

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

**Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de
Eucalyptus citriodora (Hook) K.D.Hill & L.A.S.Johnson**

Lívia Vieira de Almeida

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

**Piracicaba
2012**

Lívia Vieira de Almeida
Engenheira Agrônoma

**Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus citriodora*
(Hook) K.D.Hill & L.A.S.Johnson**

Orientador:

Prof. Dr. **ANTÔNIO NATAL GONÇALVES**

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

**Piracicaba
2012**

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

Almeida, Livia Vieira de

Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K.D.Hill & L.A.S.Johnson / Livia Vieira de Almeida.- - Piracicaba, 2012.

106 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Clonagem 2. Cultura de tecidos vegetais 3. Eucalipto 4. Genótipos
5. Micropropagação vegetal 6. Morfogênese vegetal 7. Nutrição vegetal I. Título

CDD 634.9734
A447t

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

Aos meus pais, que com *muita dedicação*,
me deram muito mais do que a vida,

Ofereço

Dedico

A minha irmã, pelo amor “materno”;
Ao Francisco, por tornar minha vida mais feliz;
Aos meus avós, Marley e Décio, por *absolutamente* tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves, pela orientação, confiança, paciência, sábios conselhos e amizade;

Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida e a Dra. Cristina Vieira de Almeida pela colaboração, amizade, apoio, disponibilidade e conselhos;

Aos técnicos José Roberto Romanini e Eveline Calderan Meneghetti pelo auxílio nas atividades laboratoriais, pela convivência, paciência, carinho e amizade;

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

Às empresas Angico's Mudas Florestais, Destilaria Três Barras, *InVitroPalm* Consultoria e ao Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) pelo apoio financeiro, científico e suporte para a condução deste trabalho;

Ao MSc Israel Gomes Vieira, por conceder o material vegetal utilizado no desenvolvimento deste trabalho, pelo auxílio e confiança, essenciais para que o mesmo fosse realizado;

Aos meus queridos amigos, Gabriela Ferraz Leone, Rafaella Zanetti Dias, Germana Marcelino Cordeiro, Marília Zanuzzi Romão, Natalia Pimentel Esposito Polesi, Katherine D. Batagin Piotto, Fabiane Aparecida Artioli, Leandro Silva de Oliveira, Gilvano Ebling Brondani, Priscilla de Oliveira Antonelli e Erika Mendes Graner, pelos momentos e histórias *divertidas*, pela troca de conhecimentos, pela *amizade*, carinho e as lembranças que levarei para sempre;

Às minhas amigas Andrea Helena Radicchi e Graziela Rezende Rosa, pela amizade, carinho, incentivo, e apesar de distantes, continuam *sempre* por perto;

Ao meu noivo Francisco, por todo o auxílio, pelo *companheirismo*, pelo amor, respeito, amizade, paciência, incentivo e confiança em tudo que faço;

Aos meus pais Marcílio e Cristina pela educação, conselhos, amizade, amor e *principalmente* por nunca duvidarem de meus sonhos e de minha capacidade em realizá-los, sendo esta confiança, essencial para minha vida;

À minha irmã e amiga, Carolina, por *saber ser irmã*, por nunca ter me faltado, pelo carinho e por todos os conselhos;

À minha família, pelo amor, carinho e *alicerce* para minha vida;

Aos meus avós, Marley e Décio, Cecília e David (*in memoriam*), pelo *amor* e por serem responsáveis pela base da educação que recebi;

À Deus e aos meus Anjos da Guarda, por não me deixarem desistir de sonhar e me *iluminarem* e guiarem a cada passo.

“Se seus sonhos estiverem nas nuvens, não se preocupe, pois eles estão no lugar certo.

Agora, construa os alicerces”.

DALAI LAMA

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 O gênero <i>Eucalyptus</i>	23
2.2 <i>Eucalyptus citriodora</i> – Características gerais	27
2.2.1 Folhas e óleo essencial	28
2.2.2 Inflorescência e Fruto	30
2.3 Ocorrência natural	30
2.3.1 Cultivo do <i>E. citriodora</i> no Brasil.....	31
2.3.2 Aspectos silviculturais do <i>E. citriodora</i>	31
2.3.3 Propagação da espécie	32
2.4 Micropropagação	34
2.4.1 Morfogênese	35
2.4.2 Determinação.....	36
2.4.3 Competência celular	37
2.5 Meios de cultura	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 Localização da área experimental.....	45
3.2 Material vegetal	45
3.3 Mini jardim clonal	45
3.3.1 Resgate por estaquia	45
3.3.2 Constituição do minijardim clonal	46
3.4 Micropropagação	47
3.4.1 Coleta dos explantes	47
3.4.2 Protocolo para desinfestação dos explantes.....	48
3.4.3 Estabelecimento da cultura <i>in vitro</i>	48
3.4.4 Multiplicação.....	50
3.4.4.1 Avaliação dos Aspectos Fisiológicos	51

3.4.4.2 Avaliação Nutricional	51
3.5 Condições de cultivo <i>in vitro</i>	52
3.6 Seleção de clones responsivos à técnica de micropropagação.....	52
3.7 Procedimentos estatísticos	52
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	55
4.1 Mini jardim clonal.....	55
4.1.1 Resgate por estaquia.....	55
4.1.2 Constituição do minijardim clonal	55
4.2 Micropropagação	56
4.2.1 Estabelecimento da cultura <i>in vitro</i>	56
4.2.2 Multiplicação	57
5 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS.....	79
APÊNDICES.....	93

