa	86,9±1,0 ABa	86,9±1,0 Aa
3ª	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa
4ª	66,6±8,2 Bb	66,6±8,2 Bb	100,0±0,0 Aa	71,4±14,2 BCb	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	66,6±21,8 Cb	80,9±8,2 ABab	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	85,7±14,2 ABab	100,0±0,0 Aa
5ª	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 Aab	73,8±2,0 BCb	91,0±7,7 Aab	91,6±7,2 ABab	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 ABab	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 Aab	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 ABab	100,0±0,0 Aa
6ª	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 ABa	91,0±7,7 Aa	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 ABa	100,0±0,0 Aa
7ª	86,9±1,0 ABab	91,6±7,2 Aa	39,2±3,0 Cd	61,3±10,7 Cc	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	65,4±5,1 Bbc	86,9±1,0 Aab	91,0±7,7 Aa	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 Aa
8ª	65,4±5,1 Bc	80,9±8,2 ABabc	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 ABab	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	73,8±2,0 BCbc	86,3±9,3 ABabc	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 Aab	86,9±1,0 ABabc	91,6±7,2 Aab

Coleta	Solução 1		Solução 2		Solução 3		Solução 4		Solução 5		Solução 6	
	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB
1ª	91,0±7,7 ABa	86,9±1,0 Aa	87,5±12,5 ABa	60,7±3,0 Cbc	77,3±21,5 Bab	66,0±18,1 Bb	65,4±5,1 Bb	35,1±9,1 Bde	86,9±1,0 Aa	22,0±8,4 Be	60,7±3,0 Bbc	47,6±4,1 Bcd
2ª	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 Aa
3ª	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa
4ª	100,0±0,0 Aa	85,7±0,0 Aa	95,2±8,2 ABa	95,2±8,2 ABa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	95,2±8,2 Aa	95,2±8,2 Aa	95,2±8,2 Aa	100,0±0,0 Aa	85,7±14,2 Aa	100,0±0,0 Aa
5ª	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa
6ª	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa
7ª	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 Aab	78,5±6,1 Bb	78,5±6,1 Bb	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 Aab	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa
8ª	77,9±8,4 Bb	86,9±1,0 Aab	91,0±7,7 ABab	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 ABab	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 Aab	91,6±7,2 Aab	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa

Coleta	Solução 1		Solução 2		Solução 3		Solução 4		Solução 5		Solução 6	
	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB
1ª	64,2±22,3 Bcde	86,9±1,0 ABabc	78,5±6,1 ABabc	73,2±15,2 Bbcd	91,0±7,7 Aab	100,0±0,0 Aa	47,6±4,1 Bef	48,8±23,2 Cef	78,5±6,1 Aabce	39,2±3,0 Cf	51,7±9,9 Bdef	73,8±2,0 Bbcd
2ª	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 ABa	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 ABa	100,0±0,0 Aa	87,5±12,5 Aa	91,6±7,2 Aa	91,0±7,7 ABa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa
3ª	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 Aa	87,5±12,5 Aa	87,5±12,5 Aa	77,9±8,4 ABa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 ABa
4ª	85,7±14,2 ABab	42,8±0,0 Cd	100,0±0,0 Aa	71,4±14,2 Bbc	80,9±8,2 Aab	57,1±5,0 Bcd	95,2±8,2 Aa	80,9±8,2 ABab	85,7±14,2 Aab	66,6±8,2 Bbc	95,2±8,2 Aa	85,7±14,0 ABab
5ª	100,0±0,0 Aa	77,9±8,4 ABa	100,0±0,0 Aa	86,9±1,0 ABa	77,9±8,4 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	87,5±12,5 Aa	91,0±7,7 Aa	91,6±7,2 Aa	100,0±0,0 Aa
6ª	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 ABa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 ABa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa
7ª	95,8±7,2 Aab	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 ABab	74,4±11,6 Bb	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa
8ª	86,9±1,0 ABab	73,8±2,0 Bb	74,4±11,6 Bb	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 Aab	91,6±7,2 Aab	86,9±1,0 Aab	73,8±2,0 Bb	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	86,9±1,0 ABab

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra minúscula e, nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. 0 AIB – isento de AIB (0 mg L⁻¹), 2.000 AIB – tratamento com AIB (2.000 mg L⁻¹). S1 - omissão de Zn e B, S2 - 0,5 mg L⁻¹ de Zn, S3 - 0,5 mg L⁻¹ de B, S4 - 0,50 mg L⁻¹ de Zn e B, S5 - 1,00 mg L⁻¹ de Zn e B, S6 - 2,00 mg L⁻¹ de Zn e B. Dados apresentados como: média ± desvio padrão

A sobrevivência das miniestacas na saída da casa de sombra (SCS) apresentou variabilidade de resposta ao considerar cada clone dentro das coletas de brotações, soluções nutritivas e aplicação de regulador de crescimento para promover o enraizamento (Tabela 5), semelhante ao observado durante a SCV (Tabela 4).

O clone BP101 não apresentou diferença significativa para a SCS durante a 3ª coleta de brotações em relação as soluções nutritivas e aplicação de AIB. Porém, durante as demais coletas de brotações, o clone BP101 apresentou diferença significativa para a SCS de acordo com a solução nutritiva e aplicação de AIB (Tabela 5).

O clone BP118 não apresentou diferença significativa para a SCS durante a 2ª e 3ª coletas de brotações em relação as soluções nutritivas e aplicação de AIB. Porém, durante as demais coletas de brotações o clone BP118 apresentou diferença significativa para a SCS de acordo com a solução nutritiva e aplicação de AIB (Tabela 5).

Semelhante ao observado para o clone BP118, o clone BP120 não apresentou diferença significativa da SCS durante a 2ª e 3ª coletas de brotações em relação as soluções nutritivas e aplicação de AIB. Porém, durante as demais coletas de brotações o clone BP120 apresentou diferença significativa para a SCS de acordo com a solução nutritiva e aplicação de AIB (Tabela 5).

Em termos gerais, pode-se observar que os maiores índices da SCS ocorreram até a 3ª coleta de brotações, sendo que a partir da 4ª coleta de brotações os índices diminuíram, independente do tratamento. Além disso, os valores da SCS foram reduzidos, denotando elevada sensibilidade das miniestacas de *Eucalyptus benthamii* às alterações ambientais (umidade relativa do ar, temperatura e irrigação) durante a fase de aclimação. A média geral da SCS foi de 64,3%, e a aplicação de AIB na concentração de 2.000 mg L⁻¹ favoreceu a SCS (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios da porcentagem de sobrevivência na saída da casa de minestacas de *Eucalyptus benthamii* em relação aos tratamentos avaliados

Coleta	Solução 1		Solução 2		Solução 3		Solução 4		Solução 5		Solução 6	
	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB
1ª	77,9±8,4 ABa	39,2±3,0 CDcd	51,7±9,9 Bbcd	52,3±4,1 BCDbcd	52,3±17,1 Bbcd	77,9±8,4 ABa	60,7±5,0 Babc	65,4±5,1 Bab	65,4±5,1 Bab	47,6±4,1 Cbcd	64,8±9,1 ABab	34,5±5,1 Dd
2ª	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	65,4±5,1 BCBc	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 Aa	86,9±1,0 ABab	91,6±7,2 Aa	86,9±1,0 ABab	60,7±3,0 BCc
3ª	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	80,9±8,2 ABab	52,3±8,2 BCBc	57,1±5,0 Bc	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	87,5±12,5 Aa	91,0±7,7 Aa
4ª	66,6±8,2 Bbc	66,6±8,2 Bbc	80,9±8,2 ABab	66,6±8,2 Bbc	80,9±8,2 ABab	48,2±9,9 CDabc	52,3±4,1 BCBc	52,3±4,1 BCBc	52,3±4,1 BCBc	64,8±9,1 Ba	66,6±8,2 ABbc	57,1±9,0 BCDc
5ª	39,2±3,0 Cbc	65,4±5,1 Ba	26,1±2,0 Cc	38,6±10,7 CDbc	26,1±2,0 Cc	48,2±9,9 CDabc	52,3±4,1 BCBc	52,3±4,1 BCBc	65,4±5,1 BCBc	64,8±9,1 Ba	47,6±4,1 BCBc	47,6±4,1 CDabc
6ª	39,2±3,0 Cbc	65,4±5,1 Ba	25,5±11,6 Ccde	34,5±5,1 BCBc	8,3±7,2 Dc	35,1±9,1 Dbcd	13,6±14,3 Dde	26,7±15,2 Ccde	47,6±4,1 BCBc	13,6±14,3 Dde	13,6±14,3 Dde	52,3±4,1 CDab
7ª	25,5±11,6 Cb	60,7±3,0 BCa	26,1±2,0 Cb	47,6±4,1 BCDab	34,5±5,1 BCBc	25,5±11,6 Dbc	39,2±3,0 BCBc	48,2±9,9 BCBc	48,2±9,9 BCBc	26,1±2,0 Cb	26,1±2,0 Cb	39,2±3,0 CDab
8ª	22,0±8,4 Cf	28,5±7,9 Def	52,3±4,1 Bbcd	60,7±3,0 BCabc	26,1±2,0 Cdf	38,6±10,7 Ddef	34,5±5,1 Ddef	52,3±4,1 Bbcd	51,7±9,9 Bcde	61,3±10,7 Cabc	73,2±15,2 Ab	77,9±8,4 ABa
CLONE BP101												
Solução 1												
1ª	91,0±7,7 ABa	74,4±11,6 ABCabc	78,5±6,1 ABab	51,7±9,9 Cbcd	77,3±21,5 ABab	61,3±10,7 Bbcd	61,3±10,7 BCBcd	22,0±8,4 Cc	73,8±2,0 Aabc	0 AIB	2.000 AIB	2.000 AIB
2ª	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 ABa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	33,9±18,1 Bde
3ª	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	86,3±14,3 ABa	86,9±1,0 ABa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 ABa	91,0±7,7 ABa	91,0±7,7 ABa	91,0±7,7 ABa	100,0±0,0 Aa
4ª	85,7±14,2 ABab	66,6±8,2 BCBc	71,4±5,0 ABCab	85,7±6,0 ABab	80,9±8,2 ABab	85,7±8,0 ABab	95,2±8,2 Aab	85,7±9,8 Aab	85,7±9,8 Aab	80,9±8,2 ABab	66,6±8,2 BCDb	100,0±0,0 Aa
5ª	65,4±5,1 Bab	86,9±1,0 ABCa	78,5±6,1 ABab	65,4±5,1 BCBc	60,7±3,0 BCBc	64,8±9,1 Bab	51,7±9,9 BCBc	78,5±6,1 ABab	86,9±1,0 Aa	86,9±1,0 Aa	75,0±25,0 ABCab	78,5±6,1 Aab
6ª	74,4±11,6 ABabc	73,8±2,0 ABCabc	52,3±4,1 BCDbc	65,4±5,1 BCBc	61,3±10,7 BCBc	86,9±1,0 ABa	65,4±5,1 BCBc	73,8±2,0 ABCabc	86,9±1,0 Aa	47,6±4,1 Bc	47,6±4,1 Bc	78,5±6,1 Aab
7ª	35,7±22,3 Ccd	61,9±24,1 CDabc	26,1±2,0 Dd	51,7±9,9 Cbcd	35,1±9,1 Ccd	74,4±11,6 ABab	39,8±16,2 Ccd	74,4±11,6 ABab	34,5±5,1 Bcd	86,9±1,0 Aa	39,2±3,0 Dcd	34,5±5,1 Bcd
8ª	26,1±2,0 Cf	34,5±5,1 Def	47,6±4,1 CDdef	51,7±9,9 Cdef	61,3±10,7 BCcde	65,4±5,1 Bbcd	73,8±2,0 ABCabc	87,5±12,5 ABab	77,9±8,4 Aabc	91,0±7,7 Aa	77,9±8,4 Aabc	91,6±7,2 Aa
CLONE BP118												
Solução 1												
1ª	91,0±7,7 ABa	74,4±11,6 ABCabc	78,5±6,1 ABab	51,7±9,9 Cbcd	77,3±21,5 ABab	61,3±10,7 Bbcd	61,3±10,7 BCBcd	22,0±8,4 Cc	73,8±2,0 Aabc	0 AIB	2.000 AIB	2.000 AIB
2ª	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 ABa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	33,9±18,1 Bde
3ª	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	86,3±14,3 ABa	86,9±1,0 ABa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 ABa	91,0±7,7 ABa	91,0±7,7 ABa	91,0±7,7 ABa	100,0±0,0 Aa
4ª	85,7±14,2 ABab	66,6±8,2 BCBc	71,4±5,0 ABCab	85,7±6,0 ABab	80,9±8,2 ABab	85,7±8,0 ABab	95,2±8,2 Aab	85,7±9,8 Aab	85,7±9,8 Aab	80,9±8,2 ABab	66,6±8,2 BCDb	100,0±0,0 Aa
5ª	65,4±5,1 Bab	86,9±1,0 ABCa	78,5±6,1 ABab	65,4±5,1 BCBc	60,7±3,0 BCBc	64,8±9,1 Bab	51,7±9,9 BCBc	78,5±6,1 ABab	86,9±1,0 Aa	86,9±1,0 Aa	75,0±25,0 ABCab	78,5±6,1 Aab
6ª	74,4±11,6 ABabc	73,8±2,0 ABCabc	52,3±4,1 BCDbc	65,4±5,1 BCBc	61,3±10,7 BCBc	86,9±1,0 ABa	65,4±5,1 BCBc	73,8±2,0 ABCabc	86,9±1,0 Aa	47,6±4,1 Bc	47,6±4,1 Bc	78,5±6,1 Aab
7ª	35,7±22,3 Ccd	61,9±24,1 CDabc	26,1±2,0 Dd	51,7±9,9 Cbcd	35,1±9,1 Ccd	74,4±11,6 ABab	39,8±16,2 Ccd	74,4±11,6 ABab	34,5±5,1 Bcd	86,9±1,0 Aa	39,2±3,0 Dcd	34,5±5,1 Bcd
8ª	26,1±2,0 Cf	34,5±5,1 Def	47,6±4,1 CDdef	51,7±9,9 Cdef	61,3±10,7 BCcde	65,4±5,1 Bbcd	73,8±2,0 ABCabc	87,5±12,5 ABab	77,9±8,4 Aabc	91,0±7,7 Aa	77,9±8,4 Aabc	91,6±7,2 Aa
CLONE BP120												
Solução 1												
1ª	60,1±16,2 Bcde	65,4±5,1 ABabc	78,5±6,1 ABab	64,8±9,1 ABCabc	73,2±15,2 ABabc	91,0±7,7 Aa	34,5±5,1 CDef	26,7±15,2 CDF	61,3±10,7 BCBcd	0 AIB	2.000 AIB	2.000 AIB
2ª	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 Aa	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 Aa	100,0±0,0 Aa	87,5±12,5 Aa	87,5±12,5 Aa	91,0±7,7 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	60,7±3,0 BCcde
3ª	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	77,3±21,5 Aa	87,5±12,5 Aa	73,8±2,0 ABa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	86,9±1,0 ABa	100,0±0,0 Aa
4ª	66,6±8,2 Bbc	52,3±8,2 BCBc	57,1±4,0 Bab	52,3±8,2 Cabc	42,8±6,7 BCBc	38,0±8,2 BCBc	71,4±14,2 ABa	66,6±8,2 ABab	66,6±8,2 Bab	52,3±8,7 BCBc	66,6±8,2 BCBc	71,4±10,2 ABCa
5ª	48,2±9,9 BCBc	39,2±3,0 BCbc	26,1±2,0 Cc	61,3±10,7 ABCcb	52,3±4,1 BCBc	60,7±3,0 ABab	26,1±2,0 Cc	48,2±9,9 BCBc	61,3±10,7 BCBc	73,8±2,0 ABa	26,1±2,0 Ec	52,3±4,1 BCBc
6ª	26,1±2,0 Cabc	34,5±5,1 Cabc	20,8±19,0 Cabc	8,0±0,0 Dc	25,5±11,6 Cabc	26,1±2,0 Cabc	12,5±12,5 Dbc	13,6±14,3 Dbc	27,3±28,6 Dabc	48,2±9,9 BCBc	34,5±5,1 DEab	48,2±9,9 Cc
7ª	25,0±8,6 Cd	65,4±5,1 ABab	26,1±2,0 Cd	60,7±3,0 BCBc	34,5±5,1 Ccd	39,2±3,0 BCBc	26,7±15,2 CDd	51,7±9,9 BCBc	34,5±5,1 CDcd	35,1±9,1 Cbcd	51,7±9,9 CDEabc	78,5±6,1 ABCa
8ª	22,0±8,4 Cc	25,5±11,6 Cc	22,0±8,4 Cc	61,3±10,7 ABCcb	52,3±4,1 BCBc	60,7±3,0 ABab	47,6±4,1 BCBc	73,8±2,0 ABCabc	73,8±2,0 ABCabc	86,9±1,0 Aa	60,7±3,0 BCDab	60,7±3,0 BCBc

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra minúscula e, nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. 0 AIB – isento de AIB (0 mg L⁻¹), 2.000 AIB – tratamento com AIB (2.000 mg L⁻¹). S1 - omissão de Zn e B, S2 - 0,5 mg L⁻¹ de Zn, S3 - 0,5 mg L⁻¹ de Zn, S4 - 0,50 mg L⁻¹ de Zn e B, S5 - 1,00 mg L⁻¹ de Zn e B, S6 - 2,00 mg L⁻¹ de Zn e B. Dados apresentados como: média ± desvio padrão

O enraizamento das miniestacas em área de pleno sol (EPS) também apresentou variabilidade de resposta ao considerar cada clone dentro das coletas de brotações, soluções nutritivas e aplicação de regulador de crescimento para promover o enraizamento (Tabela 6), semelhante ao observado durante a SCV e SCS.

O clone BP101 não apresentou diferença significativa para o EPS durante a 5ª e 6ª coletas de brotações em relação as soluções nutritivas e aplicação de AIB. Porém, durante as demais coletas de brotações, o clone BP101 apresentou diferença significativa para o EPS de acordo com a solução nutritiva e aplicação de AIB (Tabela 6).

O clone BP118 somente não apresentou diferença significativa para o EPS durante a 2ª coleta de brotações em relação as soluções nutritivas e aplicação de AIB. Porém, durante as demais coletas de brotações, o clone BP118 apresentou diferença significativa para o EPS de acordo com a solução nutritiva e aplicação de AIB (Tabela 6).

O clone BP120 não apresentou diferença significativa para o EPS durante a 4ª, 5ª e 6ª coletas de brotações em relação as soluções nutritivas e aplicação de AIB. Porém, durante as demais coletas de brotações, o clone BP120 apresentou diferença significativa para o EPS de acordo com a solução nutritiva e aplicação de AIB, em que, semelhante ao efeito observado para os clones BP101 e BP118, todas as soluções apresentaram grande variabilidade de respostas (Tabela 6).

Em termos gerais, os maiores valores da porcentagem de enraizamento foram observados até a 3ª coleta de brotações. Contudo, a partir da 4ª até a 8ª coleta de brotações os índices do EPS foram reduzidos, denotando perda da capacidade rizogênica ao longo do tempo. Além disso, os valores do EPS foram considerados reduzidos (média geral de 43,5%), denotando baixa porcentagem de enraizamento das miniestacas de *Eucalyptus benthamii*. As soluções S5 e S6 associadas a aplicação de AIB na concentração de 2.000 mg L⁻¹ favoreceram os maiores valores de enraizamento (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores médios da porcentagem de enraizamento em área a pleno sol de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* em relação aos tratamentos avaliados

Coleta	Solução 1		Solução 2		Solução 3		Solução 4		Solução 5		Solução 6	
	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB
1ª	51,7±9,9 Bbb	39,2±3,0 BCab	33,9±18,1 BCab	52,9±17,1 ABab	61,3±10,7 Aa	52,3±4,1 ABab	65,4±5,1 ABbc	60,7±3,0 BCab	52,3±4,1 BCab	34,5±5,1 BCab	39,2±3,0 ABab	26,1±2,0 Bb
2ª	86,9±10,0 Aa	52,3±4,1 Bbcd	65,4±5,1 ABabc	73,8±2,0 ABab	26,7±15,2 Bcd	64,8±9,1 ABbc	64,8±9,1 ABbc	64,8±9,1 ABbc	60,7±3,0 BCabc	25,5±11,6 Bcd	60,7±3,0 ABbc	39,8±16,2 ABcd
3ª	91,0±7,7 Aab	86,9±1,0 Aab	78,5±6,1 Aabc	86,9±1,0 Aab	51,7±9,9 ABc	64,8±9,1 ABc	64,8±9,1 ABc	86,9±1,0 Aab	100,0±0,0 Aa	86,9±1,0 Aab	51,7±9,9 AC	65,4±5,1 ABc
4ª	9,5±8,2 Cc	14,2±14,2 Cbc	14,2±14,2 Cbc	23,8±2,1,8 CDbc	14,2±14,2 Cbc	9,5±8,2 Cc	9,5±8,2 Cc	9,5±8,2 Cc	71,4±14,2 ABa	42,8±5,0 Bab	38,0±8,2 ABbc	23,8±8,2 Bbc
5ª	22,6±21,5 BCa	13,6±14,3 Ca	8,9±7,7 Ca	26,1±2,0 CDa	13,0±1,0 Ca	8,3±7,2 Ca	8,3±7,2 Ca	8,3±7,2 Ca	8,3±7,2 Ca	8,3±7,2 Ca	12,5±2,5 Ba	20,8±9,0 Ba
6ª	8,3±7,2 Ca	13,0±1,0 Ca	13,0±1,0 Ca	13,0±1,0 Da	8,3±7,2 Ca	21,4±6,1 BCa	8,3±7,2 Ca	8,3±7,2 Ca	8,9±7,7 Da	33,9±18,1 BCa	13,6±14,3 Ba	38,6±10,7 ABa
7ª	12,5±12,5 Cb	47,6±4,1 Ba	13,0±1,0 Cb	22,0±8,4 BCa	13,0±1,0 Cb	13,0±1,0 Cb	26,1±2,0 BCab	35,1±9,1 BCab	13,0±1,0 Db	35,1±9,1 BCab	13,0±1,0 Bb	26,1±2,0 Bbb
8ª	8,9±7,7 Cc	14,2±0,0 Cc	39,2±3,0 BCabc	47,6±4,1 BCab	13,0±1,0 Cc	25,5±11,6 BCbc	21,4±6,1 BCbc	39,2±3,0 BCabc	38,6±10,7 CDabc	48,2±9,9 Bab	60,1±16,2 Aa	64,8±9,1 Aa

Coleta	Solução 1		Solução 2		Solução 3		Solução 4		Solução 5		Solução 6	
	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB
1ª	91,0±7,7 Aa	66,0±18,1 ABabc	78,5±6,1 ABab	51,7±9,9 ABbcd	77,3±21,5 ABab	47,6±4,1 Bbcd	52,3±4,1 BCDbcd	22,0±8,4 Cd	64,2±22,3 ABabc	22,0±8,4 Dd	34,5±5,1 CDEcd	21,4±6,1 Bb
2ª	91,6±7,2 Aa	64,8±9,1 ABa	100,0±0,0 Aa	79,1±19,0 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 Aa	100,0±0,0 Aa	100,0±0,0 Aa	91,6±7,2 Aa	100,0±0,0 Aa	73,8±2,0 Aa
3ª	61,3±10,7 ABCb	100,0±0,0 Aa	65,4±5,1 ABCab	60,1±16,2 ABb	60,7±3,0 BCb	60,7±3,0 Bb	86,3±14,3 ABab	65,4±5,1 ABab	51,7±9,9 BCb	87,5±12,5 ABab	78,5±6,1 ABab	73,2±15,2 Aab
4ª	80,9±8,2 ABa	9,5±8,2 Dd	52,3±8,2 BCabc	28,5±14,2 Bcd	66,6±8,2 ABCabc	38,0±8,2 Bbcd	71,4±14,2 ABCab	9,5±8,2 Cd	57,1±14,2 BCabc	66,6±21,8 ABCabc	71,4±14,2 ABCab	57,1±14,2 ABabc
5ª	48,2±9,9 BCDab	52,3±4,1 BCab	62,5±37,5 ABCab	52,3±4,1 BCDab	52,9±17,1 Bab	52,9±17,1 Bcd	34,5±5,1 CDb	39,8±16,2 BCab	35,1±9,1 BCb	51,1±23,2 BCDab	52,9±17,1 BCDab	73,8±2,0 Aa
6ª	35,1±9,1 CDab	25,5±11,6 CDab	34,5±5,1 CDab	61,3±10,7 ABa	35,7±22,3 CDab	52,3±4,1 Ba	47,6±4,1 CDab	38,6±10,7 BCab	60,7±3,0 Ba	39,2±3,0 CDab	13,0±1,0 Eb	47,6±4,1 ABab
7ª	22,6±21,5 Dc	48,8±23,2 BCabc	13,0±1,0 Dc	38,6±10,7 Babc	22,0±8,4 Dc	61,3±10,7 Bab	26,7±15,2 Dbc	61,3±10,7 Bab	21,4±6,1 Cc	73,8±2,0 ABCa	26,1±2,0 DEbc	21,4±6,1 Bc
8ª	13,0±1,0 De	21,4±6,1 CDde	34,5±5,1 CDde	38,6±10,7 Bcd	48,2±9,9 BCDbcd	52,3±4,1 Bbcd	60,7±3,0 BCDabc	74,4±11,6 ABab	64,8±9,1 ABabc	77,9±8,4 ABa	64,8±9,1 ABCabc	78,5±6,1 Aa

Coleta	Solução 1		Solução 2		Solução 3		Solução 4		Solução 5		Solução 6	
	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB
1ª	38,0±24,1 Bcd	61,3±10,7 ABbc	60,7±3,0 ABbc	60,7±3,0 ABbc	73,2±15,2 Aab	86,3±14,3 Aa	25,5±11,6 Bb	26,7±15,2 Bb	39,8±16,2 BCbcd	34,5±5,1 Bcd	38,6±10,7 BCcd	35,1±9,1 BCDcd
2ª	74,4±11,6 Aab	77,9±8,4 Aab	87,5±12,5 Aab	73,2±15,2 Aab	86,9±1,0 Aab	64,8±9,1 ABb	86,9±1,0 Aab	65,4±5,1 Ab	86,9±1,0 Aab	91,6±7,2 Aab	100,0±0,0 Aa	91,0±7,7 Aab
3ª	91,0±7,7 Aa	64,2±22,3 ABabc	60,7±3,0 ABbc	64,8±9,1 ABbc	65,4±5,1 ABabc	59,5±29,5 ABabc	35,7±22,3 Bcd	25,5±11,6 Bb	86,3±14,3 Aa	74,4±11,6 Aab	60,7±3,0 ABbc	47,6±4,1 BCDcd
4ª	9,5±8,2 Ba	9,5±8,2 Ba	14,2±8,0 Ba	9,5±8,2 Ba	23,8±8,2 Ca	9,5±8,2 Ea	38,0±8,2 Ba	14,2±14,2 Ba	23,8±8,2 Ca	9,5±8,2 Ba	28,5±7,0 BCa	9,5±8,2 Da
5ª	13,0±1,0 Ba	8,3±7,2 Ba	8,3±7,2 Ba	8,3±7,2 Ba	22,0±8,4 DEa	22,0±8,4 DEa	22,0±8,4 Ba	21,4±6,1 Ba	8,3±7,2 Ca	8,3±7,2 Ba	13,0±1,0 Ca	21,4±6,1 CDa
6ª	12,5±12,5 Ba	20,8±19,0 Ba	8,0±0,0 Ba	21,4±6,1 Ca	8,3±7,2 Ea	8,3±7,2 Ea	8,3±7,2 Ba	8,9±7,7 Ba	13,6±14,3 Ca	22,0±8,4 Ba	8,3±7,2 Ca	22,0±8,4 CDa
7ª	12,5±0,0 Bc	52,3±4,1 Aab	13,0±1,0 Bc	47,6±4,1 Aab	21,4±6,1 Cbc	26,1±2,0 CDEbc	13,6±14,3 Bc	38,6±10,7 ABabc	21,4±6,1 Cbc	22,0±8,4 Bbc	38,6±10,7 BCabc	65,4±5,1 ABa
8ª	8,9±7,7 Bc	12,5±12,5 Bc	8,9±7,7 Bc	48,2±9,9 Aab	39,2±3,0 BCbc	47,6±4,1 BCDab	34,5±5,1 Bbc	38,6±10,7 ABbc	60,7±3,0 ABab	73,8±2,0 Aa	47,6±4,1 Bcab	47,6±4,1 Bcab

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra minúscula e, nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. 0 AIB – isento de AIB (0 mg L⁻¹), 2.000 AIB – tratamento com AIB (2.000 mg L⁻¹). S1 - omissão de Zn e B, S2 - 0,5 mg L⁻¹ de Zn, S3 - 0,5 mg L⁻¹ de Zn, S4 - 0,50 mg L⁻¹ de Zn e B, S5 - 1,00 mg L⁻¹ de Zn e B, S6 - 2,00 mg L⁻¹ de Zn e B. Dados apresentados como: média ± desvio padrão

O comprimento total do sistema radicial (CTSR) apresentou variabilidade de resposta ao considerar cada clone dentro das coletas de brotações, soluções nutritivas e aplicação de regulador de crescimento para promover o enraizamento (Tabela 7).