RESUMO

Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K.D.Hill & L.A.S.Johnson

Pelas qualidades silviculturais e da madeira, o *Eucalyptus citriodora* apresenta-se como uma excelente espécie para usos múltiplos, destacando-se a extração de óleo essencial para indústria de perfumaria e desinfetantes. Entre as espécies de eucalipto é a que apresenta madeira de alta densidade, dependendo das condições edafoclimáticas e procedência. Porém, as limitações referentes à disponibilidade de sementes e dificuldades de enraizamento de estacas e miniestacas inviabilizam sua multiplicação comercial. Sendo assim, a utilização da micropropagação objetiva acelerar os métodos convencionais de clonagem, de genótipos selecionados. Brotações com uma a três gemas de aproximadamente 1,5cm, foram transferidas para três diferentes meios básicos de cultura, MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) e JADS (CORREIA et al., 1995), suplementados a cada subcultivo com concentrações combinadas e crescentes de benzilaminopurina (BAP- 0,025; 0,05 e 0,50mg L⁻¹) e ácido naftalenoacético (ANA) (0,0025; 0,005 e 0,050mg L⁻¹), sendo que para a maior concentração de ambos os fitorreguladores foram realizados 4 subcultivos, totalizando 6 subcultivos. Vinte repetições de cada tratamento foram separadas para avaliação dos parâmetros fisiológicos (peso da matéria fresca, peso da matéria seca e número de brotos por cepa), avaliação da aparência por nota e análise química do teor nutricional. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x3x3x3), testando-se três clones, três meios de cultura, três concentrações de BAP combinadas com três concentrações de ANA. Os resultados inferiram que as respostas aos diferentes meios de cultura são genótipo-dependentes em relação às concentrações salinas, relacionando as exigências nutricionais do material genético e a relação auxina/citocinina à produção de matéria seca. A multiplicação das microcepas é influenciada por fatores epigenéticos, que atuam no aumento do vigor, tamanho das folhas, número e homogeneidade das brotações.

Palavras-chave: Nutrição mineral; Morfogênese; Genótipo-dependência; Cultura de tecidos; Micropropagação; Epigenia

ABSTRACT

Optimization techniques for shoots *in vitro* multiplication of *Eucalyptus citriodora* (Hook) KD Hill & LAS Johnson

By its silvicultural qualities, *Eucalyptus citriodora* presents itself as an excellent species for multiple uses, especially the essential oil extraction for fragrance and disinfectants industry. Among *Eucalyptus* species, this has high wood density, depending on environmental conditions and provenance. However, limitations related to seed availability and difficulties with cuttings rooting make unfeasible its commercial multiplication. Thus, the use of micropropagation aims to accelerate conventional methods of selected genotypes cloning. Shoots with one to three buds with about 1.5 cm length were transferred to three different basic culture media, MS (Murashige and Skoog, 1962), WPM (Lloyd and McCown 1980) and JADS (Correia et al. 1995), supplemented to each subculture with combined increasing concentrations of benzylaminopurine (BAP- 0, 0.025, 0.05, and 0.50 mg L⁻¹) and naphthaleneacetic acid (NAA) (0.0025, 0.005 and 0.050 mg L⁻¹), and the highest concentration of both regulators were performed during four subcultures, totaling 6 subcultures. Twenty replicates of each treatment were separated for assessment of physiological parameters (fresh weight, dry oven weight and number of shoots per microstumps), appearance evaluation by note and chemical analysis of mineral nutrient content. The experiment was conducted in a completely randomized factorial design (3x3x3x3), testing three clones, three culture media, three concentrations of BAP combined with three concentrations of NAA. The results inferred that the response to the different culture media are genotype-dependent to salt concentrations, relating the nutritional requirements of the genetic material and the relationship auxin/cytokinin production of dry matter. The multiplication of microstumps is influenced by epigenetic factors, which act to increase the strength, size of leaves, number and homogeneity of shoots.

Keywords: Mineral nutrition; Morphogenesis; Genotype-dependence; Tissue culture; Micropropagation; Epigenia

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Áreas de plantio de eucalipto no Brasil em 2011. 1
- Figura 2 - A: Floresta plantada de eucalipto para usos diversos. B: Aplicabilidade de eucalipto: captura de carbono, energia alternativa, construção civil, fabricação de móveis, entre outros. Imagens capturadas online. 1
- Figura 3 - Inflorescência de eucalipto evidenciando sua importância como espécie melífera. Fonte: http://www.vivaterra.org.br/vivaterra_artigo_tec_4.htm 1
- Figura 4 - Cultivo de *Eucalyptus citriodora* para extração de óleo citronelal: A figura evidencia o método de extração de óleo a partir de folhas, por destilação. Fotos capturadas online. 1
- Figura 5 - Aspectos do *Eucalyptus citriodora* de acordo com a descrição de Lorenzi et al. (2003). Observe a morfologia foliar, inflorescências e aspecto do tronco. 1
- Figura 6 - Detalhe do pecíolo e as folhas juvenis de *Eucalyptus citriodora*, evidenciando a presença de tricomas, principalmente presentes nas nervuras das folhas. 1
- Figura 7 - Esquematização da metodologia de quebra parcial do ápice das mudas para indução de brotações axilares (minicepas). 1
- Figura 8 - A: Brotações de minicepas de *Eucalyptus citriodora*; B: Brotações após toailete; C: Explantes: Segmentos apicais e nodais (barra: 1,5cm). 1
- Figura 9 - Fluxograma do estabelecimento *in vitro* de *Eucalyptus citriodora*. 1
- Figura 10 - Metodologia aplicada para avaliações dos parâmetros fisiológicos das microplantas submetidas a diferentes tratamentos. A: Microcepas desenvolvidas *in vitro*; B: microcepas armazenadas em sacos de papel, devidamente identificadas e conduzidas para estufa até obtenção de peso constante; C: microcepas com peso constante após sete dias mantidas em estufa a 60°C; D: moinho utilizado para moagem das amostras; E: amostras armazenadas em sacos plásticos devidamente identificados para determinação do teor nutricional. 1
- Figura 11 - Explantes de *E. citriodora* introduzidos *in vitro*. Observe a excessiva presença de tricomas por toda extensão dos explantes (seta). 57
- Figura 12 - Clones de *Eucalyptus citriodora* em fase de multiplicação em diferentes meios de cultura. 1
- Figura 13 - Clone de *Eucalyptus citriodora* evidenciando manifestação de fungo endofítico após adição de fitorreguladores (seta). 1