O clone BP101 não apresentou diferença significativa para o CTSR durante a 2ª, 3ª e 8ª coletas de brotações em relação as soluções nutritivas e aplicação de AIB. Porém, durante as demais coletas de brotações, o clone BP101 apresentou diferença significativa para o CTSR de acordo com a solução nutritiva e aplicação de AIB (Tabela 7).

O clone BP118 somente apresentou diferença significativa para o CTSR em relação a solução nutritiva e aplicação de AIB durante a 8ª coleta de brotações, apresentando o menor valor na solução S6 quando na ausência de AIB (Tabela 7).

Para o clone BP120 não foi observada diferença significativa para o CTSR durante a 3ª e 4ª coletas de brotações em relação as soluções nutritivas e aplicação de AIB. Porém, durante as demais coletas de brotações, o clone BP120 apresentou diferença significativa para o CTSR de acordo com a solução nutritiva e aplicação de AIB (Tabela 7).

Em termos gerais, o comprimento total do sistema radicial foi pouco influenciado pelas coletas de brotações ao longo do tempo, apresentando crescimento semelhante em todas as épocas de avaliação. Provavelmente, esse efeito deve estar relacionado ao volume do recipiente de cultivo (tubete cônico de 55 cm³), o qual pode ter limitado o crescimento raiz adventícia dos materiais genéticos. Apesar desse resultado, os valores do CTSR foram elevados, sendo que a média geral foi de 125,0 cm. As soluções S5 e S6 associadas a aplicação de AIB na concentração de 2.000 mg L⁻¹ favoreceram o CTSR (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores médios do comprimento total do sistema radicular (cm) de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* em relação aos tratamentos avaliados

Coleta	Solução 1		Solução 2		Solução 3		Solução 4		Solução 5		Solução 6	
	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB	0 AIB	2.000 AIB
1ª	204,3±34,6 Aa	142,6±7,4 ABabc	148,6±54,3 ABabc	134,4±25,0 ABabc	181,0±29,7 Aab	189,7±71,9 Aab	150,1±19,6 ABbc	171,0±84,0 Aab	146,8±24,0 ABabc	124,3±70,9 ABbc	58,5±11,8 Cc	90,9±19,5 ABbc
2ª	122,4±22,6 ABa	103,7±24,2 Aa	56,7±9,4 ABa	82,1±19,9 Aa	86,7±5,6 ABa	103,2±23,1 ABa	57,3±10,1 ABCa	66,1±2,7 Aa	92,9±8,1 ABa	113,0±53,9 Aa	96,1±24,5 BCa	119,3±34,5 ABa
3ª	116,2±43,9 ABa	96,2±9,0 Aa	68,8±15,1 ABa	75,4±16,7 Aa	105,1±29,8 ABa	103,8±28,5 ABa	73,9±32,0 ABCa	83,5±48,5 Aa	77,9±25,3 ABa	130,0±50,1 Aa	58,1±11,3 Ca	53,6±19,8 Ba
4ª	53,9±13,4 Bc	82,8±4,3 Abc	146,3±33,7 ABabc	149,7±7,8 ABbc	176,2±60,8 Aab	138,8±57,2 ABabc	74,6±3,5 ABCbc	119,4±5,6 ABbc	178,2±70,7 Aab	91,5±21,3 Abc	209,3±104,2 Aa	171,1±30,1 Aab
5ª	113,3±2,7 ABab	109,4±18,3 Aab	46,2±2,4 Bb	68,3±12,6 Aab	89,9±4,7 ABab	86,3±4,1 ABab	111,9±5,8 ABab	123,1±6,4 Aab	153,7±8,0 ABa	156,0±8,2 Aa	150,4±7,9 ABCab	76,9±0,1 ABab
6ª	216,5±38,2 Aa	170,9±37,2 ABa	156,3±58,9 Aab	147,2±8,6 Aab	81,7±4,3 ABb	120,1±29,4 ABab	130,6±6,8 ABab	125,0±6,5 Aab	151,3±5,5 Aab	216,4±28,5 Aa	156,3±68,0 ABab	156,3±68,0 ABab
7ª	136,6±28,9 ABab	97,2±2,4 Aabc	101,6±38,3 ABabc	95,6±5,6 ABbc	57,0±3,1 Bbc	59,0±3,1 Bbc	4,6±0,9 Cc	81,3±4,2 Abc	81,0±9,0 ABbc	138,5±3,5 Aab	198,4±22,0 ABa	108,1±23,8 ABabc
8ª	133,1±7,0 ABa	142,1±3,5 Aa	100,1±7,5 ABa	104,7±26,8 Aa	66,5±3,5 Ba	81,8±8,9 Ba	41,5±13,8 BCa	93,8±31,2 Aa	62,3±6,9 Ba	106,7±55,7 Aa	116,4±6,1 ABCa	81,1±7,8 ABa
CLONE BP101												
Solução 3												
1ª	96,8±16,6 ABa	173,5±42,8 Aa	121,8±45,0 Aa	174,5±70,9 ABa	175,9±18,3 Aa	181,9±62,8 ABa	181,5±28,7 ABa	122,8±3,1 ABa	154,8±29,7 Aa	183,6±37,7 Aa	79,0±11,2 ABa	2.000 AIB
2ª	172,9±28,9 ABa	166,6±45,2 Aa	145,1±7,2 Aa	221,9±22,1 Aa	145,0±27,6 Aa	157,3±30,4 ABa	118,6±21,4 ABa	106,1±18,8 ABa	143,7±34,1 Aa	139,7±41,7 Aa	125,4±33,7 ABa	196,1±53,5 Aa
3ª	65,2±20,3 Ba	83,5±37,4 Aa	101,5±34,0 Aa	89,9±16,3 Ba	75,0±22,2 Aa	100,9±39,0 Ba	79,5±17,2 Ba	82,8±30,3 Ba	122,4±20,6 Aa	112,7±37,8 Aa	101,9±7,2 ABa	106,5±14,8 Aa
4ª	105,2±7,9 ABa	121,8±6,4 Aa	88,7±32,3 Aa	109,2±32,3 Aa	181,1±98,1 Aa	110,1±2,5 Ba	198,5±34,4 ABa	120,7±7,7 ABa	144,8±63,4 Aa	154,3±21,5 Aa	207,9±26,3 Aa	182,4±12,2 Aa
5ª	105,2±2,7 ABa	111,3±30,2 Aa	90,8±11,0 Aa	76,0±17,7 Ba	145,9±50,0 Aa	121,0±32,9 Ba	136,4±19,6 ABa	154,8±92,4 ABa	117,5±22,0 Aa	96,3±25,4 Aa	160,0±40,1 ABa	170,2±45,0 Aa
6ª	220,9±52,2 Aa	183,7±45,6 Aa	194,6±63,3 Aa	163,1±11,1 ABa	205,5±34,9 Aa	264,7±75,0 Aa	236,1±24,1 Aa	227,9±93,4 Aa	205,0±39,9 Aa	220,0±38,8 Aa	170,5±108,7 ABa	183,1±42,5 Aa
7ª	142,7±7,5 ABa	121,2±10,5 Aa	146,5±27,8 Aa	141,0±1,2 ABa	158,6±0,9 Aa	210,3±47,2 ABa	200,9±8,3 ABa	166,1±50,1 ABa	197,0±28,7 Aa	194,6±34,4 Aa	82,2±17,5 ABa	151,2±30,3 Aa
8ª	135,1±15,0 ABab	112,1±27,0 ABab	124,9±59,0 Aab	133,3±16,8 ABab	136,6±22,0 Aab	192,4±71,5 ABa	212,0±8,8 Aa	175,4±52,9 ABab	208,0±30,3 Aa	205,4±36,3 Aa	52,7±9,6 Bb	159,7±31,9 Aab
CLONE BP120												
Solução 3												
1ª	149,5±65,5 ABbc	195,3±65,0 Aa	157,1±12,4 ABbc	71,1±3,7 Bc	177,1±18,5 Aab	165,8±32,4 ABbc	112,6±30,0 ABbc	153,2±49,6 ABbc	123,0±30,9 ABabc	156,2±22,0 ABbc	85,2±28,6 CDbc	82,7±26,4 BCbc
2ª	139,4±29,2 ABab	106,7±38,0 ABCab	138,5±31,7 Aab	142,0±16,9 ABab	91,3±21,6 ABab	62,4±11,1 BCbc	62,4±11,1 BCbc	83,5±35,8 Ab	186,8±44,8 Aa	146,8±17,1 Aab	89,5±33,9 BCDab	93,9±21,9 BCab
3ª	83,9±29,2 ABa	85,9±30,7 BCa	93,8±57,1 Aa	131,1±39,0 ABa	99,4±22,3 ABa	107,1±13,1 ABCa	104,5±51,0 Aa	147,8±51,0 Aa	80,7±20,7 Ba	67,5±31,5 Aa	60,7±10,1 Da	64,1±24,5 Ca
4ª	106,4±6,1 ABa	128,3±6,7 ABCa	111,0±0,4 Aa	139,5±7,3 ABa	102,8±1,4 ABa	157,1±31,4 ABa	81,5±31,9 Aa	126,3±0,9 Aa	91,4±6,7 ABa	66,8±3,8 Aa	145,3±52,1 BCDa	86,1±35,4 BCa
5ª	63,6±14,9 ABb	66,6±3,5 Cb	59,3±3,1 Ab	69,7±3,6 Bb	34,1±1,7 Bb	50,4±10,5 Cb	52,0±24,9 Ab	98,4±43,9 Aab	54,9±2,8 Bb	76,9±4,0 Ab	79,1±14,8 CDab	177,7±37,4 ABa
6ª	133,7±33,9 ABbc	175,1±48,9 ABabc	136,8±14,2 Abc	157,8±8,3 ABbc	159,2±5,9 Abc	189,9±10,0 Aab	99,6±11,0 Abc	116,8±6,1 Abc	86,3±9,5 Abc	138,1±19,0 Abc	265,6±13,9 Aa	197,3±93,8 Aab
7ª	61,5±3,2 ABb	107,9±5,6 ABCab	156,3±20,3 Aab	109,1±5,7 ABab	101,7±3,9 ABab	170,9±9,0 Aa	73,7±3,8 Aab	107,9±2,7 Aab	84,1±2,1 Bb	117,0±11,6 Aab	163,5±88,0 BCa	128,8±1,8 ABCab
8ª	42,6±2,2 Bb	113,9±5,9 ABCab	136,3±7,1 Aab	192,7±3,7 Aa	86,0±32,0 ABab	142,4±47,5 ABCbc	73,7±8,2 Ab	113,9±2,9 Aab	86,5±4,5 ABab	123,5±12,2 Aab	185,9±79,6 ABa	136,0±1,9 ABCab

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e, nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. 0 AIB – isento de AIB (0 mg L⁻¹), 2.000 AIB – tratamento com AIB (2.000 mg L⁻¹). S1 – omissão de Zn e B, S2 – 0,5 mg L⁻¹ de Zn, S3 – 0,5 mg L⁻¹ de B, S4 – 0,50 mg L⁻¹ de Zn e B, S5 – 1,00 mg L⁻¹ de Zn e B, S6 – 2,00 mg L⁻¹ de Zn e B. Dados apresentados como: média ± desvio padrão

De acordo com a Matriz de Correlação de Pearson dos dados amostrados pode-se verificar correlação significativa dos valores das temperaturas máximas, médias e mínimas com a SCV, SCS e EPS. A correlação das temperaturas máximas, médias e mínimas com a SCV foi negativa, o que denota redução do enraizamento das miniestacas em casa de vegetação quando submetidas a elevadas temperaturas. O CTSR não apresentou correlação com os dados de temperatura da casa de vegetação, denotando pouca influencia em termos da qualidade do sistema radicial emitido (Tabela 8).

Tabela 8 - Resumo da Matriz de Correlação de Pearson para a temperatura do ar máxima (TMAX), temperatura média (TMED), temperatura mínima (TMIN), sobrevivência durante saída da casa de vegetação (SCV), sobrevivência durante saída da casa de sombra (SCS), enraizamento em área a pleno sol (EPS) e comprimento total do sistema radicial (CTSR) de miniestacas de *Eucalyptus benthamii*

Variável	TMAX	TMED	TMIN	SCV	SCS	EPS	CTSR
TMAX	1						
TMED	0,97**	1					
TMIN	0,93**	0,99**	1				
SCV	-0,29**	-0,30**	-0,30**	1			
SCS	0,49**	0,48**	0,47**	0,35**	1		
EPS	0,52**	0,55**	0,55**	0,28**	0,80**	1	
CTSR	-0,03 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	0,04 ^{ns}	1

^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ^{**} Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F

3.4 Discussão

O pouco conhecimento a respeito dos fatores fisiológicos e ambientais que envolvem o enraizamento adventício em propágulos tem limitado a produção de mudas clonais de espécies florestais consideradas de difícil propagação (ALFENAS et al., 2004; ASSIS; MAFIA, 2007), o que limita avanços na área de melhoramento florestal.

Em termos operacionais, o enraizamento em propágulos depende de inúmeros fatores, variando de acordo com as condições de manejo, sistemas de poda de brotações, aspectos nutricionais, temperatura e umidade relativa do ar (CORRÊA et al., 2005; CUNHA et al., 2009; LI et al., 2009; SCHWAMBACH; FADANELLI; FETT-NETO, 2005), sendo que os protocolos de clonagem devem ser ajustados de acordo com as condições de cultivo para favorecer os índices de enraizamento de acordo com as características de cada material genético de interesse (ALFENAS et al., 2004; ASSIS; MAFIA, 2007; HARTMANN et al., 2011).

Com base nos dados observados no presente estudo para *Eucalyptus benthamii*, a sobrevivência de miniestacas na saída da casa de vegetação variou de acordo com a época do ano, concentração de AIB e material genético, apresentando índices elevados (superior a 85% para a maioria das observações), os quais podem ser considerados adequados para a miniestaquia de *Eucalyptus* (ALFENAS et al., 2004). Segundo Wendling e Xavier (2005b) geralmente os índices de sobrevivência de miniestacas em casa de vegetação são elevados devido as condições ambientais (como a luz, umidade e temperatura) serem controladas adequadamente para garantir a sobrevivência dos propágulos até a indução do enraizamento. Valores elevados para a sobrevivência de miniestacas de *Eucalyptus* na saída da casa de vegetação são reportados em vários trabalhos, e geralmente situam-se acima de 85%, como o observado para *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* (BORGES et al., 2011); *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (GOULART; XAVIER, 2008; GOULART; XAVIER, 2010; GOULART; XAVIER; CARDOSO, 2008; GOULART; XAVIER; DIAS, 2010), *Eucalyptus cloeziana* (ALMEIDA et al., 2007), *Eucalyptus grandis* (TITON et al., 2003; WENDLING; XAVIER, 2005b) e *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* (BRONDANI et al., 2008; BRONDANI et al., 2010a; BRONDANI et al., 2010b).

Contudo, apesar da elevada sobrevivência das miniestacas na saída da casa de vegetação o seu enraizamento não é garantido, pois as miniestacas ainda podem permanecer vivas mesmo sem a presença de raiz na porção basal, ocorrendo a mortalidade dessas durante a fase de aclimação. Geralmente, as maiores diferenças entre as espécies, variedades ou híbridos de *Eucalyptus* são mais evidenciadas durante a fase de aclimação em casa de sombra, onde os índices de sobrevivência podem variar de 0 a 100% (ALFENAS et al., 2004). Ao considerar as espécies de clima subtropical, as diferenças de enraizamento são ainda maiores, podendo ocorrer até a perda total do material em comparação com as espécies destinadas ao plantio em regiões tropicais (ASSIS; MAFIA, 2007; BRONDANI et al., 2010a; BRONDANI et al., 2010b; CORRÊA; FETT-NETO, 2004). Esse fato pode estar relacionado a maior velocidade de enraizamento observado pelas espécies de clima tropical em comparação as espécies de clima subtropical (ASSIS; MAFIA, 2007; CORRÊA; FETT-NETO, 2004) e, dessa forma, por apresentarem um sistema radicial mais desenvolvido, podem resistir e se adaptar as condições ambientais com maior facilidade durante a fase de aclimação em casa de sombra.

Os dados referentes a sobrevivência de miniestacas na saída da casa de sombra denotam elevada sensibilidade das miniestacas de *Eucalyptus benthamii* ao variar as condições de

umidade, temperatura e luminosidade em relação as existentes na casa de vegetação, chegando em determinadas épocas a ocorrer mais de 85% de mortalidade durante a transferência para aclimação em casa de sombra. Segundo Wendling e Xavier (2005b) as mudanças ambientais em termos de oscilações hídricas, temperatura e luminosidade entre as casas de vegetação e de sombra proporcionam maior estresse as miniestacas, resultando em aumento da mortalidade. Dessa forma, recomenda-se investigações em relação a elevada mortalidade das miniestacas de *Eucalyptus benthamii* durante a aclimação em casa de sombra, buscando responder se é resultante das condições de manejo ou aos baixos índices de enraizamento durante a transferência para casa de vegetação ou ainda, se está associado a ambos. De acordo com os resultados, deverá ser necessário o desenvolvimento de um novo tipo de manejo para favorecer o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii*, tendo em vista que o sistema de controle da temperatura e da umidade relativa do ar da casa de vegetação adotado no presente estudo estava ajustado para o enraizamento de espécies de *Eucalyptus* tropicais.

A porcentagem de enraizamento das miniestacas variou muito em relação ao clone, regulador de crescimento, solução nutritiva e época de coleta de brotações, apresentando valores considerados reduzidos ao comparar com os índices apresentados para outras espécies de *Eucalyptus* propagadas pela técnica de miniestaquia, tais como o *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (GOULART; XAVIER, 2010; GOULART; XAVIER; CARDOSO, 2008; GOULART; XAVIER; DIAS, 2010) e *Eucalyptus grandis* (TITON et al., 2003; WENDLING; XAVIER, 2005b), que geralmente apresentam valores superiores a 85%. Em termos médios, a porcentagem de enraizamento foi de 43,5%, sendo considerada uma espécie de difícil enraizamento, como o sugerido por Graça; Shimizu e Tavares (1999) ao trabalhar com a estaquia de *Eucalyptus benthamii*.

A mortalidade das miniestacas de *Eucalyptus benthamii* chegou a mais de 80% nas estações mais quentes, o que pode ser confirmado pela correlação negativa entre o aumento da temperatura na casa de vegetação com o enraizamento (Tabela 8), semelhante ao observado para *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, que também apresentou valores reduzidos da porcentagem de enraizamento com o aumento da temperatura do ar (BRONDANI et al., 2010b). A elevada temperatura pode desnaturar enzimas, reduzir a absorção de nutrientes e alterar o metabolismo, efeito que prejudica o enraizamento (CORRÊA; FETT-NETO, 2004), além de reduzir a capacidade morfogênica dos tecidos, como a capacidade de indução da raiz (RASMUSSEN; SMITH; HUNT, 2009) e favorecer a indução de calo na região basal (HARTMANN et al., 2011; MATVEEVA; LUTOVA; NESTER, 2001). A temperatura ótima

para o enraizamento varia entre as espécies, sendo alta para espécies tropicais e baixas para subtropicais (CORRÊA; FETT-NETO, 2004; FETT-NETO et al., 2001).

Além disso, a presença de AIB na concentração de 2.000 mg L^{-1} apresentou acréscimos ao enraizamento das miniestacas de *Eucalyptus benthamii*, sendo que o seu efeito indutivo foi condicionado pelas concentrações de Zn e B das soluções nutritivas. Esse resultado está de acordo com as observações de Schwambach; Fadanelli e Fett-Neto (2005) que avaliaram o enraizamento de microestacas *Eucalyptus globulus* em relação a nutrição mineral, inclusive variações das concentrações de boro e zinco. As miniestacas de *Eucalyptus benthamii* submetidas as soluções isentas de Zn e B (S1) ou quando fertirrigadas com as soluções em concentrações baixas (S2, S3 e S4), apresentaram índices reduzidos de enraizamento. Contudo, quando as concentrações de Zn e B foram aumentadas nas soluções nutritivas (S5 e S6) ocorreu maior indução do enraizamento, demonstrando a importância desses nutrientes para o sucesso da multiplicação clonal dos genótipos avaliados.

De acordo com as observações de Schwambach; Fadanelli e Fett-Neto (2005) o boro não influenciou significativamente a rizogênese em microestacas de *Eucalyptus globulus*, porém foi essencial para o crescimento e desenvolvimento das raízes adventícias após a indução. O zinco influenciou significativamente a porcentagem de enraizamento das microestacas, sendo que a deficiência reduziu os valores da porcentagem de enraizamento. Os autores sugeriram que a deficiência de Zn pode ter reduzido a biossíntese de triptofano, e dessa forma, reduziu os teores endógenos das auxinas, dificultando o enraizamento das microestacas.

Essa hipótese está de acordo no que se refere a correlação do estado nutricional do propágulo com o aumento dos índices de enraizamento pela aplicação de regulador de crescimento (CUNHA et al., 2009; LI et al., 2009; LUDWIG-MÜLLER, 2000; MALTA et al., 2002; SAN-FRANCISCO et al., 2005; SCHWAMBACH; FADANELLI; FETT-NETO, 2005; SOUZA; PEREIRA, 2007). Sabe-se que o Zn é requerido para síntese de triptofano (DECHEN; NACHTIGALL, 2006; MALTA et al., 2002; POLLMANN; DÜCHTING; WEILER, 2009; SAN-FRANCISCO et al., 2005; SOUZA; PEREIRA, 2007; WOODWARD; BARTEL, 2005) e as concentrações adequadas desse microelemento na miniestaca pode ter favorecido a síntese de auxinas endógenas para promover a rizogênese nas miniestacas de *Eucalyptus benthamii*. Esses resultados sugerem que os efeitos do AIB em nível morfogênético também estão associados aos aspectos nutricionais que as minicepas são condicionadas em sistemas de minijardins clonais, regulando a indução da formação de calo e/ou de raiz adventícia, semelhante ao reportado para *Eucalyptus globulus* (BALTIERRA;

MONTENEGRO; GARCÍA, 2004). Segundo Xavier; Wendling e Silva (2009) o modo de ação química das auxinas nas plantas influenciam o crescimento e desenvolvimento a partir de dois mecanismos: (i) pela promoção de transporte de íons de H^+ pelas paredes celulares, aumentando a extensibilidade e (ii) pela indução da transcrição de RNAm específico necessário para promover o crescimento. Em morfogênese, a aplicação de auxina influencia a diferenciação celular, revertendo células em estado de diferenciação e reabilitando-as a divisão celular.