- Figura 14 - Médias do índice de multiplicação pelo teste de Tukey em relação aos subcultivos de *Eucalyptus citriodora* em diferentes meios de cultura..... 1
- Figura 15 - Médias do índice de multiplicação pelo teste de Tukey em relação aos clones de *Eucalyptus citriodora* cultivado em diferentes meios de cultura. 1
- Figura 16 - Microcepas dos três clones avaliados de *Eucalyptus citriodora* cultivadas em diferentes meios de cultura. Observe as diferentes respostas dos clones I93, I92 e I91 aos meios..... 1
- Figura 17 - Gráfico de médias do acúmulo de nutrientes em relação aos clones de *Eucalyptus citriodora*.: A: Nitrogênio, em relação ao meio de cultura e aos clones; B: Fósforo, em relação aos clones; C: Fósforo em relação ao meio de cultura; D: Potássio, em relação ao meio e aos clones; E: Cálcio, em relação ao meio de cultura e aos clones; F: Magnésio, em relação ao meio e aos clones; G: Enxofre, em relação ao meio de cultura e aos clones, pelo teste de Tukey. 1
- Figura 18 - Gráfico de médias do acúmulo de nutrientes em relação aos clones de *Eucalyptus citriodora*.: A: Boro, em relação ao meio de cultura e aos clones; B: Cobre, em relação aos clones; C: Cobre, em relação ao meio de cultura; D: Ferro, em relação aos clones; E: Ferro, em relação ao meio de cultura; F: Manganês, em relação ao meio de cultura; G: Zinco, em relação aos clones; H: Zinco, em relação ao meio de cultura, pelo teste de Tukey. 1
- Figura 19 - Gráfico de médias dos clones de *Eucalyptus citriodora*: A: do número de brotos e B: do peso da matéria seca por microcepas, pelo teste de Tukey em relação aos clones. 1
- Figura 20 - Microcepas de *Eucalyptus citriodora* cultivadas em diferentes meios de cultura. Observe as diferentes respostas dos clones I93, I92 e I91 aos meios avaliados, no último subcultivo em meio para multiplicação das microcepas..... 1

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constituição química da adubação aplicada no minijardim clonal de <i>Eucalyptus citriodora</i>	47
Tabela 2 - Constituição dos meios de cultura MS, WPM e JADS.....	50
Tabela 3 - Valores reais do acúmulo dos macronutrientes e micronutrientes, pelos clones avaliados de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação aos meios de cultura utilizados..	65
Tabela 4 - Parâmetros qualitativos do comportamento das microcepas de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura e o clone.	75
Tabela 5 - Resumo da análise de variância para o índice de multiplicação (IM) de microcepas de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação aos tratamentos avaliados ao longo de 90 dias de cultivo.	95
Tabela 6 - Média do índice de multiplicação por microcepas de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura e aos subcutivos.	96
Tabela 7 - Média do índice de multiplicação por microcepas de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura e clone.	96
Tabela 8 - Comparação entre os meios de cultura WPM, MS e JADS quanto à disponibilidade de nutrientes.	97
Tabela 9 - 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 <i>Eucalyptus citriodora</i> , em relação aos tratamentos avaliados ao longo de 180 dias de cultivo.	98
Tabela 10 - Média dos acúmulos de nitrogênio por explante de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura e clone.	98
Tabela 11 - Média dos acúmulos de fósforo por explante de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura.....	99
Tabela 12 - Média dos acúmulos de fósforo por explante de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao clone.	99
Tabela 13 - Média dos acúmulos de potássio por explante de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura e clone.....	99
Tabela 14 - Média dos acúmulos de cálcio por explante de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura e clone.....	100

Tabela 15 - Média dos acúmulos de magnésio por explante de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura e clone.	100
Tabela 16 - Média dos acúmulos de enxofre por explante de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura e clone.	100
Tabela 17 - 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 <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação aos tratamentos avaliados ao longo de 180 dias de cultivo.	101
Tabela 18 - Média dos acúmulos de boro por explante de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura.	101
Tabela 19 - Média dos acúmulos de cobre por explante de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura.	102
Tabela 20 - Média dos acúmulos de cobre por explante de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao clone.	102
Tabela 21 - Média dos acúmulos de ferro por explante de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura.	102
Tabela 22 - Média dos acúmulos de ferro por explante de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao clone.	103
Tabela 23 - Média dos acúmulos de manganês por explante de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura.	103
Tabela 24 - Média dos acúmulos de zinco por explante de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura.	103
Tabela 25 - Média dos acúmulos de zinco por explante de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao clone.	104
Tabela 26 - Resumo da análise de variância para o número de brotos (NB), peso da matéria fresca (PF), peso da matéria seca (PS), conteúdo relativo de água (CRA), de microcepas de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação aos tratamentos avaliados ao longo de 180 dias de cultivo.	104
Tabela 27 - Média do número de brotos por microcepas de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura e clone.	105
Tabela 28 - Média do peso da matéria fresca por microcepas de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura e clone.	105
Tabela 29 - Média do peso da matéria seca por microcepas de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao meio de cultura e clone.	105