O comprimento total do sistema radicial das miniestacas enraizadas em EPS apresentaram média geral de 125,0 cm, considerando a limitação do volume do tubete (no caso de 55cm^3) para o crescimento radicial das mudas clonais de *Eucalyptus benthamii*. A qualidade da raiz formada está diretamente associada com a sobrevivência das mudas no campo após o plantio (ALFENAS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006), sendo que o comprimento total do sistema radicial das mudas produzidas por miniestaquia pode estar relacionado ao grau de juvenildade, além de ser considerado um indicativo de vigor da muda (WENDLING; XAVIER, 2005a). Dessa forma, em termos gerais, as raízes formadas apresentaram boa qualidade, podendo suprir as necessidades nutricionais e hídricas exigidas pela muda após o plantio. Porém, a sobrevivência, bem como, o hábito de crescimento a campo das mudas clonais de *Eucalyptus benthamii* deverão ser investigados para comprovar a qualidade da muda produzida, pois de acordo com Oliveira et al. (2006) os resultados de campo também podem contribuir para a tomada de decisão sobre o uso de uma determinada técnica de produção de mudas em detrimento de outra.

Em termos gerais, o enraizamento das miniestacas de *Eucalyptus benthamii* foi reduzido e dependeu das concentrações de Zn e B na solução nutritiva, bem como, das coletas de brotações ao longo das épocas do ano, clone e aplicação de AIB. Ficou demonstrado que o efeito do AIB como agente indutivo ao enraizamento adventício está condicionado a nutrição do propágulo coletado da minicepa, sendo que esse resultado pode condicionar o sucesso das técnicas biotecnológicas de clonagem aplicadas a determinadas espécies florestais, sobretudo em relação aos *Eucalyptus* subtropicais.

3.5 Conclusões

- O enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* dependeu do material genético, da coleta de brotações, da aplicação de AIB e concentrações de Zn e B;

- Os valores da porcentagem de enraizamento de *Eucalyptus benthamii* foram baixos, sendo os materiais genéticos considerados de difícil propagação pela miniestaqueia;
- Em termos gerais, as miniestacas oriundas das minicepas fertirrigadas com as soluções nutritivas S5 (1,0 mg L⁻¹ de Zn e B) e S6 (2,0 mg L⁻¹ de Zn e B) associadas a presença de AIB na concentração de 2.000 mg L⁻¹ apresentaram os maiores índices de enraizamento.

Referências

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442 p.

ALMEIDA, F.D.; XAVIER, A.; DIAS, J.M.M.; PAIVA, H.N. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 455–463, 2007. DOI: 10.1590/S0100-67622007000300011

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

BALTIERRA, X.C.; MONTENEGRO, G.; GARCÍA, D. Ontogeny of *in vitro* rooting processes in *Eucalyptus globulus*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 499–503, 2004. DOI: 10.1079/IVP2004559

BASAK, U.C.; DAS, A.B.; DAS, P. Rooting response in stem cuttings from five species of mangrove trees: effect of auxins and enzyme activities. **Marine Biology**, Berlin, v. 136, n. 1, p. 185–189, 2000. DOI: 10.1007/s002270050021

BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.; MELO, L.A.; ROSADO, A.M. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 3, p. 425–434, 2011. DOI: 10.1590/S0100-67622011000300006

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

BRONDANI, G.E.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Determinação do tempo ótimo de enraizamento para miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. In: REUNIÓN ARGENTINA DE FISIOLÓGÍA VEGETAL, 28., 2010, La Plata. **Libro de Resúmenes...** La Plata: Asociación Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal, 2010. p. 194. 1 CD-ROM.

BRONDANI, G.E.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; DUTRA, L.F.; ARAUJO, M.A. Aplicação de IBA para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 667–674, 2010a. DOI: 10.4025/actasciagrnon.v32i4.4879

BRONDANI, G.E.; WENDLING, I.; ARAUJO, M.A.; PIRES, P.P. Ácido indolbutírico em gel para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 153–158, 2008.

BRONDANI, G.E.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; DUTRA, L.F.; ARAUJO, M.A. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*: (II) sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das coletas e estações do ano. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 3, p. 453–465, 2010b.

CAMPINHOS, E.J.; IKEMORI, Y.K. Nova técnica para produção de mudas de essências florestais. **IPEF**, Piracicaba, v. 23, p. 47–52, 1983.

CORRÊA, L.R.; FETT-NETO, A.G. Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 315–324, 2004. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2004.05.006

CORRÊA, L.R.; PAIM, D.C.; SCHWAMBACH, J.; FETT-NETO, A.G. Carbohydrates as regulatory factors on the rooting of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 45, n. 1, p. 63–73, 2005. DOI: 10.1007/s10725-004-6125-z

CUNHA, A.C.M.C.M.; WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. Produtividade e sobrevivência de minicepas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage em sistema de hidroponia e em tubete. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 307–310, 2005.

CUNHA, A.C.M.C.M.; PAIVA, H.N.; LEITE, H.G.; BARROS, N.F.; LEITE, F.P. Influência do estado nutricional de minicepas no enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 607–615, 2009. DOI: 10.1590/S0100-67622009000400003

DAI, W.; CHENG, Z.M.; SARGENT, W.A. Expression of the *ro1B* gene enhances adventitious root formation in hardwood cuttings of aspen. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 40, n. 4, p. 366–370, 2004. DOI: 10.1079/IVP2004556

DEAN, G.; CASSON, S.; LINDSEY, K. *KNAT6* gene of *Arabidopsis* is expressed in roots and is required for correct lateral root formation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, n. 1, p. 71–84, 2004. DOI: 10.1023/B:PLAN.0000028772.22892.2d

DECHEN, A.R.; NACHTIGALL, G.R. Micronutrientes. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 327–354.

DELWAULLE, J.C.; LAPLACE, Y.; QUILLET, G. Production massive de boutures d' *Eucalyptus* en République Populaire du Congo. **Silvicultura**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 779–781, 1983.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Programa SOC - software científico: versão 2.1**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 1990.

_____. **Programa SIARCS - sistema integrado para análise de raízes e cobertura do solo: versão 3.0**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 1996.

FERREIRA, E.M.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; LEITE, H.G.; SARTORIO, R.C.; PENCHEL FILHO, R.M. Determinação do tempo ótimo do enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 183–187, 2004. DOI: 10.1590/S0100-67622004000200004

FETT-NETO, A.G.; FETT, J.P.; GOULART, L.W.V.; PASQUALI, G.; TERMIGNONI, R.R.; FERREIRA, A.G. Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 21, n. 7, p. 457–464, 2001. DOI: 10.1093/treephys/21.7.457

FOGAÇA, C.M.; FETT-NETO, A.G. Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 45, n. 1, p. 1–10, 2005. DOI: 10.1007/s10725-004-6547-7

FORD, Y.Y.; BONHAM, E.C.; CAMERON, R.W.F.; BLAKE, P.S.; JUDD, H.L.; HARRISON-MURRAY, R.S. Adventitious rooting: examining the role of auxin in an easy and a difficult to root plant. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 36, n. 2, p. 149–159, 2002. DOI: 10.1023/A:1015013025513

GIANFAGNA, T. Natural and synthetic growth regulators and their use in horticultural and agronomic crops. In: DAVIES, J. (Ed.). **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 751-773.

GOULART, P.B.; XAVIER, A. Efeito do tempo de armazenamento de miniestacas no enraizamento de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 671–677, 2008. DOI: 10.1590/S0100-67622008000400008

_____. Influência do modo de acondicionamento de miniestacas no enraizamento de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 3, p. 407–415, 2010. DOI: 10.1590/S0100-67622010000300004

GOULART, P.B.; XAVIER, A.; CARDOSO, N.Z. Efeito dos reguladores de crescimento AIB e ANA no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1051–1058, 2008. DOI: 10.1590/S0100-67622008000600010

GOULART, P.B.; XAVIER, A.; DIAS, J.M.M. Efeito de antioxidantes no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 961–972, 2010. DOI: 10.1590/S0100-67622010000600001

GRAÇA, M.E.C.; SHIMIZU, J.Y.; TAVARES, F.R. Capacidade de rebrota e de enraizamento de *Eucalyptus benthamii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 39, p. 135–138, 1999.

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

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N. **Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de *Eucalyptus***. Piracicaba: IPEF, 2002. 21 p. (IPEF. Circular Técnica, 194).

_____. Monitoramento nutricional e fertilização em macro, mini e microjardim clonal de *Eucalyptus*. In: GONÇALVES, J.L.M.; BENEDETTI, V. (Eds.). **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2005. p. 191–217.

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

LI, S.W.; XUE, L.; XU, S.; FENG, H.; AN, L. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **The Botanical Review**, New York, v. 75, n. 2, p. 230–247, 2009. DOI: 10.1007/s12229-009-9029-9

LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 32, n. 2/3, p. 219–230, 2000. DOI: 10.1023/A:1010746806891

MALTA, M.R.; FURTINI NETO, A.E.; ALVES, J.D.; GUIMARÃES, P.T.G. Efeito da aplicação de zinco via foliar na síntese de triptofano, aminoácidos e proteínas solúveis em mudas de cafeeiro. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 14, n. 1, p. 31–37, 2002. DOI: 10.1590/S1677-04202002000100004

MATVEEVA, T.V.; LUTOVA, L.A.; NESTER, Y. Tumor formation in plants. **Russian Journal of Genetics**, New York, v. 37, n. 9, p. 993–1001, 2001. DOI: 10.1023/A:1011949211985

MSTAT. **Statistical program**. Michigan, USA: Michigan State University, Crop and Soil Department Science, 1994.

MUJIU, L.; ARNOLD, R.; BOHAI, L.; MINSHENG, Y. Selection of cold-tolerant eucalypts for Hunan Province. In: TURNBULL, J.W. (Ed.). **Eucalypts in Asia**: proceedings of a international conference held in Zhanjiang, Guangdong, people's Republic of China. Canberra: Elect Printing, 2003. p. 107–116. (ACIAR. Proceedings, 111).

OLIVEIRA, M.L.; XAVIER, A.; SANTOS, A.P.; ANDRADE, H.B. Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones híbridos de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 503–512, 2006. DOI: 10.1590/S0100-67622006000400002

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

POLLMANN, S.; DÜCHTING, P.; WEILER, E.W. Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. **Phytochemistry**, New York, v. 70, n. 4, p. 523–531, 2009. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.01.021

RASMUSSEN, A.; SMITH, T.E.; HUNT, M.A. Cellular stages of root formation, root system quality and survival of *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* cuttings in different temperature environments. **New Forests**, Dordrecht, v. 38, n. 3, p. 285–294, 2009. DOI: 10.1007/s11056-009-9147-6

SAN-FRANCISCO, S.; HOUDUSSE, F.; ZAMARREÑO, A.M.; GARNICA, M.; CASANOVA, E.; GARCÍA-MINA, J.M. Effects of IAA and IAA precursors on the development, mineral nutrition, IAA content and free polyamine content of pepper plants cultivated in hydroponic conditions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 38–52, 2005. DOI: 10.1016/j.scienta.2005.03.006

SCHWAMBACH, J.; FADANELLI, C.; FETT-NETO, A.G. Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 487–494, 2005. DOI: 10.1093/treephys/25.4.487

SCHWAMBACH, J.; RUEDELL, C.M.; ALMEIDA, M.R.; PENCHEL, R.M.; ARAÚJO, E.F.; FETT-NETO, A.G. Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* x *maidennii* mini-cuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. **New Forests**, Dordrecht, v. 36, n. 3, p. 261–271, 2008. DOI: 10.1007/s11056-008-9099-2

SILVA, L.D. **Melhoramento genético de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage visando a produção de madeira serrada em áreas de ocorrência de geadas severas**. 2008. 275 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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

STAPE, J.L.; GONÇALVES, J.L.M.; GONÇALVES, A.N. Relationships between nursery practices and field performance for *Eucalyptus* plantations in Brazil. **New Forests**, Dordrecht, v. 22, n. 1/2, p. 19–41, 2001. DOI: 10.1023/A:1012271616115

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 848 p.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Dinâmica do enraizamento de microestacas de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 6, p. 665–673, 2002. DOI: 10.1590/S0100-67622002000600003

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; REIS, G.G. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 1–7, 2003. DOI: 10.1590/S0100-67622003000100001

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência da miniestaquia seriada no vigor radicular de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 681–689, 2005a. DOI: 10.1590/S0100-67622005000500003

_____. Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 921–930, 2005b.

WENDLING, I.; XAVIER, A.; GOMES, J.M.; PIRES, I.E.; ANDRADE, H.B. Efeito do regulador de crescimento AIB na propagação de clones de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 187–192, 2000.

WIT ONDAS, H.W.; BRONDANI, G.E.; ALMEIDA, C.V.; ALMEIDA, M. Caracterização anatômica da propagação clonal *in vitro* de *Eucalyptus benthamii*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 18., 2010, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 2010. 1 CD-ROM.

WOODWARD, A.W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 5, p. 707–735, 2005. DOI: 10.1093/aob/mci083

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

4 DINÂMICA DE ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS DE *Eucalyptus benthamii*

Resumo

O *Eucalyptus benthamii* é uma espécie considerada de difícil enraizamento quando propagada pelas técnicas de estaquia e miniestaquia, sendo que a produção de mudas clonais apresenta inúmeras dificuldades, principalmente em relação aos aspectos operacionais e de manejo durante o sistema de produção em viveiro florestal. Objetivou-se determinar a porcentagem de enraizamento de genótipos selecionados de *Eucalyptus benthamii* em relação a concentração de AIB, o tempo ótimo de permanência de miniestacas enraizadas em casa de vegetação e a origem da conexão vascular. Coletaram-se brotações de minicepas manejadas em sistema semihidropônico para a confecção de miniestacas. A região basal da miniestaca foi imersa em soluções contendo diferentes concentrações de AIB (0 – isento de AIB; 1.000; 2.000; 3.000 e 4.000 mg L⁻¹). A cada sete dias (0 – instante do plantio, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias) procedeu-se amostragem destrutiva de miniestacas para avaliar a porcentagem de enraizamento e o comprimento da maior raiz. Durante o período de 0 a 28 dias após a aplicação de AIB efetuou-se amostragem da porção basal da miniestaca para analisar histologicamente o enraizamento. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x5x7) com parcelas subdivididas no tempo, contendo cinco repetições de 50 miniestacas. A aplicação de AIB favoreceu a indução de raízes, sendo que a concentração de 2.000 mg L⁻¹ promoveu maior velocidade e porcentagem de enraizamento. O intervalo de 35 a 42 dias é o mais indicado para a permanência das miniestacas enraizadas em casa de vegetação, independente do material genético avaliado. De acordo com as análises histológicas da rizogênese foi verificada formação de centros meristemáticos junto ao câmbio vascular, sendo que a raiz adventícia apresentou conexão direta com o câmbio vascular.

Palavras-chave: Rizogênese; Clonagem; Técnica de miniestaquia; Análise histológica; Ácido indolbutírico

Abstract

Eucalyptus benthamii is considered a species of rooting difficult when propagated by cutting and mini-cuttings techniques. The production of clones presents numerous difficulties, mainly with regard to operational and management aspects during the production system in a forest nursery. The aim of this study was to determine the adventitious rooting percentage of selected genotypes of *Eucalyptus benthamii* regarding the IBA concentration, optimal time of permanence of rooted mini-cuttings in a greenhouse and the origin of the vascular connection of the adventitious root. Shoots from mini-stumps managed in semi-hydroponic system were used for the preparation of mini-cuttings. The basal region of the mini-cuttings was immersed in solutions containing different IBA concentrations (0 – free IBA; 1,000; 2,000; 3,000 and 4,000 mg L⁻¹). Every seven days (0 – moment of planting, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 days) destructive sampling of mini-cuttings to evaluate the rooting percentage and length of larger root were collected. During the period 0 at 28 days after the IBA application sampling of the basal portion of mini-cuttings to analyze the root histology were collected. The experiment was conducted in completely randomized design in factorial arrangement (3x5x7) with split-plot in time, containing five replications of 50 mini-cuttings. The IBA application favored the induction of adventitious roots, and the concentration of 2,000 mg L⁻¹ resulted in the greater speed and rooting percentage. The interval of 35 to 42 days was the most suitable for the permanence of mini-cuttings rooted in a greenhouse, regardless of the evaluated genetic material. According to the histological analysis of rhizogenesis was verified the formation of

meristematic centers in the vascular cambium, and the adventitious root presented direct connection to the vascular cambium.

Keywords: Rhizogenesis; Cloning; Mini-cuttings technique; Histological analysis; Indolbutyric acid

4.1 Introdução

O *Eucalyptus benthamii* tem sua origem natural situada no litoral oriental de New South Wales, Austrália, com latitude aproximada de 34°00' S e longitude de 150°30' E, onde é conhecido como "Camden White Gum". A espécie limita-se, principalmente, a sudoeste da cidade de Sydney em planícies aluviais ao longo do Rio Nepean e seus afluentes (BENSON, 1985; BENSON; MCDOUGALL, 1998). De acordo com as condições adaptativas, o *Eucalyptus benthamii* pode tolerar temperaturas reduzidas e extremas, inclusive a geadas (JOVANOVIC; BOOTH, 2002), chegando a sobreviver em temperaturas mínimas absolutas entre -6°C a -10°C (MUJIU et al., 2003). A espécie está confinada a uma reduzida população de 6.500 árvores no Vale Kedumba e a três populações remanescentes ao longo do Rio Nepean até a Bacia Bents, Wallacia e Camden, sendo considerada vulnerável ao processo de extinção na região de ocorrência natural (BUTCHER; SKINNER; GARDINER, 2005).

Contudo, por ser uma espécie recente em plantios florestais, existem limitações quanto a produção de sementes e, quando essas estão disponíveis, os preços são elevados. A clonagem apresenta-se como alternativa para a multiplicação, inclusive de matrizes previamente selecionadas para cada região. Porém, o baixo índice de enraizamento limita a aplicação da técnica para a implantação de plantios comerciais de *Eucalyptus benthamii*, bem como, em programas de melhoramento genético. Atualmente, poucos avanços foram conquistados na área de melhoramento genético da espécie, sendo que a miniestaquia apresenta excelentes perspectivas para a produção de mudas clonais de matrizes difíceis de enraizar (BRONDANI et al., 2010a; BRONDANI et al., 2010b; BRONDANI; GONÇALVES; ALMEIDA, 2010), inclusive de híbridos selecionados (ASSIS; MAFIA, 2007).

Aplicações exógenas de reguladores de crescimento podem potencializar a rizogênese em propágulos coletados de genótipos selecionados, sendo que o ácido indolbutírico (AIB) é o mais utilizado (ALMEIDA et al., 2007; SCHWAMBACH et al., 2008; WENDLING et al., 2000; WENDLING et al., 2010; WENDLING; XAVIER, 2005). Contudo, as aplicações e

concentrações ainda não estão estabelecidas para a rizogênese em miniestacas de *Eucalyptus benthamii*.

Apesar de todas as vantagens da propagação (HARTMANN et al., 2011), a dificuldade de enraizamento de estacas provenientes de árvores adultas e a variação entre clones quanto ao enraizamento ainda constituem problemas a serem superados, bem como, a maior sensibilidade das miniestacas às condições ambientais, a necessidade de maior rapidez entre a coleta e armazenamento a baixas temperaturas dos propágulos do minijardim clonal e a sua estadia em casa de vegetação e, a necessidade de um cronograma de produção melhor sincronizado (ALFENAS et al., 2004).

Mesmo com todos os avanços proporcionados pela aplicação da miniestaquia (ALFENAS et al., 2004; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009) são escassas as divulgações científicas quanto a eficiência da técnica em termos de otimização das instalações do viveiro durante a produção de mudas clonais para espécies de *Eucalyptus* difíceis de enraizar. Baseado nesse fato e, considerando as condições favoráveis à incidência de doenças na casa de vegetação durante o processo de formação de raízes, justifica-se o desenvolvimento de estudos relacionados a dinâmica de enraizamento de miniestacas, bem como a sua origem organogênica.

Com base no exposto, o presente trabalho apresenta as seguintes hipóteses e objetivos:

4.1.1 Hipóteses

- O enraizamento de miniestacas varia de acordo com o material genético, concentração de AIB e tempo de avaliação;
- O tempo ótimo de permanência das miniestacas enraizadas em casa de vegetação varia de acordo com o material genético, concentração de AIB e tempo de avaliação;
- A indução da raiz adventícia varia de acordo com a concentração de AIB e tempo de avaliação, sendo possível identificar a origem da conexão vascular.

4.1.2 Objetivos

- Determinar a melhor concentração de AIB para o enraizamento de miniestacas em relação ao material genético e tempo de avaliação;
- Determinar o tempo ótimo de permanência das miniestacas enraizadas em casa de vegetação em relação ao material genético, concentração de AIB e tempo de avaliação;
- Analisar histologicamente o enraizamento adventício em relação a concentração de AIB e tempo de avaliação visando identificar a origem da conexão vascular.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Caracterização geral

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

4.2.2 Constituição do minijardim clonal e manejo das minicepas

Mudas clonais identificadas como BP101, BP118 e BP120 dos genótipos superiores de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage foram utilizadas para a instalação dos experimentos. As plantas matrizes foram provenientes de teste de progênies com dois anos e seis meses de idade, o qual foi estabelecido no espaçamento 2,0 x 3,0 m em Concórdia-SC. O lote de sementes foi adquirido da população base genética de *Eucalyptus benthamii* da Embrapa Florestas-CNPq, Colombo-PR.

As unidades experimentais foram compostas por mudas clonais propagadas pelo processo de miniestaca com aplicação de 2.000 mg L⁻¹ de AIB, as quais foram plantadas no espaçamento de 10 x 10 cm em minijardim clonal conduzido em sistema semihidropônico sem proteção (Figura 1 A-B). A solução nutritiva foi composta por macro e micronutrientes, sendo distribuída manualmente (4 L m⁻²) duas vezes ao dia (Tabela 1).



Figura 1 - Detalhe do estabelecimento do minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii* em condições de pleno sol em sistema semihidropônico com areia. (A) instante do plantio das mudas; (B) brotações aptas para a coleta, aos 90 dias após a instalação

Tabela 1 - Composição da solução nutritiva para o manejo do minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii*

Nutriente	Solução Nutritiva* (mg L ⁻¹)	
N-NO ₃ ⁻	90,11	
N-NH ₄ ⁺	61,06	
P	29,62	
Ca	128,99	
K	209,76	
S	107,15	
Mg	36,99	
B	0,481	
Cu	0,061	
Fe	5,000	
Mo	0,020	
Mn	1,463	
Zn	0,065	
Fonte de Macro e Micronutriente	FQ / PM (mg L ⁻¹)	
Nitrato de cálcio (Labsynth [®])	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O / 236,15	760,0
Sulfato de amônio (Merck [®])	(NH ₄) ₂ SO ₄ / 132,14	225,0
Monoamônio fostato (Mallinckrodt [®])	NH ₄ H ₂ PO ₄ / 115,03	110,0
Cloreto de potássio (Ecibra [®])	KCl / 74,56	400,0
Sulfato de magnésio (Mallinckrodt [®])	MgSO ₄ .7H ₂ O / 246,48	375,0
Sulfato de manganês (Ecibra [®])	MnSO ₄ .H ₂ O / 169,01	4,500
Ácido bórico (Ecibra [®])	H ₃ BO ₃ / 61,83	2,750
Sulfato de zinco (Mallinckrodt [®])	ZnSO ₄ .7H ₂ O / 287,54	0,285
Sulfato de cobre (Mallinckrodt [®])	CuSO ₄ .5H ₂ O / 249,68	0,240
Sulfato de ferro (Synth [®])	FeSO ₄ .7H ₂ O / 278,02	24,89
Sódio - EDTA (Nuclear [®])	Na ₂ -EDTA.2H ₂ O / 372,24	33,40
Molibdato de sódio (Merck [®])	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O / 241,95	0,050

* O pH foi ajustado para 6,2 a 25°C com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH), ambos a 1M. FQ = fórmula química, PM = peso molecular

4.2.3 Preparo das miniestacas

Coletaram-se brotações de minicepas do minijardim clonal correspondente a 4^a coleta de brotações. As miniestacas apresentaram comprimento de 7 cm (\pm 2 cm), com dois pares de folhas reduzidas a 50% da sua área total, mantendo-se o ápice (ponteira). A porção basal foi composta por dois pares de gemas sem as folhas (Figura 2 A-B).

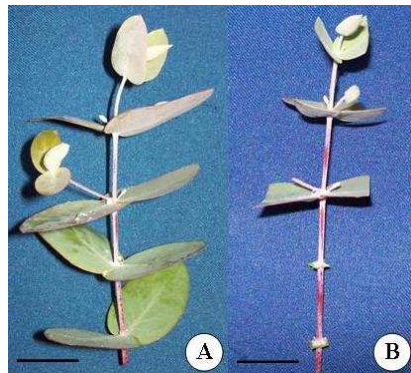


Figura 2 - Detalhe do preparo das miniestacas de *Eucalyptus benthamii*. (A) brotação contendo quatro pares de gemas e a ponteira; (B) miniestaca padronizada. Barra = 1,5 cm

4.2.4 Tratamentos e delineamento experimental

Após coleta dos brotos e padronização das miniestacas (BP101, BP118 e BP120) (Figura 2 A-B), a região basal foi mergulhada durante 10 segundos em solução hidroalcoólica (1:1, água:álcool, v/v) nas concentrações de 0 (isento de AIB), 1.000, 2.000, 3.000 e 4.000 mg L⁻¹ de AIB. As miniestacas foram acondicionadas em casa de vegetação para a indução da rizogênese. Durante os períodos de 0 (instante do plantio), 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após aplicação do AIB, foram coletadas 5 miniestacas de cada repetição para a determinação da porcentagem de enraizamento e do comprimento da maior raiz. Das miniestacas coletadas, efetuou-se amostragem da porção basal para analisar histologicamente o enraizamento nos períodos de 0 (instante do plantio), 7, 14, 21 e 28 dias após aplicação do AIB. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x5x7) com parcelas subdivididas no tempo, sendo os fatores constituídos por três clones (BP101, BP118 e BP120), cinco concentrações de AIB (0, 1.000, 2.000, 3.000 e 4.000 mg L⁻¹), sete tempos de avaliação (0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias), contendo cinco repetições de 50 miniestacas.

4.2.5 Análise histológica

As amostras foram fixadas em uma solução de formaldeído e glutaraldeído (KARNOVSKY, 1965) e submetidas a três séries de vácuo (\approx 620 kgf cm⁻²) por 15 minutos, para remoção do ar. Em seguida, as amostras foram desidratadas por meio de série alcoólica-

etífica em concentrações crescentes (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%, v/v), permanecendo em cada solução por 10 minutos, sendo em seguida, emblocadas em resina de hidroxietil metacrilato (Leica[®]). Os blocos contendo as amostras foram seccionados longitudinalmente ou transversalmente a 5 µm de espessura com o uso de micrótomo rotativo manual acoplado com navalha do tipo C. Os cortes obtidos foram corados com azul de toluidina (0,05%, v/v) em tampão fosfato e ácido cítrico (SAKAI, 1973) e montados em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan[®]). As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas com microscópio de luz (Zeiss-Jenemed2[®]) em escala micrométrica, sendo as imagens capturadas com câmera Samsung (SDC-313).

4.2.6 Condições de enraizamento

As miniestacas foram inseridas a 2 cm de profundidade em substrato composto pela mistura de vermiculita média e Basaplant Florestal[®] (2:1, v/v). Não foi realizada adubação de incorporação. Como recipiente de cultivo utilizou-se tubete cônico (55 cm³), que foi previamente desinfestado com solução contendo hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,25% de cloro ativo (v/v) por 48 horas. Para o enraizamento, as miniestacas permaneceram até os 42 dias em casa de vegetação automatizada com nebulização intermitente. Os dados da temperatura do ar referente a casa de vegetação corresponderam aos períodos de setembro a outubro de 2010 (Anexo B).

4.2.7 Análise estatística dos dados

Os dados mensurados de todos os experimentos foram submetidos ao teste de Hartley ($P < 0,05$) e Lilliefors ($P < 0,05$) e transformados quando necessário. Em seguida, foi realizada análise de variância (ANOVA, $P < 0,01$ e $P < 0,05$). De acordo com a significância da ANOVA, os dados dos fatores quantitativos foram submetidos a análise de regressão logística ($P < 0,01$ e $P < 0,05$). Utilizaram-se os pacotes SOC (EMBRAPA, 1990) e STATISTICAL PROGRAM (MSTAT, 1994) para a análise estatística dos dados.

4.3 Resultados

De acordo com a análise de variância para a porcentagem de enraizamento houve interação entre o tempo de avaliação e concentrações de AIB ($P < 0,01$) (Tabela 2), ou seja, os clones BP101, BP118 e BP120 apresentaram respostas semelhantes para cada concentração de AIB ao longo do tempo.

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de enraizamento (EN) de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone, tempo de avaliação e concentrações de AIB

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		EN ⁽¹⁾ (%)
Tempo (TEM)	6	5,796**
Resíduo-TEM	22	0,404**
Parcela-TEM	28	–
Clone (CLO)	2	2,491**
Regulador (AIB)	4	0,170*
CLO*AIB	8	0,058 ^{ns}
CLO*TEM	12	0,079 ^{ns}
AIB*TEM	24	0,570**
CLO*AIB*TEM	48	0,055 ^{ns}
Resíduo	308	0,056
Subparcela	434	–
Média	–	23,7
CV _{exp.} (%)	–	46,8

^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. * e ** Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. ⁽¹⁾ Dados transformados por $(n/100)^{0,5}$, onde n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental

O tratamento sem a presença de AIB (Figura 3 A) apresentou emissão de raízes somente aos 28 dias (22,2% de enraizamento), semelhante a concentração de 1.000 mg L⁻¹ de AIB (33,3% de enraizamento) (Figura 3 B). Os tratamentos correspondentes as concentrações de 2.000 mg L⁻¹ (Figura 3 C), 3.000 mg L⁻¹ (Figura 3 D) e 4.000 mg L⁻¹ de AIB (Figura 3 E) apresentaram miniestacas enraizadas aos 21 dias, sendo que aos 28 dias, a porcentagem de enraizamento foi de 44,4%, 44,4% e 55,5%, respectivamente. Esse fato justifica a aplicação de AIB para obter maior velocidade e indução de raízes adventícias em concentrações iguais ou superiores a 2.000 mg L⁻¹ (Figura 3 C). Aos 45 dias, a porcentagem de enraizamento apresentou valores semelhantes em relação as concentrações de AIB (variação de 60,0% a 77,7% de enraizamento), independente do clone avaliado.

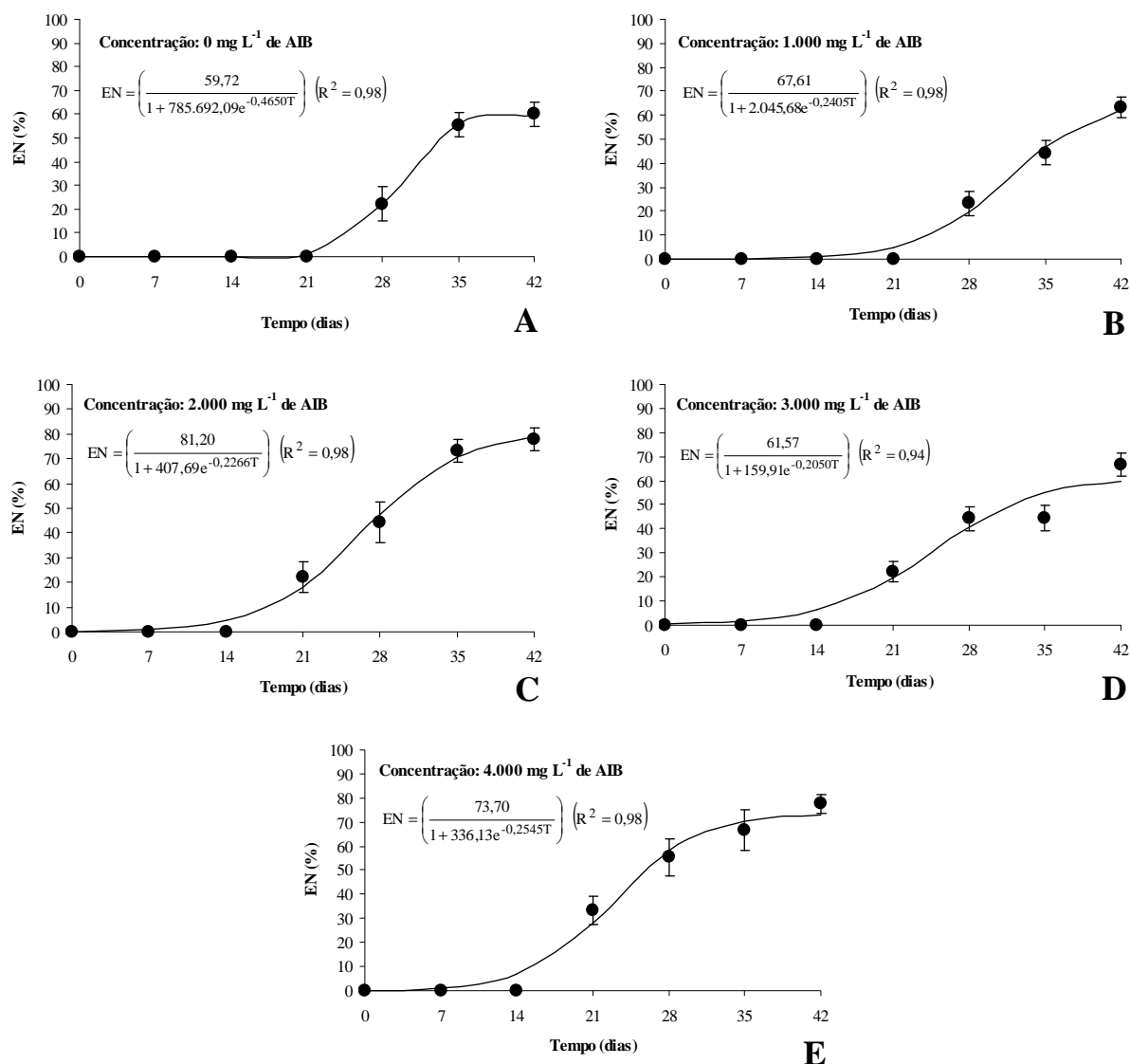


Figura 3 - Porcentagem de enraizamento (EN) de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* em relação ao tempo de avaliação e concentração de AIB. (A) sem aplicação de AIB, (B) aplicação de 1.000 mg L⁻¹ de AIB, (C) aplicação de 2.000 mg L⁻¹ de AIB, (D) aplicação de 3.000 mg L⁻¹ de AIB e (E) aplicação de 4.000 mg L⁻¹ de AIB

O comprimento da maior raiz variou significativamente em relação ao tempo de avaliação e concentrações de AIB ($P < 0,01$), ou seja, os clones apresentaram comportamento semelhante quanto ao comprimento da maior raiz ao longo do período considerado (Tabela 3).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para o comprimento da maior raiz (CMR) de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone, tempo de avaliação e concentrações de AIB

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		CMR ⁽¹⁾ (cm miniestaca ⁻¹)
Tempo (TEM)	6	0,7346**
Resíduo-TEM	22	0,0034**
Parcela-TEM	28	–
Clone (CLO)	2	0,0052**
Regulador (AIB)	4	0,0012**
CLO*AIB	8	0,0001 ^{ns}
CLO*TEM	12	0,0001 ^{ns}
AIB*TEM	24	0,0055**
CLO*AIB*TEM	48	0,0004 ^{ns}
Resíduo	263	0,0005
Subparcela	389	–
Média	–	1,96
CV _{exp.} (%)	–	31,9

^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ** Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F. ⁽¹⁾ Dados transformados por $(n/100)^{0,5}$, onde n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental

Os tratamentos sem aplicação de AIB (Figura 4 A) e 1.000 mg L⁻¹ de AIB (Figura 4 B) apresentaram crescimento mais lento da raiz em relação aos demais tratamentos, correspondendo a raízes com 1,3 cm e 1,1 cm de comprimento, respectivamente aos 28 dias. Os maiores valores do comprimento da maior raiz no recipiente de cultivo foram verificados para os tratamentos com 2.000 mg L⁻¹ (Figura 4 C), 3.000 mg L⁻¹ (Figura 4 D) e 4.000 mg L⁻¹ de AIB (Figura 4 E), apresentando raízes com 1,6 cm, 2,8 cm e 4,0 cm de comprimento, respectivamente aos 28 dias.

Aos 35 dias a maioria dos tratamentos apresentou valores maiores que 5 cm, menos o controle (sem AIB), o qual apresentou 2,7 cm. Aos 42 dias, o tratamento sem aplicação de AIB foi o que apresentou os menores resultados do comprimento da maior raiz. O comprimento da maior raiz para as concentrações de 1.000 mg L⁻¹ (Figura 4 B) e 2.000 mg L⁻¹ de AIB (Figura 4 C) apresentou valores semelhantes aos 42 dias.

Em termos gerais, a presença de AIB nas concentrações de 2.000, 3.000 e 4.000 mg L⁻¹ (Figura 4 C-E) promoveu resultados positivos para o comprimento da maior raiz em todos os materiais genéticos avaliados. A concentração de 2.000 mg L⁻¹ de AIB (Figura 4 C) apresentou os melhores valores para a velocidade de enraizamento e comprimento da maior raiz. Os tratamentos de 3.000 mg L⁻¹ e 4.000 mg L⁻¹ de AIB (Figura 4 D-E) também apresentaram efeitos promissores, porém não se justifica usar essas concentrações para os

materiais genéticos (BP101, BP118 e BP120), pois as respostas foram semelhantes a concentração de 2.000 mg L⁻¹ de AIB (Figura 4 C).

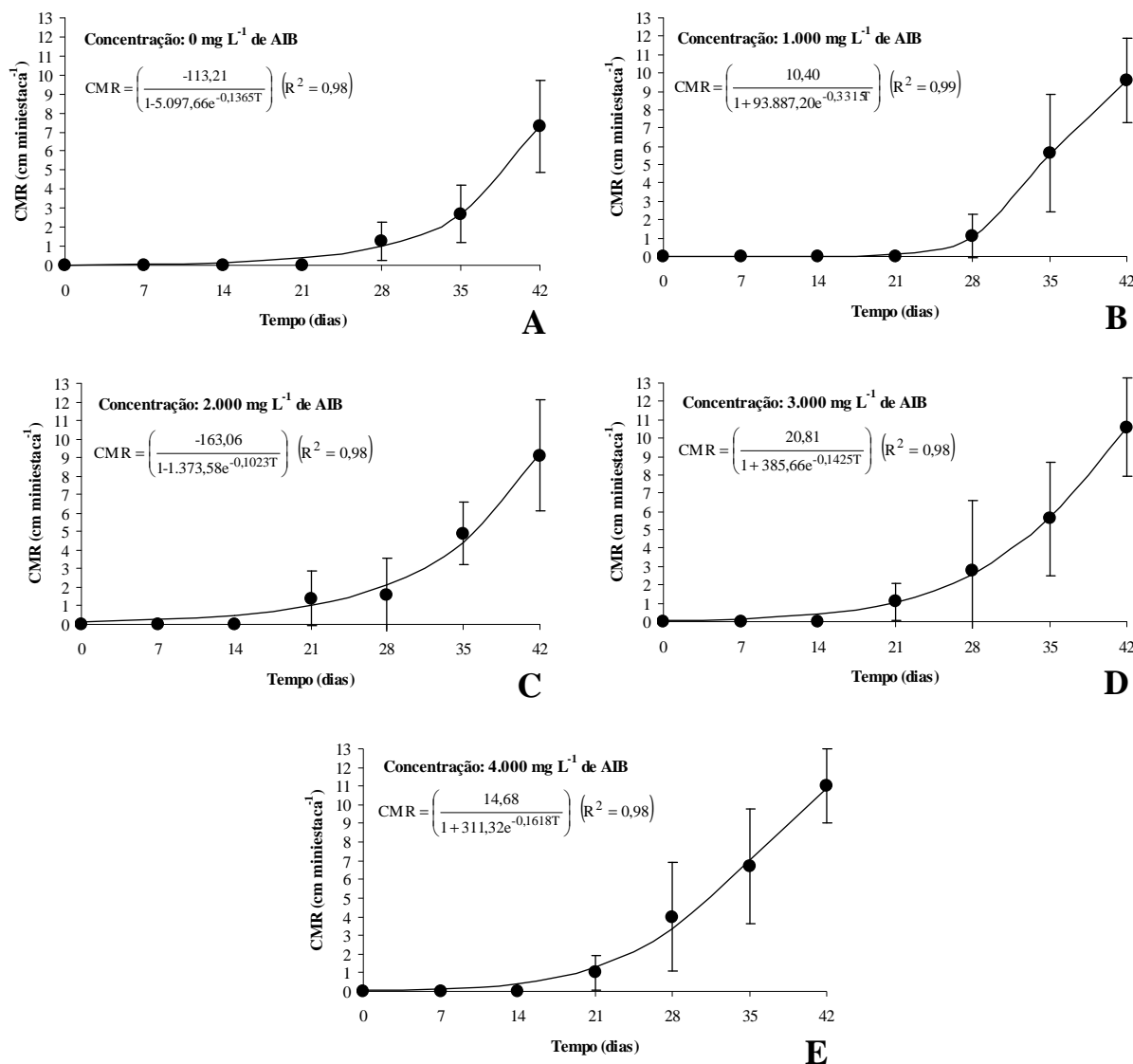


Figura 4 - Comprimento da maior raiz (CMR) de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* em relação ao tempo de avaliação e concentração de AIB. (A) sem aplicação de AIB, (B) aplicação de 1.000 mg L⁻¹ de AIB, (C) aplicação de 2.000 mg L⁻¹ de AIB, (D) aplicação de 3.000 mg L⁻¹ de AIB e (E) aplicação de 4.000 mg L⁻¹ de AIB

Nas análises anatômicas das miniestacas no início do experimento (0 dias), pode-se observar disposição normal do córtex, câmbio vascular, vasos condutores e a presença de ductos condutores subepidérmicos (Figura 5 A-E). Aos sete dias de cultivo após a entrada das miniestacas na casa de vegetação para o enraizamento verifica-se que não ocorreu alteração da organização celular dos tecidos (Figura 5 F-J). Porém aos 14 dias, percebe-se a formação de centros meristemáticos junto ao câmbio vascular nos tratamentos com 0, 1.000, 2.000 e

3.000 mg L⁻¹ de AIB. Os tratamentos com 3.000 e 4.000 mg L⁻¹ de AIB apresentaram desestruturação tecidual com a formação de calos internos (Figura 5 K-O). Aos 21 dias, verificou-se a polarização do ápice radicial e indução de raiz adventícia nos tratamentos com 0, 1.000, 2.000, 3.000 e 4.000 mg L⁻¹, contudo observa-se a desestruturação dos tecidos na concentração de 4.000 mg L⁻¹ (Figura 5 P-T). Aos 28 dias, ocorreu indução de raiz adventícia apresentando conexão com o câmbio vascular para os tratamentos com 0, 1.000, 2.000 e 3.000 mg L⁻¹ de AIB. Contudo ocorreu a indução de calos externos e total desestruturação tecidual no tratamento com 4.000 mg L⁻¹ (Figura 5 U-W) com posterior enraizamento adventício, indicando conexão indireta com o câmbio vascular.

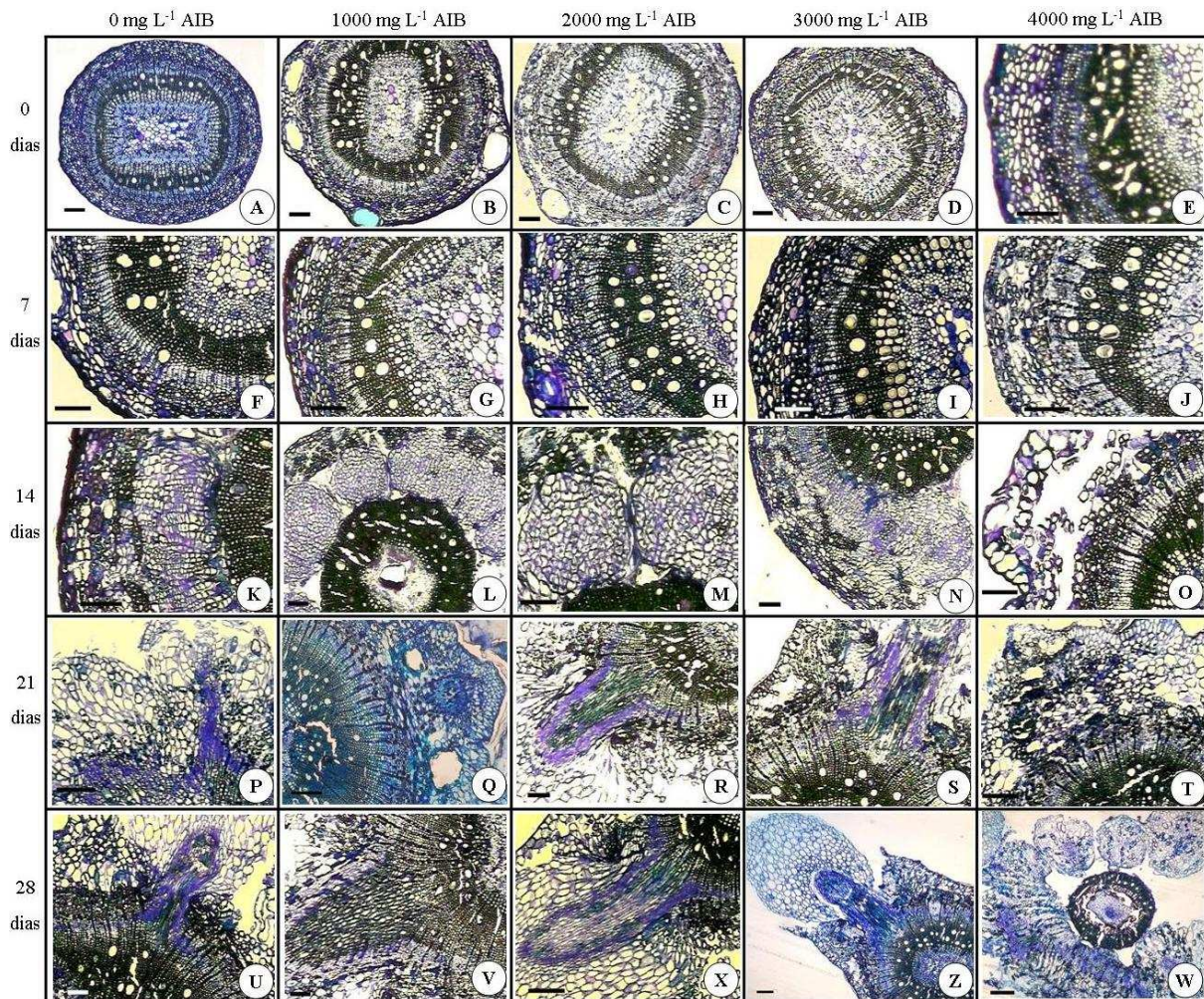


Figura 5 - Histologia do enraizamento em miniestacas de *Eucalyptus benthamii*. (A-E) corte transversal da região do caule após o tratamento com AIB, 0 dias; (F-J) corte transversal da região do caule tratada com AIB, 7 dias; (K-O) corte transversal da região do caule tratada com AIB apresentando formação de centros meristemáticos junto ao câmbio vascular, 14 dias; (P-T) corte transversal da região do caule tratada com AIB apresentando indução da raiz adventícia, 21 dias e (U-W) corte transversal da região do caule tratada com AIB apresentando raiz adventícia, 28 dias. Barra: 100µm

4.4 Discussão

Inúmeros protocolos envolvendo estaquia e miniestaquia foram desenvolvidos para espécies de *Eucalyptus* (ALFENAS et al., 2004), contudo, para o *Eucalyptus benthamii*, ainda não existe protocolo adequado quanto a propagação de genótipos selecionados, sendo necessários ajustes para aumentar a qualidade e quantidade das mudas clonais da espécie. Em se tratando da miniestaquia, a técnica demonstrou viabilidade para a produção de brotações aptas a serem enraizadas em casa de vegetação e garantir uma produção constante de mudas durante todo o ano (CUNHA; WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2005). Contudo, mesmo com os avanços biotecnológicos, pouco se conhece a respeito das características organogênicas das raízes adventícias, bem como, da velocidade da indução do enraizamento, os quais podem ser usados como parâmetros para modelar matematicamente o tempo de permanência dos propágulos em casa de vegetação (FERREIRA et al., 2004; GOULART; XAVIER, 2008; TITON; XAVIER; OTONI, 2002), otimizando a produção de mudas no viveiro florestal.

A aplicação de auxinas na região basal de estacas e miniestacas têm sido difundida e empregada mundialmente para o enraizamento de inúmeras espécies lenhosas (HARTMANN et al., 2011; SCHWAMBACH et al., 2008; WENDLING et al., 2010), influenciando, também, a sobrevivência e enraizamento de microestacas de espécies consideradas recalcitrantes ao enraizamento (BENNETT; MCDAVID; MCCOMB, 2003; SCHWAMBACH; FADANELLI; FETT-NETO, 2005). Nesse sentido, destaca-se a enorme variação entre as concentrações usadas, formulações e formas de aplicações de auxinas (ALMEIDA et al., 2007; BRONDANI, 2008; BRONDANI et al., 2010a; BRONDANI et al., 2010b; FOGAÇA; FETT-NETO, 2005; SCHWAMBACH et al., 2008; WENDLING et al., 2000; WENDLING et al., 2010; WENDLING; XAVIER, 2005). Não obstante, sabe-se que o AIB potencializa a indução de raízes em propágulos, mas dependendo do manejo adotado e do material genético, as concentrações devem ser ajustadas para obter melhores índices de enraizamento (BENNETT; MCDAVID; MCCOMB, 2003; CORRÊA; FETT-NETO, 2004; STAPE; GONÇALVES; GONÇALVES, 2001). No presente estudo o *Eucalyptus benthamii* respondeu positivamente ao enraizamento a partir das concentrações iguais ou superiores a 2.000 mg L^{-1} , semelhante aos relatados para *Eucalyptus cloeziana* (ALMEIDA et al., 2007) e *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* (BRONDANI et al., 2010a; BRONDANI et al., 2010b).