Tabela 30 - Média do coeficiente relativo de água por microcepas de <i>Eucalyptus citriodora</i> em relação ao clone.	106
---	-----

1 INTRODUÇÃO

A técnica *in vitro* compreende um conjunto de métodos que constitui um segmento fundamental da biotecnologia vegetal. Suas aplicações têm-se mostrado de enorme importância prática na micropropagação de espécies de interesse comercial como excelente alternativa à propagação tradicional.

A micropropagação de espécies florestais tem se destacado entre as técnicas utilizadas na multiplicação de clones e mudas, potencializando a obtenção de ganhos genéticos pela seleção *in vitro* de genótipos com características superiores, sendo especialmente útil em programas de melhoramento florestal.

O melhoramento de espécies lenhosas para florestas plantadas é muito importante para o desenvolvimento do setor florestal, especialmente para espécies do gênero *Eucalyptus* que apresentam elevada importância econômica, sendo o desenvolvimento de métodos biotecnológicos, fundamental para a obtenção de maior produtividade em áreas menores, por meio da seleção de fenótipos com características de alta adaptabilidade em sistemas de plantio.

Os avanços dos sistemas de cultivo *in vitro* são necessários e dependem do aprofundamento de conhecimentos nas áreas de fisiologia, bioquímica e biologia molecular da espécie estudada. Além dos reguladores de crescimento, o equilíbrio nutricional do meio de cultura e sua interação com o material genético ou explante, representa um dos fatores que mais influencia e determina o rendimento da produtividade *in vitro*.

A maioria dos protocolos estabelecidos para a micropropagação utilizam meios de culturas com composição nutricional estabelecida e definida sem considerar as necessidades nutricionais da espécie a ser cultivada. Este fato pode, para espécies mais exigentes, representar um fator limitante às respostas morfogênicas, ocasionando o insucesso do processo. Outro fator agravante encontra-se na utilização de uma única formulação nutricional para todas as fases de cultivo *in vitro*, correndo-se o risco de não necessariamente ser favorável ao crescimento ótimo e máximo nas diferentes etapas de desenvolvimento das microplantas.

Neste contexto, considera-se que as avaliações nutricionais para a determinação da composição química da espécie, são de extrema importância para a formulação da constituição mineral do meio de cultura otimizando assim, as fases de estabelecimento, multiplicação, crescimento e enraizamento das microplantas.

A absorção de nutrientes minerais em plantas é diretamente dependente da quantidade e da forma na qual os íons estão disponíveis à planta e a sua interface com a fonte, quantidade e a seletividade no processo de absorção. De forma geral, a absorção de macro e micronutrientes pelas plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro* estão sujeitas aos mesmos fenômenos físicos, químicos e fisiológicos. Contudo, diferenças epigenéticas estabelecidas entre plantas cultivadas nas duas condições podem interferir nos processos de absorção, principalmente se considerar que na cultura *in vitro*, fatores como temperatura, luminosidade (irradiância e fotoperiodismo), umidade relativa do ar, pH, relação osmótica e nutricional são constantes e a princípio ótimos para o desenvolvimento vegetal. Para tanto, faz-se necessário o estabelecimento de subcultivos sucessivos para a renovação do meio de cultura, que devem estar perfeitamente estabelecidos com as necessidades da espécie em questão, sendo que esse sistema de cultivo *in vitro* pode desencadear uma pressão de seleção à cultura, de maneira que, quanto mais adequados estiverem os ambientes físico e químico do sistema em relação à planta, melhor será o seu desenvolvimento *in vitro*.

Diante do exposto o trabalho teve por objetivo a otimização da produção de brotações de clones selecionados de *Eucalyptus citriodora* com o uso da técnica de micropropagação, visando a padronização do rendimento de biomassa e multiplicação das brotações, favorecendo o planejamento da produção por meio do controle nutricional pela utilização de três meios de cultura básicos a propagação *in vitro*, com constituição mineral distintas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Eucalyptus*

As espécies de eucalipto são originadas quase que totalmente da Austrália. Relatos divulgados por Cozzo (1955) citam a espécie *Eucalyptus obliqua*, como a primeira espécie oficialmente reconhecida e classificada dentro da família Myrtaceae.

De acordo com Mora e Garcia (2000), em decorrência do rápido crescimento, produtividade, ampla diversidade de espécies, grande capacidade de adaptação e vasta aplicabilidade, o eucalipto é extensivamente plantado no Brasil desde a década de 60 como comentado por Barros et al. (2000). Segundo dados divulgados por Penchel et al. (1995) e Mora e Garcia (2000), o Brasil possuía, na época, uma área correspondente a mais de 3 milhões de ha de plantios florestais com eucalipto.