Como efeito indutivo do AIB, as raízes adventícias podem surgir em uma grande variedade de tecidos a partir de agregados de células maduras que renovam sua atividade de

divisão celular, as quais se desenvolvem em meristema apical da raiz de maneira análoga a formação de raízes laterais (FOGAÇA; FETT-NETO, 2005), sendo o enraizamento em propágulos, especialmente controlado pelos teores endógenos de auxinas (LI et al., 2009; ZHU et al., 2010). Contudo, tem sido verificado que aplicações exógenas de auxinas aumentam a porcentagem de enraizamento devido a capacidade de atuação nos tecidos vegetais localizados próximos a região de contato com o regulador de crescimento (FOGAÇA; FETT-NETO, 2005; HUSEN; PAL, 2007). A aplicação de AIB atua como agente sinalizador para o aumento da concentração de auxinas endógenas, onde o acúmulo da concentração de AIB na região basal da estaca atua como agente metabolizante e de sinalização dos processos de indução do enraizamento adventício (HUSEN, 2008). Durante o contato externo com a célula, o AIB induz alterações no metabolismo de enzimas, carboidratos, RNA, DNA, proteínas, sendo que essas mudanças nas zonas de enraizamento podem inibir ou promover a regeneração de raízes, principalmente durante a divisão e diferenciação celular (BALTIERRA; MONTENEGRO; GARCÍA, 2004; DAI; CHENG; SARGENT, 2004; HUSEN; PAL, 2007; KOMATSU et al., 2011; ZHU et al., 2010).

Por outro lado, a baixa temperatura pode inibir a atividade de auxinas endógenas (CORRÊA; FETT-NETO, 2004; RASMUSSEN; SMITH; HUNT, 2009). Esse evento fisiológico pode ocorrer quando a coleta de brotações é realizada distante do local do preparo das estacas, onde os propágulos são transportados por longos períodos em recipientes e sob baixa temperatura. Estudos demonstraram que ocorre redução do transporte basípeto de AIA quando a temperatura é reduzida de 25°C para 4°C (GARRIDO et al., 2002), o que pode influenciar a redução da indução de raízes nas miniestacas durante as estações mais frias. Rasmussen, Smith e Hunt (2009) verificaram forte influência da temperatura durante a organogênese de raízes adventícias em estacas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, onde baixas temperaturas favoreceram a sobrevivência das estacas, porém reduziu a porcentagem de enraizamento. Por outro lado, elevadas temperaturas também apresentam efeitos negativos à rizogênese, sobretudo em relação a absorção de nutrientes e desnaturação de enzimas (CORRÊA; FETT-NETO, 2004; FETT-NETO et al., 2001; RASMUSSEN; SMITH; HUNT, 2009), sendo que a sensibilidade aos efeitos deletérios em condições de elevadas temperaturas também pode estar relacionada as características adaptativas de cada genótipo (ALFENAS et al., 2004; HARTMANN et al., 2011). Apesar desses relatos, pouco se conhece a respeito dos efeitos da temperatura nos vários estádios de desenvolvimento radicial a nível celular, particularmente de espécies lenhosas (CORRÊA;

FETT-NETO, 2004; RASMUSSEN; SMITH; HUNT, 2009) e serão necessárias pesquisas para evidenciar tais interferentes e/ou alterações fisiológicas.

Outro problema observado em espécies difíceis de enraizar envolve o elevado tempo de permanência em condições de casa de vegetação (elevada umidade relativa do ar e temperatura do ar) para a indução da rizogênese, o que pode ocasionar mortalidade das mudas e aparecimento de doenças (FERREIRA et al., 2004; GOULART; XAVIER, 2008; ZHU et al., 2010). Quando os propágulos permanecem por muito tempo em elevada temperatura e umidade relativa do ar ocorre degradação de auxinas na região basal do propágulo (RASMUSSEN; SMITH; HUNT, 2009) efeito que pode prejudicar a indução da raiz adventícia e favorecer a formação de calo na região basal. Dessa forma, é importante estabelecer um tempo ótimo de permanência em casa de vegetação para otimizar a produção de mudas e minimizar as perdas. Em se tratando do *Eucalyptus benthamii*, nossos dados sugerem que as miniestacas devem permanecer entre 35 a 42 dias em casa de vegetação para indução do enraizamento, podendo existir variações devido ao material genético, condições de controle e época do ano. Porém, nesse caso, o tempo de permanência em casa de vegetação ainda pode ser reduzido com o avanço do melhoramento da espécie e pela seleção de genótipos que apresentam maiores índices de enraizamento, tendo em vista a sensibilidade ao enraizamento das espécies de *Eucalyptus* de clima subtropical em relação a variação da temperatura (CORRÊA; FETT-NETO, 2004).

Em outras condições de trabalho, Ferreira et al. (2004) verificaram que o tempo ótimo de enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus* spp. (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus saligna*) variou de 20 a 30 dias, sendo menor o tempo de permanência em casa de vegetação desses materiais genéticos em relação ao verificado no presente estudo para o *Eucalyptus benthamii*. Considerando que os híbridos eram compostos por espécies de *Eucalyptus* de clima tropical (FERREIRA et al., 2004), esse fato está de acordo com as observações de Alfenas et al. (2004), Assis e Mafia (2007) e Corrêa e Fett-Netto (2004) em que as espécies de *Eucalyptus* de clima subtropical necessitam de maior tempo de permanência em casa de vegetação para a indução da rizogênese. Esse fato sugere que as instalações do viveiro deverão ser ajustadas com base na realização de futuros experimentos que visem adequar a sobrevivência e enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii*, sobretudo ao considerar as condições ambientais da casa de vegetação, e dessa forma, buscar reduzir o tempo de produção da muda clonal.

A conexão vascular da raiz adventícia é outro ponto chave que deve ser levado em consideração quando se trata da qualidade da muda produzida. Geralmente, a presença de calo

ocupando uma região de conexão vascular apresenta-se como problemático, pois a região de conexão é muito frágil, além de comprometer a funcionalidade total da raiz (LI et al., 2009). É desejável que a conexão vascular tenha origem direta do câmbio vascular, o que influencia a funcionalidade da raiz. A formação de calo na região basal dos propágulos está diretamente associado a indução de raízes adventícias, sendo um evento importante para a diferenciação celular (AMRI et al., 2010; BALTIERRA; MONTENEGRO; GARCÍA, 2004; ZHU et al., 2010). Porém, os dados do presente estudo sugerem que a indução da raiz adventícia a partir do calo formou uma conexão muito frágil com o câmbio vascular, sendo que a raiz pode romper essa ligação com muita facilidade durante a repicagem e plantio da muda a campo. As raízes formadas sem a presença de calo externo apresentaram maior estabilidade da conexão vascular, não ocorrendo o rompimento dos tecidos formados com facilidade, semelhante ao relatado para *Eucalyptus globulus* (BALTIERRA; MONTENEGRO; GARCÍA, 2004). As raízes assim formadas apresentaram maior vigor de desenvolvimento e crescimento.

4.5 Conclusões

- A porcentagem de enraizamento entre os materiais genéticos não diferiu em relação a aplicação de AIB;
- Os tratamentos de AIB apresentaram resultados positivos ao enraizamento, considerando que a concentração de 2.000 mg L⁻¹ favoreceu maior velocidade e porcentagem de enraizamento, sendo que a indução de raiz iniciou-se aos 21 dias;
- O tempo ótimo de permanência das miniestacas enraizadas em casa de vegetação variou de 35 a 42 dias, independente do material genético e concentrações de AIB;
- As análises histológicas da rizogênese permitiram verificar a formação de centros meristemáticos junto ao câmbio vascular, sendo que a raiz adventícia apresentou conexão direta com o câmbio vascular.

Referências

- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442 p.
- ALMEIDA, F.D.; XAVIER, A.; DIAS, J.M.M.; PAIVA, H.N. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 455–463, 2007. DOI: 10.1590/S0100-67622007000300011
- AMRI, E.; LYARUU, H.V.M.; NYOMORA, A.S.; KANYEKA, Z.L. Vegetative propagation of African Blackwood (*Dalbergia melanoxylon* Guill. & Perr.): effects of age of donor plant, IBA treatment and cutting position on rooting ability. **New Forests**, Dordrecht, v. 39, n. 2, p. 183–194, 2010. DOI: 10.1007/s11056-009-9163-6
- ASSIS, T.F.; MAFIA, R.G. Hibridação e clonagem. In: BOREM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 93–121.
- BALTIERRA, X.C.; MONTENEGRO, G.; GARCÍA, D. Ontogeny of *in vitro* rooting processes in *Eucalyptus globulus*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 499–503, 2004. DOI: 10.1079/IVP2004559
- BENNETT, I.J.; MCDAVID, D.A.J.; MCCOMB, J.A. The influence of ammonium nitrate, pH and índole butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated *Eucalyptus globulus*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 47, n. 3, p. 355–360, 2003. DOI: 10.1023/B:BIOP.0000023877.21262.a5
- BENSON, D.; MCDOUGALL, L. Ecology of Sydney plant species. Part 6 Dicotyledon family Myrtaceae. **Cunninghamia**, Sydney, v. 5, n. 4, p. 809–987, 1998.
- BENSON, D.H. Aspects of the ecology of a rare tree species, *Eucalyptus benthamii*, at Bents Basin, Wallacia. **Cunninghamia**, Sydney, v. 1, n. 3, p. 371–383, 1985.
- BRONDANI, G.E. **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2008. 118 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BRONDANI, G.E.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Determinação do tempo ótimo de enraizamento para miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. In: REUNIÓN ARGENTINA DE FISIOLÓGÍA VEGETAL, 28., 2010, La Plata. **Libro de Resúmenes...** La Plata: Asociación Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal, 2010. p. 194. 1 CD-ROM.
- BRONDANI, G.E.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; DUTRA, L.F.; ARAUJO, M.A. Aplicação de IBA para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 667–674, 2010a. DOI: 10.4025/actasciagron.v32i4.4879
- BRONDANI, G.E.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; DUTRA, L.F.; ARAUJO, M.A. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*: (II) sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das coletas e estações do ano. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 3, p. 453–465, 2010b.

- BUTCHER, P.A.; SKINNER, A.K.; GARDINER, C.A. Increased inbreeding and inter-species gene flow in remnant populations of the rare *Eucalyptus benthamii*. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 6, n. 2, p. 213–226, 2005. DOI: 10.1007/s10592-004-7830-x
- CORRÊA, L.R.; FETT-NETO, A.G. Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 315–324, 2004. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2004.05.006
- CUNHA, A.C.M.C.M.; WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. Produtividade e sobrevivência de minicepas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage em sistema de hidroponia e em tubete. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 307–310, 2005.
- DAI, W.; CHENG, Z.M.; SARGENT, W.A. Expression of the *rolB* gene enhances adventitious root formation in hardwood cuttings of aspen. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 40, n. 4, p. 366–370, 2004. DOI: 10.1079/IVP2004556
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Programa SOC - software científico: versão 2.1**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 1990.
- FERREIRA, E.M.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; LEITE, H.G.; SARTORIO, R.C.; PENCHEL FILHO, R.M. Determinação do tempo ótimo do enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 183–187, 2004. DOI: 10.1590/S0100-67622004000200004
- FETT-NETO, A.G.; FETT, J.P.; GOULART, L.W.V.; PASQUALI, G.; TERMIGNONI, R.R.; FERREIRA, A.G. Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 21, n. 7, p. 457–464, 2001. DOI: 10.1093/treephys/21.7.457
- FOGAÇA, C.M.; FETT-NETO, A.G. Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 45, n. 1, p. 1–10, 2005. DOI: 10.1007/s10725-004-6547-7
- GARRIDO, G.; GUERRERO J.R.; CANO, E.A.; ACOSTA, M.; SÁNCHEZ-BRAVO, J. Origin and basipetal transport of the IAA responsible for rooting of carnation cuttings. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 114, n. 2, p. 303–312, 2002. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2002.1140217.x
- GOULART, P.B.; XAVIER, A. Efeito do tempo de armazenamento de miniestacas no enraizamento de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 671–677, 2008. DOI: 10.1590/S0100-67622008000400008
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8th ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2011. 915 p.
- HUSEN, A. Clonal propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. and associated metabolic changes during adventitious root primordium development. **New Forests**, Dordrecht, v. 36, n. 1, p. 13–27, 2008. DOI: 10.1007/s11056-007-9079-y

- HUSEN, A.; PAL, M. Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectona grandis* Linn. f. (teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment. **New Forests**, Dordrecht, v. 33, n. 3, p. 309–323, 2007. DOI: 10.1007/s11056-006-9030-7
- JOVANOVIC, T.; BOOTH, T.H. **Improved species climatic profiles**. Australia: Union Offset Printing, Joint Venture Agroforestry Program, Rural Industries Research and Development Corporation, 2002. 68 p.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137–138, 1965.
- KOMATSU, Y.H.; BATAGIN-PIOTTO, K.D.; BRONDANI, G.E.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. *In vitro* morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides*. **Journal of Forestry Research**, Harbin, v. 22, n. 2, p. 209–215, 2011. DOI: 10.1007/s11676-011-0152-1
- LI, S.W.; XUE, L.; XU, S.; FENG, H.; AN, L. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **The Botanical Review**, New York, v. 75, n. 2, p. 230–247, 2009. DOI: 10.1007/s12229-009-9029-9
- MSTAT. **Statistical program**. Michigan, USA: Michigan State University, Crop and Soil Department Science, 1994.
- MUJIU, L.; ARNOLD, R.; BOHAI, L.; MINSHENG, Y. Selection of cold-tolerant eucalypts for Hunan Province. In: TURNBULL, J.W. (Ed.). **Eucalypts in Asia**: proceedings of a international conference held in Zhanjiang, Guangdong, people's Republic of China. Canberra: Elect Printing, 2003. p. 107–116. (ACIAR. Proceedings, 111).
- RASMUSSEN, A.; SMITH, T.E.; HUNT, M.A. Cellular stages of root formation, root system quality and survival of *Pinus elliottii* var. *elliottii* x *P. caribaea* var. *hondurensis* cuttings in different temperature environments. **New Forests**, Dordrecht, v. 38, n. 3, p. 285–294, 2009. DOI: 10.1007/s11056-009-9147-6
- SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Biotechnic and Histochemistry**, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 247–249, 1973. DOI: 10.3109/10520297309116632
- SCHWAMBACH, J.; FADANELLI, C.; FETT-NETO, A.G. Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 487–494, 2005. DOI: 10.1093/treephys/25.4.487
- SCHWAMBACH, J.; RUEDELL, C.M.; ALMEIDA, M.R.; PENCHEL, R.M.; ARAÚJO, E.F.; FETT-NETO, A.G. Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* x *maidennii* mini-cuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. **New Forests**, Dordrecht, v. 36, n. 3, p. 261–271, 2008. DOI: 10.1007/s11056-008-9099-2
- STAPE, J.L.; GONÇALVES, J.L.M.; GONÇALVES, A.N. Relationships between nursery practices and field performance for *Eucalyptus* plantations in Brazil. **New Forests**, Dordrecht, v. 22, n. 1/2, p. 19–41, 2001. DOI: 10.1023/A:1012271616115

- TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Dinâmica do enraizamento de microestacas de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 6, p. 665–673, 2002. DOI: 10.1590/S0100-67622002000600003
- WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 921–930, 2005.
- WENDLING, I.; BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; HANSEL, F.A. Mini-cuttings technique: a new *ex vitro* method for clonal propagation of sweetgum. **New Forests**, Dordrecht, v. 39, n. 3, p. 343–353, 2010. DOI: 10.1007/s11056-009-9175-2
- WENDLING, I.; XAVIER, A.; GOMES, J.M.; PIRES, I.E.; ANDRADE, H.B. Efeito do regulador de crescimento AIB na propagação de clones de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 187–192, 2000.
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Editora da UFV, 2009. 272 p.
- ZHU, X.Y.; CHAI, S.J.; CHEN, L.P.; ZHANG, M.F.; YU, J.Q. Induction and origin of adventitious roots from chimeras of *Brassica juncea* and *Brassica oleracea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 101, n. 3, p. 287–294, 2010. DOI: 10.1007/s11240-010-9686-8

5 MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus benthamii* VISANDO A FORMAÇÃO DE UM MICROJARDIM CLONAL

Resumo

O *Eucalyptus benthamii* é uma espécie importante para a composição de plantios florestais em regiões frias, porém existem dificuldades para a obtenção de mudas clonais, principalmente devido aos baixos índices de enraizamento, sendo que a micropropagação pode proporcionar avanços na área de melhoramento florestal da espécie. Objetivou-se desenvolver um método de clonagem de genótipos selecionados de *Eucalyptus benthamii* através da técnica de micropropagação visando a formação de um microjardim clonal. Para a multiplicação de gemas axilares foram avaliados dois clones (BP101 e BP118), três meios de cultura (WPM, JADS e MS) e combinações de BAP (0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mg L⁻¹) e ANA (0; 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100 mg L⁻¹). O número de gemas emitidas por explante foi avaliado aos 60 dias após a inoculação. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2x3x5x5), contendo cinco repetições com 10 explantes. Para o alongamento de brotações foram testadas combinações de GA₃ (0; 0,1; 0,2 e 0,3 mg L⁻¹) e BAP (0; 0,05 e 0,10 mg L⁻¹). O número de brotações alongadas e o comprimento médio da brotação por explante foram avaliados aos 60 dias após a inoculação. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2x3x4), contendo cinco repetições com cinco explantes. Comparou-se o enraizamento *in vitro* e *ex vitro* e aclimatização das mudas clonais. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2x2), contendo seis repetições com 10 brotações. Amostras da folha, caule, raiz e gemas axilares foram coletadas para análises histológicas. A multiplicação *in vitro* de gemas axilares de *Eucalyptus benthamii* depende do material genético, meio de cultura e concentração de regulador de crescimento, sendo que as melhores respostas foram obtidas em meio de cultura WPM suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA. O alongamento de brotações depende do material genético e regulador de crescimento, sendo que os melhores resultados foram obtidos em meio de cultura isento de GA₃ e BAP. A partir das análises histológicas verificou-se que o enraizamento *in vitro* e *ex vitro* foram bem sucedidos, resultando em raízes adventícias normais e apresentando conexão direta com o câmbio vascular. O protocolo de micropropagação foi eficiente para a produção de microplantas de *Eucalyptus benthamii* e pode ser usado para a formação de um microjardim clonal, inclusive podendo ser adotado para a propagação clonal de outras espécies.

Palavras-chave: Multiplicação; Alongamento; Enraizamento *in vitro* e *ex vitro*; Aclimatização; Microcepa

Abstract

Eucalyptus benthamii is an important component of forestry plantations in cold regions, but it is difficult to obtain clonal plants of this species, especially by low adventitious rooting. The micropropagation technique can provide advances in the forest improvement this species. The aim of this study was to develop a method for cloning of selected genotypes of *Eucalyptus benthamii* using a micropropagation technique for the formation of a clonal micro-garden. For *in vitro* multiplication of axillary buds, two clones (BP101 and BP118), three culture medium (WPM, JADS and MS) and BAP (0; 0.25; 0.50; 0.75 and 1.0 mg L⁻¹) and NAA (0; 0.025; 0.050; 0.075 and 0.100 mg L⁻¹) combinations were tested. The number of axillary buds per explant was evaluated at 60 days after inoculation. The experiment was

conducted in completely randomized design in factorial arrangement (2x3x5x5), containing five replications with 10 explants. For the shoots elongation, GA₃ (0; 0.1; 0.2 and 0.3 mg L⁻¹) and BAP (0; 0.05 and 0.10 mg L⁻¹) combinations were tested. The number of elongated shoots and the average length of shoots per explant were evaluated at 60 days after inoculation. The experiment was conducted in completely randomized design in factorial arrangement (2x3x4), containing five replications with five explants. The *in vitro* and *ex vitro* rooting, and acclimatization of microplants were compared. The experiment was conducted in completely randomized design in factorial arrangement (2x2), containing six replications with 10 explants. Samples of leaf, stem, root and axillary buds were collected for histological analysis. The *in vitro* axillary buds multiplication of *Eucalyptus benthamii* depends of the genetic material, culture medium and concentration of plant growth regulator, and the best responses were obtained in WPM culture medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ BAP and 0.05 mg L⁻¹ NAA. The elongation of shoots depends of the genetic material and plant growth regulator, and the best results were obtained in culture medium free of GA₃ and BAP. The histological analysis showed that both *in vitro* and *ex vitro* rooting were successful, resulting in normal adventitious roots showing direct connection with the vascular cambium. The micropropagation protocol was efficient for the microplants production of *Eucalyptus benthamii* and can be used for the formation of a clonal micro-garden, including can be adopted for clonal propagation of other species.

Keywords: Multiplication; Elongation; *In vitro* and *ex vitro* rooting; Acclimatization; Micro-stumps

5.1 Introdução

A micropropagação envolve a produção de plantas a partir de órgãos, tecidos ou células, os quais são cultivados *in vitro* sob condições assépticas em meio de cultura adequado e com rigoroso controle das condições ambientais e nutricionais (GEORGE; HALL; De KLERK, 2008; MERKLE; NAIRN, 2005; THORPE, 2007). É uma técnica que possibilita a obtenção de grande número de plantas a partir de poucas matrizes, em curto espaço de tempo e em área reduzida (DAVEY; ANTHONY, 2010; HARTMANN et al., 2011; NEHRA et al., 2005), apresentando aplicações comprovadas no setor florestal (ALFENAS et al., 2004; WENDLING; DUTRA, 2010; XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007; XAVIER; WENDLING; SILVA; 2009), especialmente pelo fato de permitir menores variações genéticas em relação ao explante original, o que resulta em cópia autêntica da planta-matriz (NEHRA et al., 2005; NEUMANN; KUMAR; IMANI, 2009).

O *Eucalyptus* é o gênero florestal que mais possui estudos relacionados a técnica de micropropagação (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). Essa técnica encontra-se ligada aos programas de melhoramento que objetivam a maximização ou manutenção do valor genético, permitindo acelerar os métodos de clonagem de propágulos oriundos de

árvores adultas selecionadas (BUNN et al., 2005; DEL PONTE et al., 2001; JOSHI et al., 2003; THORPE, 2007; WATT et al., 2003), como a estaquia e miniestaquia, bem como, servir de base para estudos relacionados a nutrição mineral e anatomia.

Um dos objetivos da micropropagação é a necessidade de clonar espécies ou híbridos que apresentam elevadas taxas de crescimento, tolerância a baixas temperaturas e salinidade, resistência a pragas e doenças e, principalmente, para o rejuvenescimento de plantas-matrizes selecionadas de difícil enraizamento (BENNETT et al., 1994; BENNETT; MCDAVID; MCCOMB, 2003; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; GOMES; CANHOTO, 2003; KLERK, 2002; NEHRA et al., 2005; NOURISSIER; MONTEUUIS, 2008), como no caso o *Eucalyptus benthamii*. Contudo, devido o *Eucalyptus benthamii* ser recente em plantios florestais existem limitações quanto a produção de sementes e, quando essas estão disponíveis, os preços são elevados. Dessa forma, a micropropagação apresenta-se como alternativa para a multiplicação em larga escala, inclusive de matrizes previamente selecionadas de *E. benthamii* visando a formação de povoamentos florestais homogêneos.

Em termos de controle morfogênico em condições *in vitro* tem-se utilizado, preferencialmente na fase de multiplicação de gemas, os hormônios vegetais pertencentes ao grupo das auxinas e citocininas (DAVEY; ANTHONY, 2010; LUDWIG-MÜLLER, 2000; MATVEEVA; LUTOVA; NESTER, 2001). O grupo das giberelinas é utilizado para induzir o alongamento de brotações (HARTMANN et al., 2011). Considerando os reguladores de crescimento mais utilizados para a obtenção de gemas axilares na micropropagação de *Eucalyptus*, o BAP (benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético) merecem amplo destaque, onde são suplementados ao meio de cultura nas mais variadas relações e concentrações (ARYA et al., 2009; BISHT et al., 1999; BRONDANI et al., 2009; BRONDANI et al., 2011; BRONDANI, 2008; DEL PONTE et al., 2001; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; HUNG; TRUEMAN, 2010; JOSHI et al., 2003; SHARMA; RAMAMURTHY, 2000).

Os componentes do meio de cultura de natureza definida são: sais minerais (macro e micronutrientes), vitaminas (biotina, ácido fólico, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, tiamina e inositol), reguladores de crescimento (AIA; AIB; ANA, BAP; GA₃; 2,4-D e TDZ), aminoácidos (asparagina, glicina e ácido glutâmico), ácidos orgânicos (ácido citérico, ácido tartárico) e açúcares (sacarose e glicose) (GEORGE; HALL; De KLERK, 2008).

Conforme a literatura, dentre os meios de cultura mais utilizados para a micropropagação de *Eucalyptus* spp., destacam-se o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), JADS (CORREIA et al., 1995) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), contudo não existe

protocolo definido para a micropropagação de *Eucalyptus benthamii*. Atualmente, existe a necessidade de continuidade dos estudos com a técnica de micropropagação de *Eucalyptus*, principalmente no sentido de redução de custos, maximização das etapas que compõem o processo e estabelecimento de protocolos que possam ser empregados para diversas espécies, inclusive para o resgate de material adulto selecionado (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; LUDWIG-MÜLLER, 2000).

Com base no exposto, o presente trabalho apresenta as seguintes hipóteses e objetivos:

5.1.1 Hipóteses

- A multiplicação de gemas axilares varia de acordo com o material genético, meio de cultura e concentrações de BAP e ANA;
- O alongamento de brotações varia de acordo com o material genético e concentrações de BAP e GA₃;
- O enraizamento *in vitro*, *ex vitro* e aclimatização variam de acordo com o material genético, sendo possível produzir microcepas.