De acordo com dados divulgados pelo Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais (IPEF, 2005), apesar de descritas cerca de 700 espécies do gênero *Eucalyptus*, os plantios são restritos a poucas, destacando-se entre elas: *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. viminalis*, *E. deglupta*, *E. citriodora*, *E. exserta*, *E. paniculata* e *E. robusta*. Ainda, segundo o IPEF, no Brasil, as espécies *E. cloeziana* e *E. dunnii* são consideradas promissoras para as regiões central e sul, respectivamente e mais recentemente, o *E. bentamii*, vem se destacando nas regiões frias do sul do país (EMBRAPA, 1988; HIGA, 1999, 2003). Stape et al. (2004) comentaram que a produtividade das plantações tropicais de eucalipto é geralmente restrita em função das condições edáficas (como fertilidade do solo), climáticas (como seca) ou competitivas.

A Associação Brasileira de Celulose e Papel (BRACELPA, 2012) relatou que a área de plantio de eucalipto no Brasil correspondia em 2010, a 2,2 milhões de hectares. Em 2011, segundo o Portal de Reflorestamento (2012), a área de plantios de *Eucalyptus* totalizou 4.873.952 ha, representando crescimento de 2,5% (119.617 ha) frente ao indicador de 2010. O principal fator que alavancou esse crescimento salienta o Portal, foi o estabelecimento de novos plantios frente à demanda futura dos projetos industriais do segmento de Papel e Celulose. Os dados ressaltam ainda que, o plantio de áreas agrícolas com essências vegetais no Brasil, principalmente do gênero *Eucalyptus* e suas várias espécies, tem aumentado em muito nos últimos anos (Figura 1).



Figura 1 - Áreas de plantio de eucalipto no Brasil em 2011

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2012), informou que há hoje, seis milhões de hectares plantados com espécies de eucaliptos, e estima que em 2020, estejam plantados nove milhões de hectares.

Informações geradas pela BRACELPA (agosto, 2012) apontam que a produção de celulose e papel, no acumulado de janeiro a julho, manteve-se estável. Comparada ao mesmo período de 2011, a celulose apresentou leve queda de 0,7%, totalizando 8 milhões de toneladas, enquanto a produção de papel teve aumento de 0,2%, totalizando 5,8 milhões de toneladas. Ressalta ainda que, a receita de exportação do setor, de janeiro a julho, foi de US\$ 3,9 bilhões contra US\$ 4,1 bilhões no ano passado, ou seja, uma queda de 6%. Em volume, a celulose cresceu 2% e o papel recuou 4,4%, também comparadas com 2011.

Além da produção de papel e celulose, o uso da madeira como fonte de energia, advinda do cultivo de eucalipto, tem sido historicamente relacionado à produção de carvão vegetal e aos consumos residenciais, industrial e agropecuário. O gênero *Eucalyptus*, é o gênero madeirável de rápido crescimento mais plantado no país. Sua madeira é utilizada na forma direta como lenha ou do seu derivado, o carvão vegetal. Pode se dizer que a produção de carvão vegetal se destaca, em decorrência da demanda existente pelo produto junto ao setor siderúrgico (SANTOS et al., 2012). Dessa forma, a produção de biomassa para fins energéticos possui grandes vantagens ambientais, potencializando o cultivo do eucalipto, como alternativa aos combustíveis fósseis, acondicionando o seu uso à diminuição das emissões dos gases do efeito estufa. Além disso, sua madeira é utilizada na construção civil, fabricação de móveis, estruturas, caixotaria, postes, dormentes, mourões, lenha e carvão,

sendo também adequada ao uso em peças estruturais pelas suas características de resistência mecânica, durabilidade natural e menor tendência a rachaduras, apresentando densidade básica média de $0,750 \text{ g.cm}^{-3}$ (PEREIRA et al., 2000) (Figura 2).

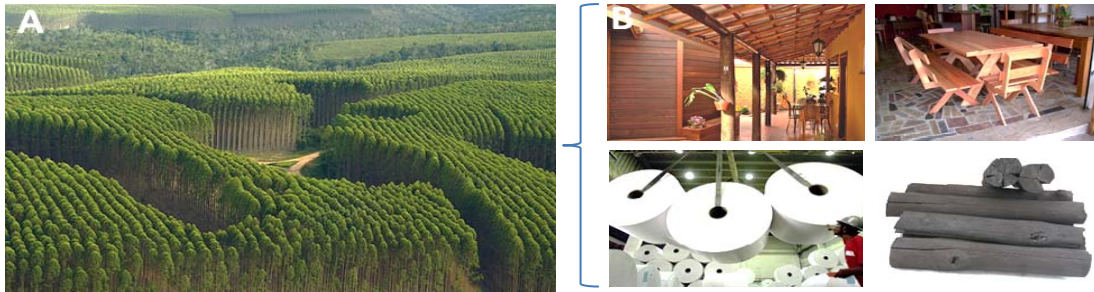


Figura 2 - A: Floresta plantada de eucalipto para usos diversos. B: Aplicabilidade de eucalipto: captura de carbono, energia alternativa, construção civil, fabricação de móveis, entre outros. Imagens capturadas online

Para industrialização, o corte do eucalipto ocorre geralmente em sete anos, em um regime que permite até três rotações sucessivas e econômicas (TEIXEIRA, 2002).