5.1.2 Objetivos

- Determinar a multiplicação de gemas axilares em relação as concentrações de BAP e ANA, material genético e meio de cultura;
- Avaliar o alongamento de brotações em relação as concentrações de BAP e GA₃ e material genético;
- Avaliar o enraizamento *in vitro*, *ex vitro* e aclimatização das mudas clonais até a formação de microcepas.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Caracterização geral

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

5.2.2 Coleta das brotações e preparo dos explantes

As minicepas dos clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage (BP101 e BP118) propagadas por miniestaquia e conduzidas em sistema semihidropônico sem proteção foram pulverizadas com fungicida Kumulus DF[®] a 2 g L⁻¹ de i.a. (p/v) (i.a.: enxofre, modo de ação: protetor) sete dias antes da coleta das brotações (Figura 1 A). Os propágulos foram provenientes da segunda coleta de brotações, sendo acondicionados em solução a 1% de ácido ascórbico (p/v) (Figura 1 B). Em laboratório, foi realizada remoção das folhas e lavagem superficial com água deionizada, visando a eliminação de partículas e poeira dos tecidos vegetativos.

5.2.3 Estabelecimento *in vitro* da cultura

Segmentos nodais da porção mediana da brotação, contendo um par de gemas axilares, com remoção das folhas e tamanho médio de 1,5 cm (Figura 1 C) foram imersos durante 15 minutos em solução fúngica de Benlate 500[®] a 0,5 mg L⁻¹ de i.a. (p/v) (i.a.: *benomyl* – Metil-1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazol carbanato, Dupont, modo de ação: sistêmico) acrescida de Tween 20 (0,05%, v/v). Em seguida, foram lavados com água deionizada e autoclavada e, imersos em solução hidroalcoólica a 70% (água:álcool, v/v) por 15 segundos, enxaguados com água deionizada e autoclavada e, submetidos a solução de 1,5% (v/v) de cloro ativo (NaOCl) acrescida de Tween 20 (0,05%, v/v) durante 10 minutos. Ao final do tratamento, foram enxaguados com água deionizada e autoclavada por três vezes e inoculados verticalmente em tubos de ensaio (2 x 10 cm), contendo 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Após a inoculação, os explantes foram mantidos por sete dias no escuro. Aos 28 dias após a inoculação foram considerados estabelecidos os explantes que não apresentaram contaminação fúngica, bacteriana e/ou oxidação.

5.2.4 Tratamentos e delineamento experimental

5.2.4.1 Multiplicação

Brotações provenientes da fase de estabelecimento contendo de uma a três gemas axilares foram inoculadas em tubos de ensaio (2 x 10 cm), contendo 10 mL dos meios de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) e JADS (CORREIA et al., 1995) (Tabela 1), os quais foram suplementados com 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0; 0,025; 0,050; 0,075 e 0,100 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA). Aos 30 dias foi realizado subcultivo dos explantes para novo meio de cultura mantendo-se os tratamentos. O número de gemas axilares formadas por explante foi avaliado aos 60 dias após a inoculação. Aos 60 dias após a inoculação foram coletadas amostras da folha, caule, raiz e gemas axilares para análises histológicas do desenvolvimento morfogênico dos explantes. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2x3x5x5), testando-se dois clones (BP101 e BP118), três meios de cultura (MS, WPM e JADS), cinco concentrações de BAP combinadas com cinco concentrações de ANA, contendo cinco repetições com 10 explantes.

5.2.4.2 Alongamento

Explantes contendo aproximadamente 50 gemas axilares (obtidos a partir de 10 a 12 subcultivos em meio de multiplicação) foram inoculados em frascos de vidro (6 x 7 cm) com 40 mL do meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), o qual foi suplementado com 0; 0,05 e 0,10 mg L⁻¹ de BAP e 0; 0,1; 0,2 e 0,3 mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃). Em todos os tratamentos foi adicionado 0,1 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) para induzir o enraizamento do tufo durante o alongamento dos brotos. Aos 30 dias foi realizado subcultivo dos explantes para novo meio de cultura mantendo-se os tratamentos. O número de brotação alongada (> 1 cm) e o comprimento médio da brotação por explante (> 1 cm) foram avaliados aos 60 dias após a inoculação. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2x3x4), testando-se dois clones (BP101 e BP118), três concentrações de BAP combinadas com quatro concentrações de GA₃, contendo cinco repetições com cinco explantes.

Tabela 1 - Composição básica dos meios de cultura MS, WPM e JADS utilizados para os experimentos de micropropagação de *Eucalyptus benthamii*

Nutriente		MS ⁽¹⁾ (mg L ⁻¹)	WPM ⁽²⁾ (mg L ⁻¹)	JADS ⁽³⁾ (mg L ⁻¹)
N-NO ₃ ⁻		551,71	135,89	308,03
N-NH ₄ ⁺		288,61	69,97	55,97
P		38,69	38,69	92,85
Ca		119,95	120,54	200,44
K		783,86	493,11	430,10
S		55,50	237,67	106,45
Mg		36,49	36,49	72,94
B		1,08	1,08	0,54
Cu		0,006	0,064	0,318
Fe		5,58	5,58	11,17
Mo		0,10	0,10	0,06
Mn		5,49	5,49	5,49
Zn		1,96	1,96	0,98
Co		0,006	-	0,062
Fonte de Macro e Micronutriente	FQ / PM	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
Nitrato de amônio (Reagex [®])	NH ₄ NO ₃ / 80,04	1.650,00	400,00	320,00
Nitrato de potássio (Nuclear [®])	KNO ₃ / 101,10	1.900,00	-	809,00
Cloreto de cálcio (Synth [®])	CaCl ₂ .2H ₂ O / 147,02	440,00	96,00	-
Nitrato de cálcio (Labsynth [®])	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O / 236,15	-	556,00	1.181,00
Fosfato de potássio monobásico (Mallinckrodt [®])	KH ₂ PO ₄ / 136,09	170,00	170,00	408,00
Sulfato de potássio (Synth [®])	K ₂ SO ₄ / 174,26	-	990,00	-
Sulfato de magnésio (Mallinckrodt [®])	MgSO ₄ .7H ₂ O / 246,48	370,00	370,00	739,50
Sódio - EDTA (Nuclear [®])	Na ₂ -EDTA.2H ₂ O / 372,24	37,300	37,300	74,500
Sulfato de ferro (Synth [®])	FeSO ₄ .7H ₂ O / 278,02	27,800	27,800	55,600
Sulfato de manganês (Ecibra [®])	MnSO ₄ .H ₂ O / 169,01	16,900	16,900	16,900
Sulfato de zinco (Mallinckrodt [®])	ZnSO ₄ .7H ₂ O / 287,54	8,600	8,600	4,320
Ácido bórico (Ecibra [®])	H ₃ BO ₃ / 61,83	6,200	6,200	3,100
Iodeto de potássio (Merck [®])	KI / 166,01	0,830	-	-
Sulfato de cobre (Mallinckrodt [®])	CuSO ₄ .5H ₂ O / 249,68	0,025	0,250	1,250
Molibdato de sódio (Merck [®])	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O / 241,95	0,250	0,250	0,150
Cloreto de cobalto (Merck [®])	CoCl ₂ .6H ₂ O / 237,93	0,025	-	0,250
Fonte de Vitamina	FQ / PM	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
Tiamina-HCl (Merck [®])	C ₁₂ H ₁₈ C ₁₂ N ₄ O ₅ .xH ₂ O / 337,27	0,10	1,00	5,00
Piridoxina-HCl (Merck [®])	C ₈ H ₁₂ ClNO ₃ / 205,64	0,50	1,00	0,50
Ácido nicotínico (Merck [®])	C ₆ H ₅ NO ₂ / 123,11	0,50	1,00	0,50
Pantotenato Ca ²⁺ (Merck [®])	C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀ / 476,54	-	1,00	2,40
Biotina (Sigma [®])	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S / 244,30	-	0,01	-
Fonte de Aminoácido	FQ / PM	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
L-Cisteína (Sigma [®])	HCl.H ₂ O / 121,20	-	-	5,00
Glicina (Merck [®])	H ₂ NCH ₂ COOH / 75,07	2,00	1,00	-
Fonte de Carbono	FQ / PM	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)
Mio-inositol (Sigma [®])	C ₆ H ₁₂ O ₆ / 180,20	100,00	100,00	100,00
Sacarose (Nuclear [®])	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ / 342,30	30.000,00	30.000,00	30.000,00

⁽¹⁾ Adaptado segundo Murashige e Skoog (1962). ⁽²⁾ Adaptado segundo Lloyd e McCown (1980). ⁽³⁾ Adaptado segundo Correia et al. (1995). FQ = fórmula química, PM = peso molecular

5.2.4.3 Enraizamento *in vitro*, *ex vitro* e aclimatização

Brotas alongadas *in vitro* dos clones BP101 e BP118 com tamanho médio de 1,5 cm foram transferidas para tubos de ensaio (2 x 10 cm) contendo 10 mL do meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), o qual foi suplementado com 0,2 mg L⁻¹ de ANA, 0,2 mg L⁻¹ de AIB, 20 g L⁻¹ de glicose (Reagen[®] / C₆H₁₂O₆ / 180,16 g). Para cada tubo de ensaio foi introduzido uma brotação. Após o enraizamento *in vitro*, as mudas foram repicadas para recipientes plásticos (11 x 11 cm) contendo 200 cm³ de substrato composto pela mistura de vermiculita média e Basaplant Florestal[®] (2:1, v/v), o qual foi previamente autoclavado. Em

cada recipiente plástico foi introduzido de duas a quatro brotações enraizadas e adicionado 80 mL de água destilada. O enraizamento *ex vitro* deu-se pela transferência direta das brotações obtidas na fase de alongamento para bandeja de células contendo substrato composto pela mistura de vermiculita média e Basaplant Florestal[®] (2:1, v/v). A bandeja de células foi envolvida com polietileno para manter a umidade relativa do ar elevada, formando um miniestufim. Não foi utilizado regulador de crescimento para a promoção da rizogênese *ex vitro*. Tanto para o enraizamento *in vitro* quanto para o *ex vitro*, as mudas obtidas foram repicadas para tubetes cônicos (55 cm³), sendo em seguida, transferidas para casa de vegetação com sombrite de 50% para aclimatização durante 21 dias. Após o processo de aclimatização, as mudas foram transferidas para uma área de pleno sol, visando a rustificação e crescimento durante 30 dias. Durante o período experimental foram avaliadas a porcentagem de enraizamento e aclimatização das mudas. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2x2) testando dois clones (BP101 e BP118) e duas origens de brotos (*in vitro* e *ex vitro*) contendo seis repetições com 10 brotações.

5.2.5 Preparo do meio de cultura e condições *in vitro*

O meio de cultura foi preparado com água deionizada, adicionando-se 7 g L⁻¹ de ágar (Riolab[®]) e 30 g L⁻¹ de sacarose (Nuclear[®] / C₁₂H₂₂O₁₁ / 342,30 g). O valor do pH foi ajustado para 5,8 com HCl (0,1M) e NaOH (0,1M) previamente a adição do ágar ao meio de cultura, e então autoclavado a temperatura de 121°C (≈ 1,0 kgf cm⁻²) durante 20 minutos. Os explantes foram cultivados em sala de incubação com temperatura mantida a 25°C (± 2°C), fotoperíodo de 12 horas e luminosidade de 40 μmol m⁻² s⁻¹. O BAP (Acros[®] / C₁₂H₁₁N₅ / 225,25 g) e ANA (Sigma[®] / C₁₂H₁₀O₂ / 186,2 g) e AIB (Merck[®] / C₁₂H₁₃NO₂ / 203,24 g) foram adicionados ao meio de cultura antes da autoclavagem. O GA₃ (Sigma[®] / C₁₉H₂₂O₆ / 346,4 g) foi adicionado ao meio de cultura, ainda em fase líquida, logo após a autoclavagem, sendo que o procedimento foi executado em câmara de fluxo laminar por meio da utilização de filtro descartável (Millex - GP[®] com membrana estéril de 0,22 μm).

5.2.6 Análise histológica

As amostras foram fixadas em uma solução de formaldeído e glutaraldeído (KARNOVSKY, 1965) e submetidas a três séries de vácuo (≈ 620 kgf cm⁻²) por 15 minutos, para remoção do ar. Em seguida, as amostras foram desidratadas por meio de série alcoólica-etílica em concentrações crescentes (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%, v/v),

permanecendo em cada solução por 10 minutos, sendo em seguida, emblocadas em resina de hidróxietil metacrilato (Leica[®]). Os blocos contendo as amostras foram seccionados longitudinalmente ou transversalmente a 5 µm de espessura com o uso de micrótomo rotativo manual acoplado com navalha do tipo C. Os cortes obtidos foram corados com azul de toluidina (0,05%, v/v) em tampão fosfato e ácido cítrico (SAKAI, 1973) e montados em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan[®]). As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas com microscópio de luz (Zeiss-Jenemed2[®]) em escala micrométrica, sendo as imagens capturadas com câmera Samsung (SDC-313).

5.2.7 Análise estatística dos dados

Os dados mensurados de todos os experimentos foram submetidos ao teste de Hartley ($P < 0,05$) e Lilliefors ($P < 0,05$) e transformados quando necessário. Em seguida, foi realizada análise de variância (ANOVA, $P < 0,01$ e $P < 0,05$). De acordo com a significância da ANOVA, os dados dos fatores qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) e, os dados dos fatores quantitativos foram submetidos a análise de regressão polinomial ($P < 0,01$ e $P < 0,05$) com representação em superfície de resposta. Utilizaram-se os pacotes SOC (EMBRAPA, 1990) e STATISTICAL PROGRAM (MSTAT, 1994) para a análise estatística dos dados.

5.3 Resultados

5.3.1 Estabelecimento e multiplicação

As brotações coletadas a partir de minicepas de *Eucalyptus benthamii* (clones BP101 e BP118) conduzidas em minijardim clonal apresentaram excelente aptidão para o cultivo *in vitro* (Figura 1 A-C), além de garantir uma fonte de brotações em quantidade e qualidade durante todo o ano.

A assepsia adotada para a fase de introdução *in vitro* foi satisfatória, apresentando quantidade suficiente de explantes estabelecidos e com emissão normal de brotações axilares para serem utilizadas nas fases subsequentes (Figura 1 D). A taxa média de estabelecimento de segmentos nodais foi de 65%, independente do clone, sendo que as brotações emitidas apresentaram comprimento entre 1 a 2 cm, aos 30 dias após a introdução *in vitro*. Para a multiplicação de gemas axilares, a análise de variância revelou interação entre os fatores material genético, meio de cultura e concentrações de BAP e ANA (Tabela 2).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância do número de gemas emitidas por explante (NG) de *Eucalyptus benthamii* cultivado *in vitro* em relação ao clone, meio de cultura e concentrações de reguladores de crescimento, aos 60 dias de avaliação

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		NG (explante ⁻¹)
Clone (CLO)	1	5.518,63**
Meio (MEI)	2	802,06**
BAP	4	2.409,71**
ANA	4	71,15**
CLO x MEI	2	38,12 ^{ns}
CLO x BAP	4	480,05**
CLO x ANA	4	8,46 ^{ns}
MEI x BAP	8	104,66**
MEI x ANA	8	25,71*
BAP x ANA	16	53,67**
CLO x MEI x BAP	8	92,43**
CLO x MEI x ANA	8	40,27**
CLO x BAP x ANA	16	72,96**
MEI x BAP x ANA	32	48,44**
CLO x MEI x BAP x ANA	32	40,69**
Resíduo	525	12,67
Média	–	9,34
CV _{exp.} (%)	–	38,10

^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. * e ** Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental

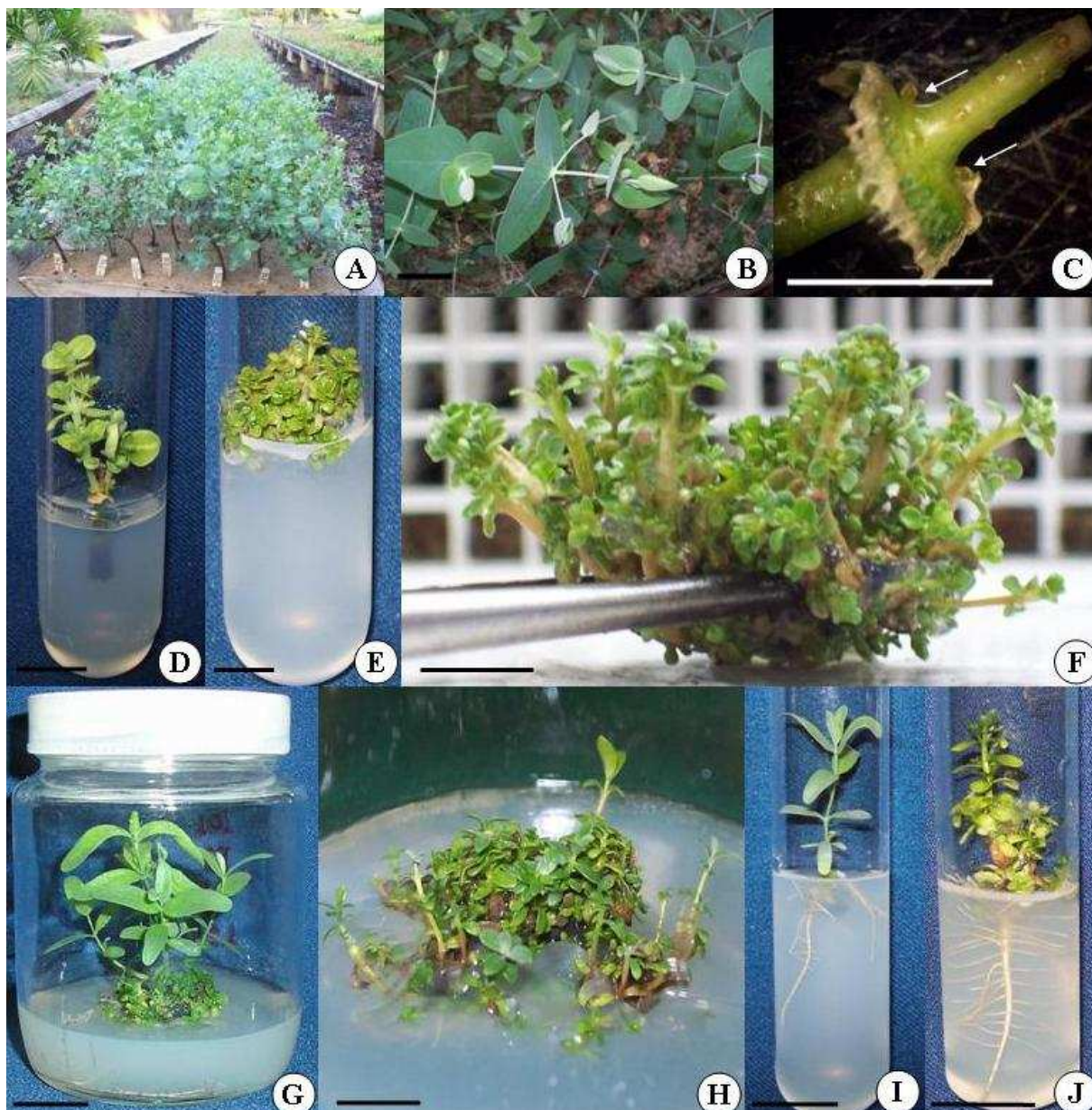


Figura 1 - Detalhe das fases de micropropagação de *Eucalyptus benthamii*. (A) minicépas cultivadas em minijardim clonal com sistema semihidropônico (canaletão com areia) para o fornecimento de brotações; (B) material vegetal utilizado para a introdução *in vitro* proveniente da segunda coleta de brotações, barra: 2 cm; (C) segmento nodal contendo um par de gemas axilares sem a ponteira e folhas – setas indicam gemas axilares, barra: 0,5 cm; (D) segmento nodal estabelecido *in vitro* aos 30 dias após a inoculação, barra: 1,5 cm; (E) explante contendo múltiplas gemas axilares em meio de cultura WPM suplementado com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA após 60 dias após a inoculação, barra: 1,0 cm; (F) tufo apresentando múltiplas gemas axilares com iniciação de alongamento de brotações em meio de cultura WPM suplementado com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA após 10 a 12 subcultivos, barra: 2 cm; (G) tufo enraizado (microcepa) e apresentando brotações alongadas em meio de cultura WPM suplementado com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB aos 60 dias após a inoculação, barra: 2 cm; (H) brotações alongadas em meio de cultura WPM suplementado com GA_3 aos 60 dias após a inoculação, barra: 1,0 cm; (I e J) brotações enraizadas *in vitro* em meio de cultura WPM suplementado com $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB aos 21 dias após a inoculação, barra: 2 cm

A análise de regressão polinomial apresentou estimativa adequada para os valores médios reais. Os valores do coeficiente de determinação ficaram compreendidos entre 0,69 e 0,85, sendo possível modelar adequadamente o comportamento da indução de gemas axilares durante o tempo considerado para cada clone e meio de cultura (Tabela 3).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância com decomposição dos tratamentos em regressão polinomial do número de gemas axilares emitidas por explante de *Eucalyptus benthamii* cultivado *in vitro* em relação do clone, meio de cultura e concentrações de reguladores de crescimento, aos 60 dias de avaliação

Causas da Variação	GL	Soma de Quadrados					
		----- Clone BP101 -----			----- Clone BP118 -----		
		MS	WPM	JADS	MS	WPM	JADS
BAP	4	3.621,2**	5.569,3**	1.588,8**	844,9**	1.277,6**	183,0**
ANA	4	341,4**	146,6 ^{ns}	106,5**	87,9**	157,6**	8,1 ^{ns}
BAP x ANA	16	1.300,6**	905,6*	1.239,1**	240,3**	1.134,8**	82,6**
Resíduo	99	1.792,5	3.335,5	266,0	259,2	845,6	153,5
Média	–	13,05	13,78	9,22	7,08	7,33	4,65
CV _{exp.} (%)	–	34,19	42,11	20,86	23,35	39,68	32,09
SQM	–	3.609,8	5.604,1	2.054,1	848,0	1.773,5	193,6
SQT	–	5.263,2	6.621,5	2.934,4	1.173,1	2.570,0	273,7
R ²	–	0,69	0,85	0,70	0,72	0,69	0,71

^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. * e ** Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental, SQM = soma de quadrados do modelo, SQT = soma de quadrados dos tratamentos, R² = coeficiente de determinação

O clone BP101 quando cultivado em meio de cultura MS apresentou cerca de 21 gemas por explante (Figura 2 A) e 18 gemas por explante em meio WPM (Figura 2 B). Porém em meio JADS o valor foi de 14 gemas emitidas por explante (Figura 2 C). O clone BP118 apresentou 9 gemas emitidas por explante quando cultivado em meio de cultura MS (Figura 2 D) e cerca de 11 gemas por explante em meio WPM (Figura 2 E). Em meio de cultura JADS, o valor médio foi de 6 gemas emitidas por explante (Figura 2 F). O clone BP101 emitiu maior número de gemas que o clone BP118 ao considerar o mesmo tempo (60 dias) de cultivo *in vitro*, demonstrando ser um material genético mais responsivo durante a fase de multiplicação. Independente do meio de cultura e clone, as combinações próximas a 0,50 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA foram as que apresentaram os melhores resultados quanto a proliferação de gemas axilares (Figura 1 E).

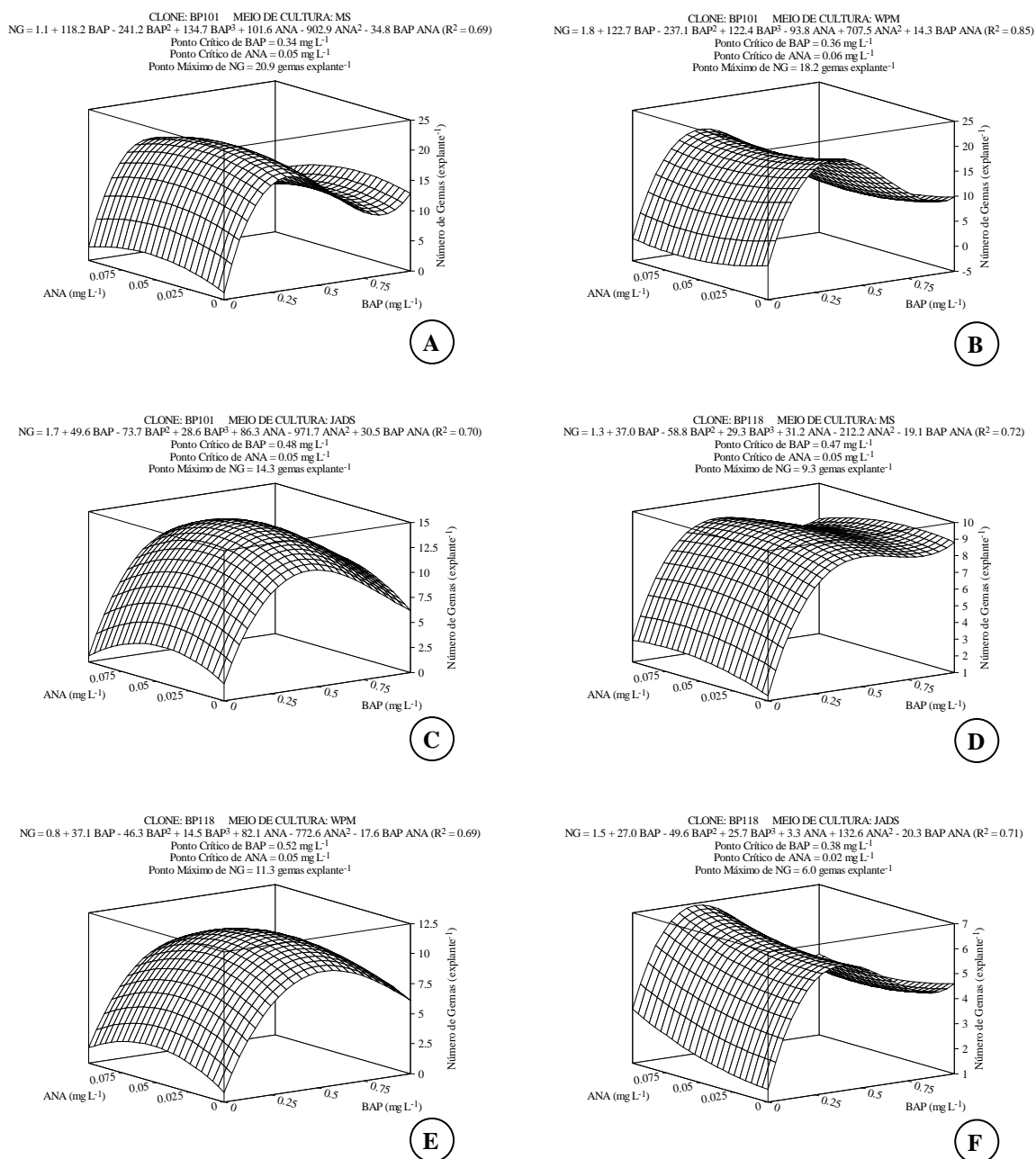


Figura 2 - Variação do número de gemas (NG) *in vitro* de explantes de *Eucalyptus benthamii* em relação as concentrações de BAP e ANA em diferentes meios de cultura. (A) meio de cultura MS e clone BP101; (B) meio de cultura WPM e clone BP101; (C) meio de cultura JADS e clone BP101; (D) meio de cultura MS e clone BP118; (E) meio de cultura WPM e clone BP118; (F) meio de cultura JADS e clone BP118

Em termos de análise visual, não se observou clorose das folhas dos explantes quando cultivados nos meios de cultura WPM e JADS, os quais corresponderam as melhores características morfológicas tanto em termos de formação de gemas axilares quanto ao padrão de desenvolvimento de folhas. Além disso, para o clone BP101 foi observada a multiplicação de gemas axilares e iniciação do alongamento de brotações em meio de cultura WPM suplementado com BAP e ANA após 10 a 12 subcultivos (Figura 1 F). O meio MS resultou

em clorose intensa das folhas dos explantes além de produzir gemas axilares com aspecto rosetado, não sendo aconselhado o seu uso para a fase de multiplicação dos materiais genéticos avaliados.