Acrescenta-se ainda que, a espécie *Eucalyptus spp.* se destaca por produzir grandes quantidades de flores (83% do ano no Estado de São Paulo), e dessa forma, é considerada uma fonte em potencial para produção de mel (Figura 3), embora, Andrade e Vecchi (1918) e tenham deixado claro que desde aquela época, não se pensava em plantá-los com esse propósito. Entretanto, desde a década de sessenta (século passado) em determinadas regiões, o eucalipto, apesar de ser uma espécie exótica, apresenta significativa importância como fonte de recursos alimentares para *Apis mellífera*, como registrado por Almeida (2002), Almeida-Anacleto (2007) e Vieira (2005) em estudos de áreas de cerrado em São Paulo e Mato Grosso do Sul. Dessa forma, pode-se dizer que, dentre as plantas fornecedoras de alimento, o eucalipto é considerado um dos melhores e mais abundantes "pastos" para as abelhas (MARCHINI; MORETI, 2003), corroborando com os relatos de Andrade (1961) e que afirmaram que entre as espécies exóticas, sem nenhuma dúvida, os eucaliptos se destacam entre as mais nectaríferas e úteis para os criadores de abelhas.



Figura 3 - Inflorescência de eucalipto evidenciando sua importância como espécie melífera. Fonte: http://www.vivaterra.org.br/vivaterra_artigo_tec_4.htm

O cultivo do eucalipto é ressaltado também, pela produção de óleo essencial, produzido principalmente nas folhas, sendo o principal componente o óleo citronelal ou óleo de citronela (XAVIER, 1993; VITTI; BRITO, 1999; BOLAND et al., 1991; ANDRADE; GOMES, 2000). De acordo com Braga (1971), com a implantação dos incentivos fiscais, naquela época, houve uma ampliação das plantações de eucalipto acarretando assim, um aumento da produção de óleo essencial, principalmente da espécie *E. citriodora*, que, na época, era a espécie mais cultivada no Brasil. O óleo obtido dessa espécie tem um alto teor de citronelal, bastante utilizado nas indústrias de perfumaria. A qualidade do óleo produzida na planta é medida em função da quantidade e teor mínimo de citronelal contido no óleo total exigido pelo mercado, que é de 70% (VITTI, 1999). O óleo essencial de procedência de *E. citriodora* apresenta em média, um teor de citronelal de 85,37%.

Segundo Braga (1971), a exploração das folhas do *E. citriodora* para produção de essências é realizada no Brasil desde a II Guerra Mundial, quando após a diminuição das importações de óleo de citronela, os consumidores nacionais optaram pela utilização de óleos desta espécie e do *E. globulus*.

Dentre as espécies de eucaliptos introduzidas no Brasil, para inúmeros fins, uma das mais cultivadas é o *Eucalyptus citriodora* (Hook) K.D.Hill & L.A.S.Johnson que, além da produção de madeira, se destaca pela produção de óleo essencial (SILVA et al., 2009) (Figura 4).

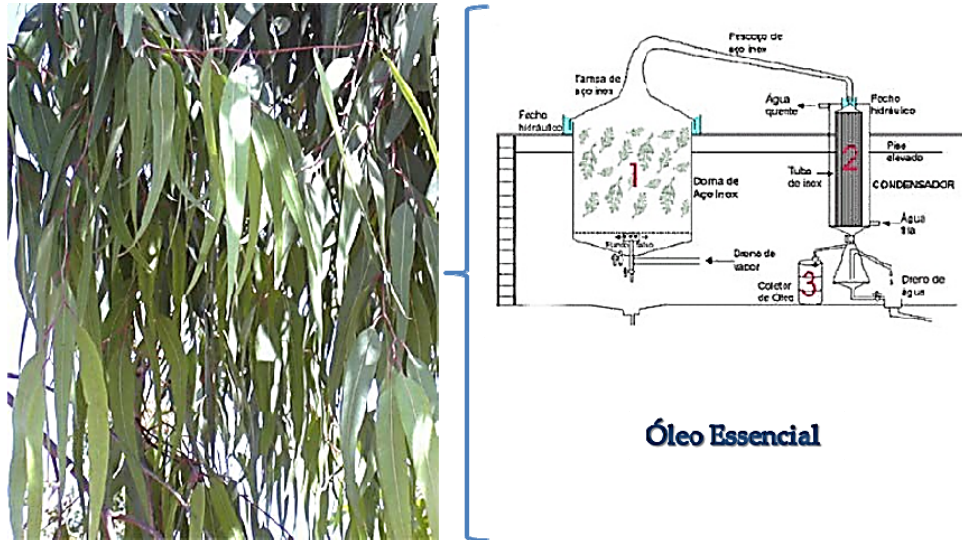


Figura 4 - Cultivo de *Eucalyptus citriodora* para extração de óleo citronelal: A figura evidencia o método de extração de óleo a partir de folhas, por destilação. Fotos capturadas online

2.2 *Eucalyptus citriodora* – Características gerais

Trata-se de uma espécie com ocorrência natural nas regiões central e norte de Queensland (Austrália), em altitudes variáveis, e que apresenta considerável tolerância à seca. A variabilidade de sítios de ocorrência da espécie, em termos de solo e topografia, é constatada observando o seu desenvolvimento em solos montanhosos, ocasionalmente rasos e com declive acentuado, que apesar da baixa condição de retenção de umidade, possuem níveis de fertilidade satisfatórios (BARROS; NOVAIS, 1990).

A planta apresenta tronco ereto com casca lisa e decídua, cinza, branca ou rósea, com porte entre 15 e 30 m de altura. A figura 5 apresenta o aspecto da árvore, das folhas e da casca, descritas por Lorenzi et al. (2003). Os autores reiteram que, a espécie é amplamente cultivada em florestamentos para produção de madeira e extração de óleo essencial das folhas para indústria de perfumaria e desinfetantes, sendo também utilizada na arborização de caminhos e estradas em áreas rurais. Entre as espécies de eucalipto, é a que apresenta madeira de maior densidade, variando de $0,73 \text{ g/cm}^3$ (PEREIRA et al., 2000) a $0,99 \text{ g/cm}^3$ (BOLAND et al., 1994, citado por VITTI; BRITO, 1999), dependendo das condições edafoclimáticas e da procedência utilizada. Vitti e Brito (1999) estudaram a produção de óleo citronelal de diferentes procedências de *E. citriodora*, cultivadas em Itatinga-SP e constataram que o teor deste óleo varia de 1,60 a 1,65%.