Outra diferença entre os meios de cultura referiu-se quanto a manifestação de organismos endofíticos. O meio MS (<10%) apresentou baixa manifestação de organismos endofíticos, o WPM (30 a 40%) correspondeu a grau intermediário, porém sem comprometer o crescimento e desenvolvimento dos explantes. No JADS (>80%), ocorreu manifestação elevada de organismos endofíticos, porém sem comprometer o crescimento do explante. Por essas características e pela análise das equações ajustadas, o meio de cultura WPM foi adotado para as demais fases da micropropagação de *Eucalyptus benthamii*.

Os cortes histológicos das gemas multiplicadas em meio de cultura WPM nas combinações de 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA, revelaram a emissão de gemas axilares normais oriundas de meristemas pré-existentes dos tecidos do meristema axilar (Figuras 3 A, 3 C-D), bem como, revelou folhas (Figura 3 B) e caules (Figura 3 E) com desenvolvimento normal. Durante essa fase, não foi constatada organogênese indireta dos tecidos (presença de calo), o que denota a clonagem bem sucedida dos materiais genéticos.

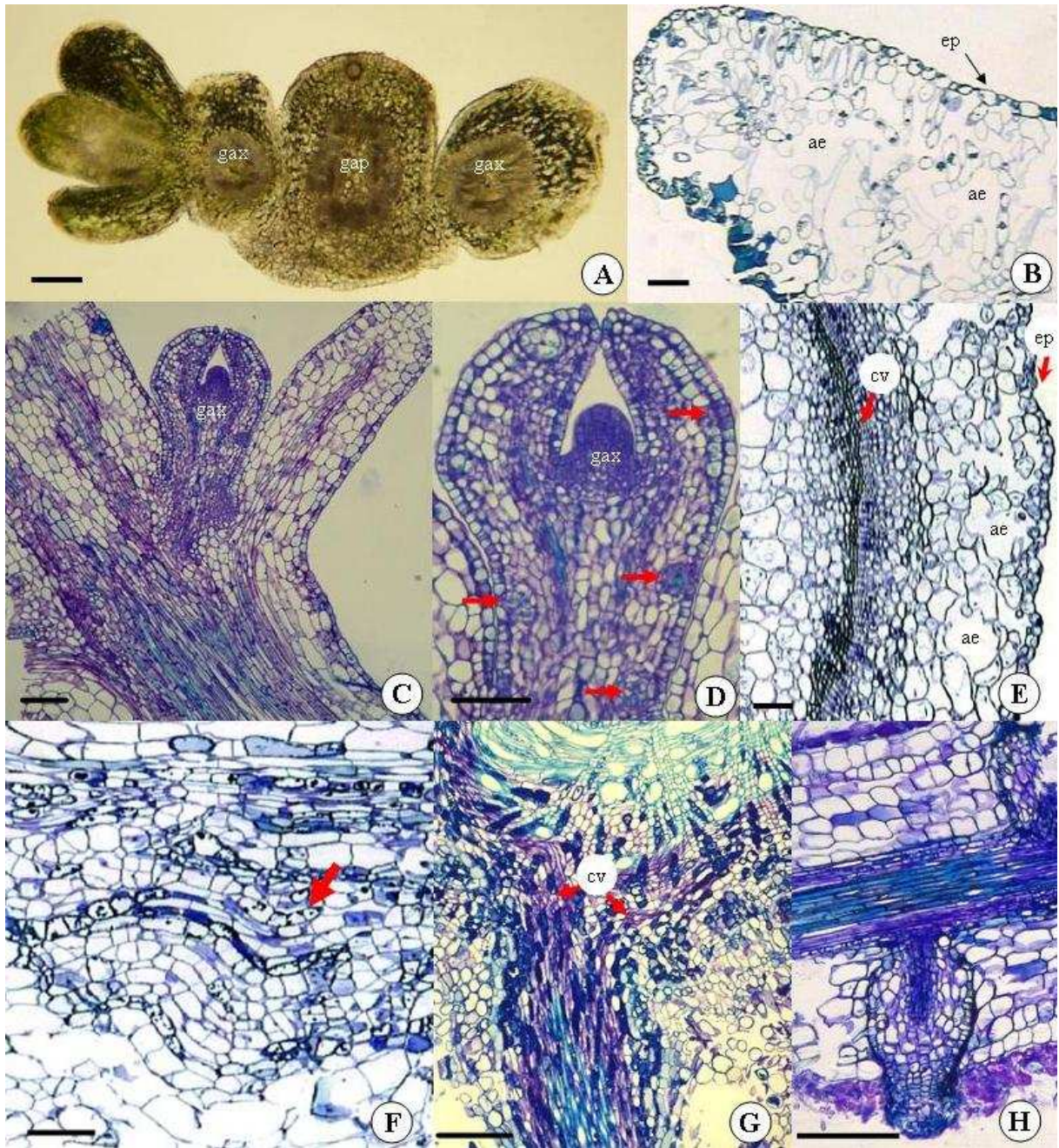


Figura 3 - Cortes histológicos de explantes de *Eucalyptus benthamii* cultivados *in vitro*. (A) corte transversal a mão-livre da brotação evidenciando gemas axilares pré-existentes (gax) e gema apical (gap); (B) corte transversal da folha evidenciando a epiderme (ep) e presença de aerênquima (ae); (C) corte longitudinal de brotação evidenciando a gema axilar pré-existente (gax); (D) corte longitudinal evidenciando gema axilar (gax), setas indicam regiões meristemáticas; (E) corte transversal do caule evidenciando a epiderme (ep), aerênquima (ae) e câmbio vascular (cv); (F) corte transversal do caule evidenciando alterações no padrão de arranjo das células cambiais e formação de centros meristemáticos rizogênicos, seta indica célula meristemática; (G) corte transversal do caule evidenciando região de conexão vascular normal da raiz adventícia com o câmbio vascular (cv); (H) corte longitudinal da raiz adventícia evidenciando indução de raiz secundária normal. Barra: 100 μ m

5.3.2 Alongamento

A análise de variância dos dados amostrados revelou efeito significativo da concentração de BAP suplementada ao meio de cultura em relação ao número de brotações alongadas por explante. Houve interação entre os fatores clone e concentrações de BAP e GA₃ para o comprimento de brotações de explantes de *Eucalyptus benthamii* (Tabela 4).

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para o número de brotações alongadas (NB > 1 cm) e comprimento de brotação (CB > 1 cm) de explantes de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone, BAP e GA₃, aos 60 dias de avaliação

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios	
		NB (explante ⁻¹)	CB (cm explante ⁻¹)
Clone (CLO)	1	2,72 ^{ns}	10,05 ^{**}
BAP	2	12,93^{**}	18,71 ^{**}
GA ₃	3	0,48 ^{ns}	0,66 ^{ns}
CLO*BAP	2	2,18 ^{ns}	7,69 ^{**}
CLO*GA ₃	3	0,75 ^{ns}	0,85 ^{ns}
BAP*GA ₃	6	0,46 ^{ns}	0,61 ^{ns}
CLO*BAP*GA ₃	6	0,82 ^{ns}	1,73^{**}
Resíduo	48	0,81	0,33
Média	–	0,44	0,55
CV _{exp.} (%)	–	55,67	33,94

^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ^{**} Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental

O maior número de brotações alongadas (> 1 cm) por explante ocorreu em meio de cultura isento de BAP, sendo que a estimativa foi de 1,29 brotações alongadas por explante (Tabela 5). Ao considerar o comprimento das brotações alongadas maiores que 1 cm, pode-se verificar que a suplementação de 0,10 mg L⁻¹ de GA₃ na ausência de BAP resultou em maior comprimento de brotações por explante para o clone BP101. Para o clone BP118, tanto a ausência de GA₃ quanto a suplementação de 0,10 mg L⁻¹ de GA₃ no meio de cultura isento de BAP favoreceram o maior comprimento de brotações por explante (Tabela 6). Somente os tufos que não foram expostos ao GA₃ ou ao BAP apresentaram raízes na porção basal, efeito provavelmente ocasionado pela adição do AIB ao meio de cultura, o que pode ter favorecido a emissão de brotações mais vigorosas e com melhor balanceamento do estado nutricional e hormonal.

Em termos qualitativos pela análise visual, as melhores respostas para a indução de brotações alongadas maiores que 1 cm de comprimento foram obtidas na ausência de BAP e GA₃, sendo que nessas condições todas as brotações apresentaram-se vigorosas e com excelente formação (Figura 1 G). Todas as brotações alongadas na presença de GA₃

apresentaram-se finas, com aspecto estiolado e com folhas reduzidas (Figura 1 H), independente do clone avaliado. Além disso, as brotações que foram tratadas com GA₃ não apresentaram indução de raízes, o que sugere determinado grau de inibição da rizogênese pela presença de GA₃ (efeito residual). De acordo com essas características e com a análise de comparação de médias, o meio de cultura mais adequado para o alongamento de brotações dos clones BP101 e BP118 foi o isento de BAP e GA₃.

Tabela 5 - Valores médios do número de brotações alongadas (NB > 1 cm) de explante de *Eucalyptus benthamii* em relação as concentrações de BAP aos 60 dias, contendo 0,1 mg L⁻¹ de AIB

BAP (mg L ⁻¹)	NB (explante ⁻¹)
0,00	1,29±1,57 A
0,05	0,04±0,20 B
0,10	0,00±0,00 B

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média ± desvio padrão

Tabela 6 - Valores médios do comprimento de brotações (CB > 1 cm) de explante de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e concentrações de GA₃ e BAP, aos 60 dias, contendo 0,1 mg L⁻¹ de AIB

GA ₃ (mg L ⁻¹)	Clone BP101			Clone BP118		
	BAP (mg L ⁻¹)					
	0,00	0,05	0,10	0,00	0,05	0,10
0,00	1,53±1,78 Ba	1,20±1,32 Aa	0,00±0,00 Ab	1,77±0,25 Aa	0,00±0,00 Ab	0,00±0,00 Ab
0,10	4,13±0,65 Aa	0,00±0,00 Bb	0,00±0,00 Ab	1,02±0,75 Aa	0,00±0,00 Ab	0,00±0,00 Ab
0,20	2,57±0,66 Ba	0,00±0,00 Bb	0,00±0,00 Ab	0,00±0,00 Bb	0,00±0,00 Ab	0,00±0,00 Ab
0,30	2,17±1,25 Ba	0,00±0,00 Bb	0,00±0,00 Ab	0,00±0,00 Bb	0,00±0,00 Ab	0,00±0,00 Ab

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e, nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média ± desvio padrão

5.3.3 Enraizamento *in vitro*, *ex vitro* e aclimatização

O enraizamento *in vitro* (porcentagem > 90%) dos clones BP101 e BP118 foi bem sucedido aos 21 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com 0,2 mg L⁻¹ de ANA, 0,2 mg L⁻¹ de AIB e 20 g L⁻¹ de glicose. As raízes emitidas nas microestacas apresentaram formação normal e com emissão de raízes secundárias vigorosas (Figura 1 I-J), o que foi fundamental para o excelente desenvolvimento e crescimento da parte aérea. Em alguns cortes anatômicos do caule em regiões próximas a emissão de raízes foi possível verificar ondulações dos tecidos cambiais (Figura 3 F), caracterizando arranjo das células do câmbio vascular (tecido meristemático) para a formação de centros meristemáticos e posterior indução da raiz adventícia. A análise histológica da raiz emitida da brotação revelou conexão com o câmbio vascular caulinar, não sendo observada organogênese indireta (presença de

calo), o que caracteriza conexão vascular bem sucedida (Figura 3 G). Além disso, foi possível evidenciar indução de raiz secundária normal (Figura 3 H).

Semelhante ao enraizamento *in vitro*, o enraizamento *ex vitro* das brotações de ambos os materiais genéticos no sistema de miniestufim apresentou elevados índices (porcentagem > 90%) aos 21 dias, denotando a viabilidade para a produção de microplantas a partir do uso desse sistema.

De acordo com a ANOVA houve interação entre o clone e origem da microplanta enraizada (*in vitro* ou *ex vitro*) para a porcentagem de aclimatização aos 60 dias (Tabela 7).

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de aclimatização (ACL) de mudas micropropagadas de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e origem de enraizamento (*in vitro* ou *ex vitro*), aos 60 dias após a repicagem para tuberes cônico (55 cm³)

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		ACL (%)
Clone (CLO)	1	64,584 ^{ns}
Origem (ORI)	1	19.621,603 ^{**}
CLO*ORI	1	2.737,294^{**}
Resíduo	77	180,210
Média	–	53,07
CV _{exp.} (%)	–	25,29

^{ns} Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. ^{**} Valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F. GL = graus de liberdade, CV_{exp.} = coeficiente de variação experimental

O clone BP101 apresentou cerca de 40% de mudas aclimatizadas e o clone BP118 cerca de 32%, ambos com origem de enraizamento *in vitro* (Figura 4). Porém, a técnica de enraizamento *in vitro* mostrou-se onerosa por ser necessária a realização de uma repicagem a mais do material enraizado para o recipiente de cultivo durante a fase de aclimatização (Figura 5 A-B).

Para as mudas que apresentaram origem de enraizamento *ex vitro* (Figura 5 C-D), a porcentagem de aclimatização foi superior as mudas que apresentaram origem de enraizamento *in vitro*. O clone BP101 apresentou cerca de 65% de aclimatização e o clone BP118 cerca de 87% de microplantas aclimatizadas (Figura 4).

A necessidade de apenas uma repicagem durante o enraizamento *ex vitro* para substrato composto pela mistura de vermiculita média e Basaplant Florestal[®] pode ter influenciado os maiores valores de enraizamento, tendo em vista as raízes não sofrerem danos excessivos durante as transferências, além de ser evidenciada a predominância de hábito de crescimento ortotrópico da parte aérea (Figura 5 E-F).

O enraizamento *ex vitro* no sistema de miniestufim foi menos oneroso e aumentou a sobrevivência das microplantas enraizadas, sendo possível obter número elevado de mudas (Figura 5 G). As mudas obtidas dos clones BP101 e BP118 foram submetidas ao processo de rustificação e crescimento para a obtenção das mudas micropropagadas.

As mudas assim obtidas foram utilizadas para a constituição de um microjardim clonal de *Eucalyptus benthamii* conduzido em vasos (Figura 5 H), o qual será utilizado para a realização de futuros ensaios experimentais de enraizamento *ex vitro* por meio da técnica de microestaquia.

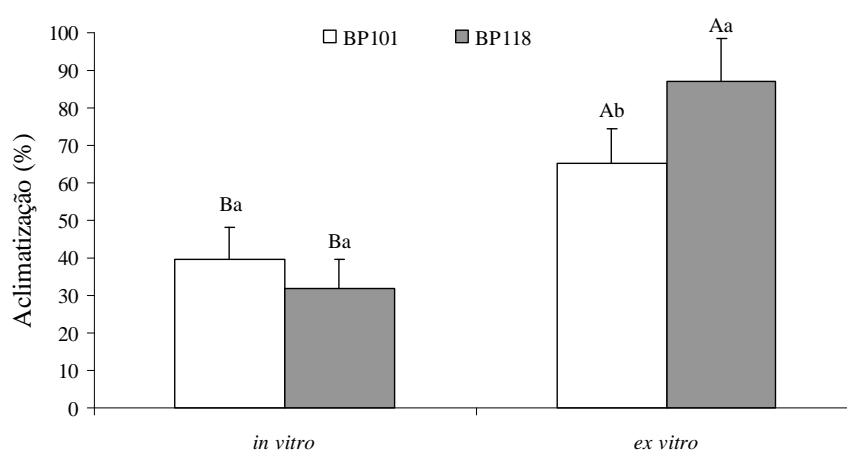


Figura 4 - Porcentagem de aclimatização de mudas de *Eucalyptus benthamii* (clone BP101 e BP118) em relação a origem do enraizamento (*in vitro* e *ex vitro*), aos 60 dias após a repicagem para o tubete plástico de 55cm³. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para o mesmo clone entre as origens de enraizamento e, médias seguidas por mesma letra minúscula para a mesma origem de enraizamento entre os clones, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média \pm desvio padrão

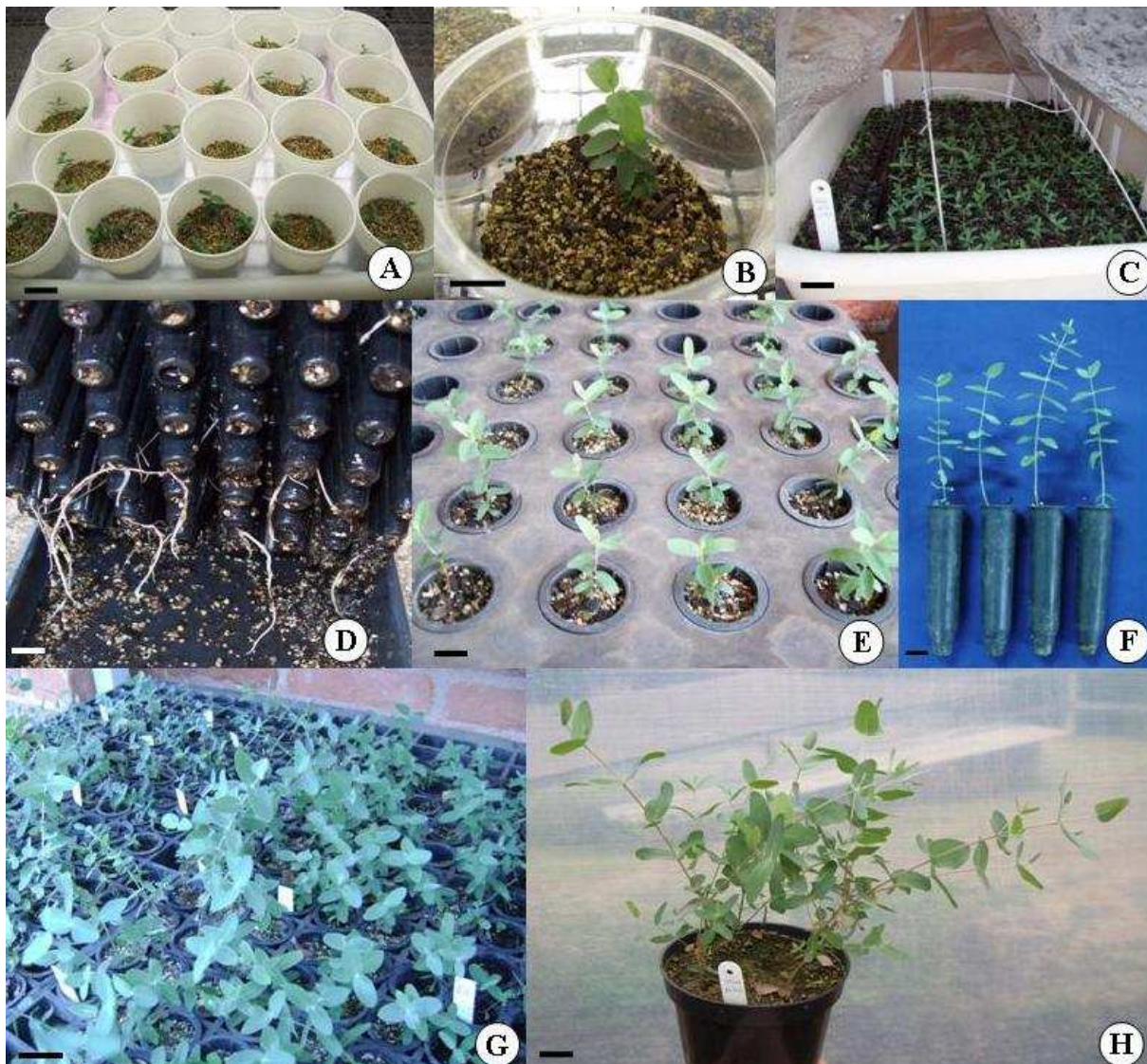


Figura 5 - Fases e procedimentos para o enraizamento e aclimatização das mudas micropropagadas. (A e B) microplantas enraizadas *in vitro* e repicadas para recipiente plástico contendo substrato composto pela mistura de vermiculita média e Basaplant Florestal[®] (2:1, v/v) aos 30 dias, barra: 1 cm; (C e D) microplantas enraizadas *ex vitro* em miniestufim contendo bandeja de células preenchidas com substrato composto pela mistura de vermiculita média e Basaplant Florestal[®] (2:1, v/v) aos 30 dias, barra: 2 cm; (E) microplantas (enraizadas *in vitro* e *ex vitro*) repicadas para tubetes cônicos (55 cm³) contendo substrato composto pela mistura de vermiculita média e Basaplant Florestal[®] (2:1, v/v) aos 30 dias, barra: 2 cm; (F e G) microplantas aclimatizadas aos 120 dias, barra: 2,5 cm; (H) obtenção da microcepa para fornecimento de novas brotações aos 240 dias, barra: 2 cm

5.4 Discussão

O *Eucalyptus benthamii* apresenta elevado potencial silvicultural para a composição de plantios florestais em regiões mais frias, principalmente ao considerar a ocorrência de geadas severas e temperaturas negativas (HIGA; PEREIRA, 2003; JOVANOVIĆ; BOOTH, 2002; SILVA et al., 2004). Nessas condições, foram registrados adequado crescimento e

adaptabilidade para fins comerciais de diferentes genótipos e procedências dessa espécie (MUJIU et al., 2003; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006). Porém, ainda existem problemas em relação a obtenção de sementes e de mudas clonais de genótipos selecionados de *Eucalyptus benthamii*, levando em consideração os baixos índices de enraizamento registrados pelas técnicas de estaquia (GRAÇA; SHIMIZU; TAVARES, 1999) e miniestaquia (WIT ONDAS et al., 2009).

Dentre as técnicas de clonagem de espécies lenhosas destaca-se a micropropagação, pois além de garantir a produção de mudas em larga escala e em espaço reduzido (HUNG; TRUEMAN, 2011; MANKESSI et al., 2009; NOURISSIER; MONTEUUIS, 2008; XIAO; NIU; KOZAI, 2011), apresenta a vantagem de promover o rejuvenescimento dos tecidos vegetativos a partir de inúmeros subcultivos *in vitro* (GEORGE; HALL; De KLERK, 2008; HARTMANN et al., 2011; NEHRA et al., 2005), o que pode melhorar os índices de enraizamento e acelerar os programas de melhoramento biotecnológicos de genótipos difíceis de enraizar (XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009). Inúmeros protocolos de micropropagação foram desenvolvidos para diferentes espécies de *Eucalyptus*, porém cada genótipo apresenta um comportamento ótimo de acordo com as condições estabelecidas em cada fase da micropropagação (estabelecimento, multiplicação, alongamento, enraizamento e aclimatização), sendo necessários ajustes do protocolo para otimizar o sistema de produção de mudas.

Considerando o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *E. benthamii*, os valores foram semelhantes aos reportados na literatura (BRONDANI et al., 2009; BRONDANI et al., 2011; BRONDANI, 2008; XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007), os quais podem ser considerados elevados e adequados para a micropropagação de *Eucalyptus* (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). O minijardim clonal produziu brotações em quantidade e qualidade adequadas em qualquer época do ano, representando fonte adequada para o fornecimento de brotações para a introdução *in vitro* de segmentos nodais (explantes) e indução de gemas axilares pré-existentes. De acordo com Brondani et al. (2009) os índices de estabelecimento *in vitro* de explantes (no caso de segmentos nodais) geralmente são elevados quando as brotações são originadas de minicepas (planta fornecedora de brotações) cultivadas em minijardim clonal protegido, devido ao maior controle ambiental e nutricional, em comparação aos explantes originados de árvores adultas coletados diretamente do campo. Dessa forma, o estabelecimento *in vitro* também está ligado a nutrição da planta doadora, bem como seu estado fitossanitário e condições de manejo. Foi observado que o tempo mais adequado para efetuar a primeira troca de meio de cultura correspondeu aos 28 dias. Nessa

época, as brotações axilares emitidas podem ser cortadas e transferidas para meio de multiplicação para a obtenção de novas gemas.