Devido a suas qualidades silviculturais e de madeira representa uma excelente opção para usos múltiplos como: confecção de cercas, construção rural e postes, incentivando sua disseminação, preferencialmente em pequenas e médias propriedades rurais. Dentre os múltiplos usos, a utilização de suas folhas como matéria-prima para a extração de óleo essencial é a mais relevante (VIEIRA, 2004). De acordo com Golfari et al. (1978) esta espécie foi recomendada para reflorestamento em quase todo o Brasil central, norte do Paraná, São Paulo, Minas Gerais e litoral do nordeste. Sua madeira é dura, de fácil trabalhabilidade, de cor marrom, sendo utilizada na fabricação de móveis e na construção civil (LORENZI et al., 2003).



Figura 5 - Aspectos do *Eucalyptus citriodora* de acordo com a descrição de Lorenzi et al. (2003). Observe a morfologia foliar, inflorescências e aspecto do tronco

2.2.1 Folhas e óleo essencial

As folhas do *E. citriodora* apresentam na fase de mudas, filotaxia oposta, com 3 a 5 pares alternadas, pecioladas e ovaladas, com comprimento variável entre 6,5 a 17 cm e largura entre 2,3 a 7,5 cm, apresentando coloração verde clara e ligeiramente descolorada. Na fase juvenil suas folhas são verdes claras, alternas, pecioladas, ovaladas a largo lanceoladas, com comprimento entre 14 e 21 cm e largura entre 4,5 e 8 cm. O pecíolo e as folhas, particularmente as nervuras, são cobertas por tricomas (Figura 6) que atingem 0,5 cm de

comprimento, tanto na fase de muda quanto na juvenil, e por essa razão, um simples toque na planta permite que essas exalem forte odor de citronela. No estágio de desenvolvimento intermediário, apresentam folhas verdes, alternas, pecioladas, largo lanceoladas a lanceoladas, com comprimento variável entre 13 e 30 cm e largura entre 2 e 5 cm. Na fase adulta suas folhas são verdes, alternadas, pecioladas, lanceoladas a estreito-lanceolada, com comprimento variando entre 8 e 16 cm e largura entre 0,5 e 1,8 cm (BOLAND et al., 1994) e perdem seus tricomas.



Figura 6 - Detalhe do pecíolo e as folhas juvenis de *Eucalyptus citriodora*, evidenciando a presença de tricomas, principalmente presentes nas nervuras das folhas

A maior dificuldade encontrada para a produção deste eucalipto é a baixa disponibilidade de folhas no mercado, matéria-prima indispensável para extração do óleo. Associa-se a este fato, a existência de variações quantitativas e qualitativas entre indivíduos de *E. citriodora* na produção do óleo essencial e na tolerância a pragas e doenças. A variabilidade genética de forma geral é considerada um problema para a maioria dos produtores por dificultar a estimativa da produção com adequada precisão. Entretanto, este fato é um instrumento valioso para a realização de trabalhos que visam o incremento e a padronização na produção de óleo a partir da seleção e clonagem (PAINEL FLORESTAL, 2010).

O interesse pelos óleos essenciais está baseado na possibilidade da obtenção de compostos aromáticos, os quais, de uma forma ou de outra, fazem parte do nosso dia a dia (PAINEL FLORESTAL, 2010). As dificuldades na continuidade da obtenção das plantas produtoras e o interesse na obtenção de novos componentes aromáticos contribuíram para que atualmente estes compostos fossem obtidos sinteticamente, contudo, a busca pelo

naturalismo, a dificuldade para que os aromas sintéticos se aproximem da perfeição dos aromas naturais e as dúvidas ainda existentes sobre os efeitos deletérios ao ser humano, têm feito crescer a demanda pelos produtos originais obtidos diretamente das plantas. A produção de óleo essencial é estimada em torno de 1.000t/ano, posicionando o Brasil de forma importante no mercado mundial, onde a China detém a liderança, com produções anuais que chegam a 3.000t.

2.2.2 Inflorescência e Fruto

As inflorescências do *E. citriodora* são terminais com pedúnculos e pedicelos de comprimentos variáveis (0,3 e 0,7 cm e 0,1 a 0,6 cm, respectivamente). Apresentam botões clavados com dimensões entre 0,7 e 1 cm de diâmetro e 0,4 a 0,6 cm de comprimento, com opérculo hemisférico-apiculado. Seus frutos são pedicelados, ovóides, muitas vezes com verruga, com comprimento de 0,7 cm a 1,5 cm e diâmetro de 0,7 cm a 1,1 cm, disco largo, deiscente, com 3 ou 4 válvulas, profundamente encobertas (BOLAND et al., 1994).

2.3 Ocorrência natural

O *Eucalyptus citriodora* é uma espécie de ocorrência natural da Austrália, caracterizada por apresentar um porte médio, (BOLAND et al., 1994). Dados relatados em 2001 revelaram sua distribuição em mais de 90 países (ESTANISLAU et al., 2001).