Durante o cultivo *in vitro*, o desenvolvimento e o crescimento dos explantes são influenciados diretamente pela composição nutritiva do meio de cultura, o qual é composto por combinações de macro e micronutrientes, bem como, vitaminas, aminoácidos, carboidratos e reguladores de crescimento (NEUMANN; KUMAR; IMANI, 2009). O meio de cultura tem por finalidade manter adequadamente as características de crescimento do explante pelo suprimento constante de nutrientes e demais compostos em curto espaço de tempo (DAVEY; ANTHONY, 2010). O meio de cultura WPM mostrou ser o mais adequado para ser usado na fase de multiplicação de gemas axilares em explantes de *Eucalyptus benthamii*, em comparação ao MS e ao JADS. O meio de cultura WPM também apresentou resultados satisfatórios para o cultivo *in vitro* de *Eucalyptus erythronema* × *Eucalyptus stricklandii* (GLOCKE et al., 2006), *Eucalyptus globulus* (PINTO et al., 2008) e *Eucalyptus camaldulensis* (DIBAX et al., 2010), porém é pouco usado na micropropagação de *Eucalyptus*. O meio de cultura WPM – Wood Plant Medium – (LLOYD; MCCOWN, 1980) foi especialmente desenvolvido para o cultivo de espécies florestais lenhosas. Dentre as principais características em comparação aos demais meios de cultura avaliados (MS e JADS), o meio de cultura WPM apresenta reduzido potencial osmótico, fator esse que pode ter favorecido o cultivo *in vitro*, levando em consideração as exigências nutricionais de cada genótipo. O meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995) foi desenvolvido para o cultivo *in vitro* de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*, porém, apresentou maior manifestação de organismos endofíticos. Provavelmente, esse efeito pode estar relacionado as diferentes relações nutricionais dos meios de cultura avaliados. Considerando esse aspecto, quando o explante era muito pequeno (tufo com cerca de 1 cm de raio) houve maior manifestação de organismo endofítico, contudo não inviabilizou o cultivo *in vitro* em meio de cultura JADS. Diferente do WPM e do JADS, o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) foi desenvolvido para o cultivo de tabaco, e mostrou ser o meio de cultura com a menor manifestação de organismos endofíticos, porém apresentou o menor desenvolvimento dos tufos (brotações cloróticas e com necrose), além de induzir gemas com aspecto rosetado, não sendo aconselhado o seu uso para a micropropagação dos materiais genéticos avaliados.

Em termos de controle morfogênico na fase de multiplicação de gemas (axilares ou adventícias), os reguladores mais usados em variadas combinações referem-se a auxinas e citocininas (DAVEY; ANTHONY, 2010; GEORGE; HALL; De KLERK, 2008; HOSSAIN; KIM; LEE, 2010; KOMATSU et al., 2011; PAPP; PLATH; 2011). O presente experimento

baseou-se em testar combinações de ANA e BAP, e as concentrações entre 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA no meio de cultura WPM mostraram ser as melhores para a obtenção de gemas axilares em quantidade e qualidade adequadas. Essas combinações de reguladores de crescimento mantiveram o controle morfogênico de *Eucalyptus benthamii* em níveis semelhantes aos registrados na literatura para a micropropagação de diferentes genótipos de *Eucalyptus* (ARYA et al., 2009; BISHT et al., 1999; BRONDANI et al., 2011; BRONDANI, 2008; JOSHI et al., 2003; SHARMA; RAMAMURTHY, 2000). O ajuste das curvas de superfície de resposta também foi eficiente para auxiliar na estimativa dos pontos próximos ao ótimo das combinações dos reguladores de crescimento (platô), apresentando coeficientes de determinação adequados para explicar o comportamento dos clones em relação as combinações de reguladores de crescimento.

O alongamento das brotações *in vitro* depende de intensas variações das concentrações de reguladores de crescimento (GEORGE; HALL; De KLERK, 2008; WENDLING; DUTRA, 2010), e durante esse estágio é desejável obter brotos alongados em curto espaço de tempo. Contudo, o uso de GA₃ pode promover o estiolamento excessivo do broto (DAVEY; ANTHONY, 2010) e também pode inibir o enraizamento (NEUMANN; KUMAR; IMANI, 2009). O BAP em conjunto com o GA₃ não deve ser empregado para o alongamento de brotações dos materiais genéticos avaliados, pois não resulta em brotações adequadas para o enraizamento (brotações muito estioladas, com folhas reduzidas e frágeis, Figura 1 H). As melhores brotações alongadas foram obtidas em meio de cultura WPM suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de AIB, o qual promoveu o enraizamento do tufo e posterior indução de brotações (Figura 1 G). A qualidade nutricional do broto está associada ao seu enraizamento (BENNETT; MCDAVID; MCCOMB, 2003; GEORGE; HALL; De KLERK, 2008; HUNG; TRUEMAN, 2010; HUNG; TRUEMAN, 2011; SCHWAMBACH; FADANELLI; FETTNETO, 2005), e a presença da raiz no tufo provavelmente promoveu adequado metabolismo da planta (DAVEY; ANTHONY, 2010; GEORGE; HALL; De KLERK, 2008; NEUMANN; KUMAR; IMANI, 2009), resultando na produção de brotações mais vigorosas e aptas ao enraizamento. Após a coleta das brotações, os tufos foram mantidos novamente no meio de cultura WPM sem destruí-lo, a fim de produzir novos brotos (que ocorreu entre 8 a 12 dias). A partir dessa nova ótica de alongamento de brotações *in vitro*, os tufos enraizados (microcepas, Figura 1 G) podem ser mantidos por longos períodos em condições *in vitro*, produzindo brotações com adequado balanceamento hormonal e nutricional durante todo o ano, favorecendo o posterior enraizamento e aclimatização.

O enraizamento de brotações é a fase de maior dificuldade para a obtenção de microplantas (ARYA et al., 2009; BENNETT; MCDAVID; MCCOMB, 2003; HUNG; TRUEMAN, 2011), a qual pode limitar a viabilidade do emprego da técnica de micropropagação para um determinado genótipo (HUNG; TRUEMAN, 2010; MANKESSI et al., 2009; NEHRA et al., 2005). Em termos de comparação do enraizamento *in vitro* com o *ex vitro*, salienta-se a necessidade de uma repicagem a mais das mudas para um novo recipiente de cultivo, aumentando a mão-de-obra e o risco de danificar as raízes. Dessa forma, recomenda-se o enraizamento *ex vitro*, pois a microplanta é submetida a menor estresse pela não necessidade de uma repicagem a mais, resultando em maiores índices de aclimatização.

Outra vantagem a ser considerada nesse estudo, refere-se a não necessidade de aplicação de regulador de crescimento (por exemplo o AIB) para o enraizamento *ex vitro*. Esse efeito pode ser atribuído as melhores condições nutricionais e hormonais das brotações alongadas *in vitro* (BENNETT; MCDAVID; MCCOMB, 2003; HUNG; TRUEMAN, 2010; HUNG; TRUEMAN, 2011; NOURISSIER; MONTEUUIS, 2008; SCHWAMBACH; FADANELLI; FETT-NETO, 2005) proporcionadas pelo enraizamento do tufo.

Segundo Li et al. (2009) existem duas vias que podem originar e/ou induzir a formação de raízes adventícias em brotações: (i) por organogênese direta, ou (ii) por organogênese indireta. A partir da análise dos cortes histológicos da raiz foi possível verificar conexão vascular direta com o câmbio vascular, o que influencia adequada funcionalidade da raiz (Figura 3 G). A qualidade da raiz emitida está muito associada ao sucesso da aclimatização, o qual envolve o crescimento e rustificação da microplanta para promover adaptação às condições ambientais (DAVEY; ANTHONY, 2010; NEHRA et al., 2005).

Dessa forma, foi possível obter plantas normais pelo enraizamento *ex vitro* sem o uso do regulador de crescimento, possibilitando a formação de microcepa em condições *ex vitro* para a composição de um microjardim clonal (Figura 5 H). A microcepa (muda usada no canaletão e oriunda do processo de micropropagação) poderá apresentar melhores índices de enraizamento, levando em consideração o maior grau de rejuvenescimento dos tecidos promovido pelos sucessivos subcultivos *in vitro* (ASSIS; MAFIA, 2007). Contudo, os dados deverão ser analisados em futuros experimentos para verificar e validar a viabilidade de aplicação dessa técnica em escala comercial.

O protocolo desenvolvido para a micropropagação dos genótipos de *Eucalyptus benthamii* foi eficiente e poderá ser utilizado para a clonagem de espécies florestais consideradas de difícil enraizamento, como as destinadas ao plantio em regiões mais frias (espécies de *Eucalyptus* subtropicais).

5.5 Conclusões

- A multiplicação *in vitro* de gemas axilares de *Eucalyptus benthamii* depende do material genético, meio de cultura e concentração de regulador de crescimento. As melhores respostas foram obtidas em meio de cultura WPM suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA;
- O alongamento de brotações depende do material genético e regulador de crescimento. Os melhores resultados foram obtidos em meio de cultura isento de GA₃ e BAP, porém, suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de AIB;
- O enraizamento *in vitro* e *ex vitro* foram bem sucedidos, resultando raízes adventícias normais e de conexão direta com o câmbio vascular. Recomenda-se o enraizamento *ex vitro* devido aos maiores índices de sucesso na aclimatização das mudas;
- O protocolo para a micropropagação dos genótipos de *Eucalyptus benthamii* foi eficiente, sendo possível produzir mudas para formar um microjardim clonal.

Referências

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442 p.

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

ASSIS, T.F.; MAFIA, R.G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 92–121.

BENNETT, I.J.; MCDAVID, D.A.J.; MCCOMB, J.A. The influence of ammonium nitrate, pH and índole butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated *Eucalyptus globulus*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 47, n. 3, p. 355–360, 2003. DOI: 10.1023/B:BIOP.0000023877.21262.a5

BENNETT, I.J.; MCCOMB, J.A.; TONKIN, C.M.; MCDAVID, D.A.J. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. **Annals of Botany**, London, v. 74, n. 1, p. 53–58, 1994. DOI: 10.1093/aob/74.1.53

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

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

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 11–19, 2009. DOI: 10.1590/S0100-67622009000100002

BRONDANI, G.E.; GROSSI, F.; DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; HANSEL, F.A. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 4, p. 655–663, 2011. DOI: 10.4025/actasciagron.v33i4.8317

BUNN, E.; SENARATNA, T.; SIVASITHAMPARAM, K.; DIXON, K.W. *In vitro* propagation of *Eucalyptus phylacis* L. Johnson and K. Hill., a critically endangered relict from Western Australia. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 41, n. 6, p. 812–815, 2005. DOI: 10.1079/IVP2005700

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

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

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

DIBAX, R.; QUISEN, R.C.; BONA, C.; QUOIRIN, M. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and histological study of organogenesis *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 311–318, 2010. DOI: 10.1590/S1516-89132010000200009

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

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Programa SOC - software científico: versão 2.1**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 1990.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; De KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Netherlands: Springer, 2008. v. 1, 501 p.

GLOCKE, P.; DELAPORTE, K.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* × *Eucalyptus stricklandii* cv. 'urrbrae gem'. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 42, n. 2, p. 139–143, 2006. DOI: 10.1079/IVP2005740

GOMES, F.; CANHOTO, J.M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining Gum). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 39, n. 3, p. 316–321, 2003. DOI: 10.1079/IVP2002376

GRAÇA, M.E.C.; SHIMIZU, J.Y.; TAVARES, F.R. Capacidade de rebrota e de enraizamento de *Eucalyptus benthamii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 39, p. 135–138, 1999.

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

HIGA, R.C.V.; PEREIRA, J.C.D. **Usos potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage**. Colombo: Embrapa Florestas-CNPQ. 2003. 4 p. (EMBRAPA. Comunicado Técnico, 100).

HOSSAIN, H.M.M.T.; KIM, Y.H.; LEE, Y.S. The apical bud as novel explant for high-frequency *in vitro* plantlet regeneration of *Perilla frutescens* L. Britton. **Plant Biotechnology Reports**, Tokyo, v. 4, n. 3, p. 229–235, 2010. DOI: 10.1007/s11816-010-0141-4

HUNG, C.D.; TRUEMAN, S.J. Nutrient responses differ between node and organogenic cultures of *Corymbia torelliana* × *C. citriodora* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 58, n. 5, p. 410–419, 2010. DOI: 10.1071/BT10029

_____. Topographic effects differ between node and organogenic cultures of the eucalypt *Corymbia torelliana* × *C. citriodora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 104, n. 1, p. 69–77, 2011. DOI: 10.1007/s11240-010-9805-6

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

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

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

KLERK, G.J. Rooting of microcuttings: theory and practice. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 38, n. 5, p. 415–422, 2002. DOI: 10.1079/IVP2002335

KOMATSU, Y.H.; BATAGIN-PIOTTO, K.D.; BRONDANI, G.E.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. *In vitro* morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides*. **Journal of Forestry Research**, Harbin, v. 22, n. 2, p. 209–215, 2011. DOI: 10.1007/s11676-011-0152-1

LI, S.W.; XUE, L.; XU, S.; FENG, H.; AN, L. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **The Botanical Review**, New York, v. 75, n. 2, p. 230–247, 2009. DOI: 10.1007/s12229-009-9029-9

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

LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 32, n. 2/3, p. 219–230, 2000. DOI: 10.1023/A:1010746806891

MANKESSI, F.; SAYA, A.; BAPTISTE, C.; NOURISSIER, S.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of genetically related *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* clones in relation to the time spent in culture. **Trees - Structure and Function**, Berlin, v. 23, n. 5, p. 931–940, 2009. DOI: 10.1007/s00468-009-0335-y

MATVEEVA, T.V.; LUTOVA, L.A.; NESTER, Y. Tumor formation in plants. **Russian Journal of Genetics**, New York, v. 37, n. 9, p. 993–1001, 2001. DOI: 10.1023/A:1011949211985

MERKLE, S.A.; NAIRN, C.J. Hardwood tree biotechnology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 41, n. 5, p. 602–619, 2005. DOI: 10.1079/IVP2005687

MSTAT. **Statistical program**. Michigan: Michigan State University, Crop and Soil Department Science, 1994.

MUJIU, L.; ARNOLD, R.; BOHAI, L.; MINSHENG, Y. Selection of cold-tolerant eucalypts for Hunan Province. In: TURNBULL, J.W. (Ed.). **Eucalypts in Asia: proceedings of a international conference held in Zhanjiang, Guangdong, people's Republic of China**. Canberra: Elect Printing, 2003. p. 107–116. (ACIAR. Proceedings, 111).

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

NEHRA, N.S.; BECWAR, M.R.; ROTTMANN, W.H.; PEARSON, L.; CHOWDHURY, K.; CHANG, S.; WILDE, H.D.; KODRZYCKI, R.J.; ZHANG, C.; GAUSE, K.C.; PARKS, D.W.; HINCHEE, M.A. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 41, n. 6, p. 701–717, 2005. DOI: 10.1079/IVP2005691

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

NOURISSIER, S.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of two *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* mature clones. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 44, n. 4, p. 263–272, 2008. DOI: 10.1007/s11627-008-9109-2

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

PAPP, B.; PLATH, K. Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. **Cell Research**, Shanghai, v. 21, n. 3, p. 486–501, 2011. DOI: 10.1038/cr.2011.28

PINTO, G.; SILVA, S.; PARK, Y.S.; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, n. 1, p. 79–88, 2008. DOI: 10.1007/s11240-008-9418-5

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Biotechnic and Histochemistry**, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 247–249, 1973. DOI: 10.3109/10520297309116632

SCHWAMBACH, J.; FADANELLI, C.; FETT-NETO, A.G. Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 487–494, 2005. DOI: 10.1093/treephys/25.4.487

SHARMA, S.K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 5, p. 511–518, 2000. DOI: 10.1007/s002990050765

SILVA, H.D.; FERREIRA, C.A.; CORRÊA, R.S.; BELLOTE, A.F.J.; TUSSOLINI, E.L. Alocação de biomassa e ajuste de equações para estimativa de biomassa em compartimentos aéreos de *Eucalyptus benthamii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 49, p. 83–95, 2004.

THORPE, T.A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 37, n. 2, p. 169–180, 2007. DOI: 10.1007/s12033-007-0031-3

WATT, M.P.; BERJAK, P.; MAKHATHINI, A.; BLAKEWAY, F. *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 3, p. 233–240, 2003. DOI: 10.1023/A:1025819826742

WENDLING, I.; DUTRA, L.F. **Produção de mudas de eucalipto**. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. 184 p.

WIT ONDAS, H.W.; BRONDANI, G.E.; FIGUEIREDO, C.R.F.; ALMEIDA, C.V.; ALMEIDA, M. Exposição ao frio e análise histológica no enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 17., 2009, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: FMVZ, 2009. 1 CD-ROM.

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

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

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, n. 2, p. 149–158, 2011. DOI: 10.1007/s11240-010-9863-9

ANEXOS

ANEXO A - Valores médios das temperaturas do ar referente a casa de vegetação que alocou o minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii* em sistema de vasos

Semana	Temperatura (°C)				Temperatura (°C)			
	Coleta	TMAX	TMED	TMIN	Coleta	TMAX	TMED	TMIN
----- Novembro de 2009 -----					----- Maio de 2010 -----			
1		–	–	–		36,8±0,35	25,9±1,24	15,0±2,83
2	08/11/09 ⁽¹⁾	37,8±2,12	29,5±0,86	21,3±0,61	5 ^a (192 dias)	31,6±1,11	22,9±1,66	14,1±3,69
3		38,5±2,43	29,9±1,17	21,4±0,48		31,1±0,67	22,9±0,34	13,8±1,44
4		35,4±2,38	28,7±1,29	21,9±0,33		32,3±1,27	23,8±1,40	15,3±2,03
----- Dezembro de 2009 -----					----- Junho de 2010 -----			
1		35,1±4,08	28,2±2,63	21,2±1,35		32,0±0,82	22,4±2,07	12,7±3,38
2		36,4±1,63	28,6±1,32	20,8±1,11		30,1±1,53	20,7±1,20	11,3±1,91
3		33,6±3,40	27,0±1,79	20,4±1,03	6 ^a (227 dias)	32,5±1,55	21,5±0,94	11,2±1,35
4	1 ^a (52 dias)	37,0±2,39	29,5±1,14	21,9±1,36		33,2±1,09	23,0±1,08	12,7±1,66
----- Janeiro de 2010 -----					----- Julho de 2010 -----			
1		38,3±1,46	30,1±0,94	21,9±0,63		32,2±2,25	21,2±1,07	10,3±0,42
2		34,7±3,04	28,4±1,54	22,1±0,38		30,2±4,96	22,2±1,75	14,2±2,40
3		35,7±3,30	28,9±1,72	22,1±0,38		31,6±3,66	22,5±1,88	14,8±1,04
4		31,6±2,77	26,4±1,49	21,3±0,76		33,6±0,90	24,1±0,68	14,6±0,92
----- Fevereiro de 2010 -----					----- Agosto de 2010 -----			
1	2 ^a (88 dias)	40,5±2,10	30,9±1,21	21,4±0,48	7 ^a (269 dias)	32,6±1,72	23,0±1,34	13,5±1,80
2		37,8±3,83	29,8±1,89	21,8±0,45		32,4±0,61	22,3±0,98	12,2±1,65
3		36,5±4,80	29,1±2,48	21,7±0,45		32,3±0,95	20,6±0,37	9,5±0,96
4		35,3±4,30	28,1±2,55	21,0±1,15		33,8±2,52	23,4±1,87	13,0±2,07
----- Março de 2010 -----					----- Setembro de 2010 -----			
1		33,6±2,57	26,9±1,20	20,2±1,78		34,1±3,27	24,2±1,65	14,3±0,49
2	3 ^a (125 dias)	38,5±2,53	29,1±1,19	19,8±1,15		34,2±1,70	24,1±0,89	14,0±0,58
3		36,4±1,14	28,3±0,69	20,2±0,76		33,8±1,26	25,3±0,35	16,8±1,32
4		35,5±3,36	28,6±1,62	21,8±0,35		32,0±2,26	23,8±2,18	15,6±2,22
----- Abril de 2010 -----					----- Outubro de 2010 -----			
1		33,1±1,95	26,7±1,43	20,3±2,48	8 ^a (316 dias)	33,3±2,33	25,6±1,10	17,9±0,74
2	4 ^a (162 dias)	34,5±1,04	24,7±0,73	14,9±0,63		33,0±1,35	23,8±0,95	14,5±2,00
3		36,6±1,46	26,1±0,14	16,9±1,11		33,7±2,08	26,3±0,41	18,2±2,74
4		36,1±1,19	27,8±0,98	19,5±1,30		35,7±2,78	26,4±1,05	17,2±2,27

TMAX = média das temperaturas máximas, TMED = média das temperaturas médias, TMIN = média das temperaturas mínimas. ⁽¹⁾ Data do plantio das mudas no minijardim clonal. Dados apresentados como: média ± desvio padrão. Período considerado das estações do ano: primavera (22 de setembro a 21 de dezembro), verão (22 de dezembro a 21 de março), outono (22 de março a 21 de junho) e inverno (22 de junho a 21 de setembro)

ANEXO B - Valores médios das temperaturas do ar referente a casa de vegetação que alocou as miniestacas de *Eucalyptus benthamii* para a indução do enraizamento adventício

Semana	Temperatura (°C)				Temperatura (°C)				
	Coleta	TMAX	TMED	TMIN	Coleta	TMAX	TMED	TMIN	
----- Novembro de 2009 -----				----- Maio de 2010 -----					
1		-	-	-		31,0±0,87	22,7±1,17	14,3±2,45	
2	08/11/09 ⁽¹⁾	-	-	-	5ª (192 dias)	28,3±1,35	21,3±1,44	14,3±1,90	
3		-	-	-		29,0±2,17	21,7±1,02	14,4±3,76	
4		-	-	-		26,0±1,90	20,4±1,88	14,8±2,55	
----- Dezembro de 2009 -----				----- Junho de 2010 -----					
1		-	-	-		28,0±1,95	21,1±1,99	14,2±2,22	
2		-	-	-		30,1±1,00	21,2±2,44	12,4±3,65	
3		-	-	-	6ª (227 dias)	27,0±0,65	19,7±1,56	12,3±1,88	
4	1ª (52 dias)	33,1±2,01	28,3±1,12	23,4±1,38		29,2±0,67	21,4±1,34	13,5±1,45	
----- Janeiro de 2010 -----				----- Julho de 2010 -----					
1		34,4±2,12	28,9±0,73	23,4±0,85		28,5±1,93	19,0±1,11	9,5±0,88	
2		33,3±2,03	28,5±0,45	23,7±1,09		29,7±2,02	22,0±0,92	14,2±1,18	
3		33,5±1,78	28,5±0,55	23,5±0,67		30,0±1,70	21,8±0,88	13,6±2,94	
4		32,3±1,97	27,3±1,10	22,3±0,70		29,5±3,27	21,5±1,45	13,5±1,69	
----- Fevereiro de 2010 -----				----- Agosto de 2010 -----					
1	2ª (88 dias)	33,7±3,17	28,1±1,08	22,5±0,54	7ª (269 dias)	27,3±1,93	20,9±2,98	14,5±2,18	
2		32,8±2,10	28,0±0,90	23,2±0,46		27,2±1,90	20,4±1,34	13,8±0,90	
3		31,0±2,00	27,0±0,45	23,0±0,47		28,1±1,95	18,4±1,23	8,7±1,65	
4		34,5±3,21	28,3±1,65	22,0±1,19		29,5±2,01	22,0±1,20	14,4±1,55	
----- Março de 2010 -----				----- Setembro de 2010 -----					
1		29,4±2,01	25,2±2,11	21,0±1,76		29,8±2,26	22,0±0,75	14,1±0,45	
2	3ª (125 dias)	32,6±3,13	26,5±1,85	20,3±1,59		30,0±2,00	22,2±1,02	14,4±0,56	
3		33,8±2,06	27,3±1,32	20,8±1,30		29,3±1,50	23,0±0,45	16,6±1,34	
4		32,0±2,00	27,6±1,09	23,2±1,01		28,0±1,13	21,6±1,25	15,2±1,45	
----- Abril de 2010 -----				----- Outubro de 2010 -----					
1		33,0±1,90	26,8±1,79	20,5±1,65	8ª (316 dias)	29,1±2,80	23,6±1,56	18,0±1,34	
2	4ª (162 dias)	31,5±1,05	22,0±1,77	13,5±1,76		29,0±2,85	21,5±2,01	14,0±2,87	
3		31,0±3,07	23,9±0,90	16,8±2,15		29,5±1,70	24,0±1,97	18,4±1,49	
4		33,6±1,50	26,8±1,05	20,0±1,22		30,5±1,30	23,8±1,99	17,1±1,34	

TMAX = média das temperaturas máximas, TMED = média das temperaturas médias, TMIN = média das temperaturas mínimas. ⁽¹⁾ Data do plantio das mudas no minijardim clonal. Dados apresentados como: média ± desvio padrão. Período considerado das estações do ano: primavera (22 de setembro a 21 de dezembro), verão (22 de dezembro a 21 de março), outono (22 de março a 21 de junho) e inverno (22 de junho a 21 de setembro)