No Brasil, o *E. citriodora* está adaptado a diversas regiões, sendo amplamente cultivado para a produção de madeira, e em alguns locais, para a extração de óleo essencial (GOLFARI, 1974; GOLFARI et al., 1978; ASSIS et al., 1983; ANDRADE, 1991; ARAÚJO, 1993).

O clima mais adequado para seu cultivo é moderadamente quente úmido ou sub úmido. O *E. citriodora* ocorre em locais ondulados, incluindo platôs e serras secas, sendo tolerante a uma variedade de solos. É comumente encontrado em solos muito pobres, argilosos, preferindo algumas vezes subsolos bem drenados. Nas faixas secas de sua distribuição, ele ocorre em locais arenosos ao longo de vales profundos e rede de drenagens, onde se estendem para os topos. Esta espécie ocorre principalmente em florestas abertas ou em matas em formação (BOLAND et al., 1994).

2.3.1 Cultivo do *E. citriodora* no Brasil

Entre as espécies de eucaliptos introduzidas no Brasil o *E. citriodora* é, provavelmente, uma das que se tem mantido suficientemente pura por não se cruzar com a maioria das espécies mais comumente plantadas, sendo seus cruzamentos restritos ao *E. torelliana* e *E. maculata* (PRYOR; JOHNSTON, 1971).

Ao final dos anos 70, considerava-se desconhecida a origem geográfica das sementes de *E. citriodora* utilizadas no Brasil e que os antigos plantios existentes nos estados de São Paulo e Minas Gerais possuíam incrementos considerados entre satisfatórios e medíocres. Na região nordeste, nos estados de Pernambuco, Paraíba e Maranhão os plantios não apresentavam nem forma nem incrementos satisfatórios. As procedências introduzidas na região de Bom Despacho – MG, apresentavam incremento superior quando comparadas aos talhões originados de sementes de produção nacional (GOLFARI et al., 1978). Tais informações revelam que algumas procedências do *E. citriodora* possuem maior capacidade de produção que aquelas cultivadas no país, confirmando a teoria de que existe uma procedência adequada a cada tipo de região climática (VITTI, 1999).

A primeira descrição relatada de *E. citriodora* no Brasil foi: “...árvore alta, ornamental, folhas com cheiro de limão, madeira excelente, forte e durável empregada para pontes, calçamento e na fabricação de carros e rodas para carros. Crescimento extremamente rápido. Exemplos de nove meses com três metros de altura...” (LOFGREN, 1906).

O cultivo do *E. citriodora* tem sido ampliado no Brasil, ano após ano, pelas suas características de rápido crescimento e adaptação edafoclimática, além das características silviculturais e da qualidade de sua madeira (MORAIS et al., 2010).

A área estimada de plantio do *E. citriodora* no Brasil em 2002, foi de 85.000 ha, com maior concentração nos estados de Minas Gerais e São Paulo. No estado de São Paulo, a área plantada de *E. citriodora* é de 10.060 ha. Para obtenção de madeira de maior dimensão, manejada pelo sistema de alto fuste, temos no estado um total de 11.438 ha de eucaliptos, sendo que 7.654 ha é de *E. citriodora* (KRONKA et al., 2002).

2.3.2 Aspectos silviculturais do *E. citriodora*

Um kg de sementes totalmente limpas de *E. citriodora* contém aproximadamente 190.000 sementes, com índice de germinação média ao redor de 80%. A produção de mudas é feita por semeio direto no recipiente, com emergência em torno de 10 dias, salientando que a

plântula não tolera repicagem. O tempo de produção das mudas é de aproximadamente 100 dias, com um rendimento médio de 70.000 mudas por quilo de sementes.

Pela qualidade da madeira e possibilidade de manejo da floresta, o *E. citriodora* é amplamente difundido entre os pequenos e médios proprietários rurais. Em geral, é plantado em pequenos talhões, com espaçamento de 3 m x 2 m e manejado pelo sistema de alto fuste, em função da demanda de madeira da propriedade.

Por ser uma espécie que apresenta tubérculos lenhosos, tem como característica, alta resistência ao fogo; sobrevivência a geadas leves e tolerância à deficiências hídricas. Para sobreviver e apresentar rendimento necessitando de um mínimo de pluviometria anual em torno de 600 mm e, para crescimento mais rápido, essa precipitação mínima deve ser da ordem de 900 mm. Pela descrição das características da sua área de ocorrência natural, pode-se afirmar que há grande possibilidade de serem selecionadas populações geneticamente superiores para resistência à geada e à seca (FERREIRA et al., 1993).

Quanto ao seu incremento, Gurgel e Corsini (1970), relataram os seguintes rendimentos lenhosos volumétricos totais para o *E. citriodora* de 4,5 anos plantado em Luiz Antônio-SP: 225,70 m³/ha no espaçamento de 3,0 m x 1,5 m; 201,357 m³/ha no espaçamento de 3,0 m x 2,0 m; 186,079 m³/ha no espaçamento de 3,0 m x 2,5 m e 161,529 m³/ha no espaçamento de 3,0 m x 3,0 m.

Siqueira et al. (2002), concluíram que aos 18 meses de plantio, em um teste de espécies na região de mata atlântica de Sergipe, o *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e o *E. citriodora* foram as melhores espécies em relação ao desenvolvimento em altura de plantas e diâmetro.

2.3.3 Propagação da espécie

A propagação vegetativa, pelo processo convencional de estaquia ou pela técnica da micropropagação, facilita a multiplicação de genótipos de interesse. O processo da propagação vegetativa não inclui meiose, portanto, as brotações originárias da planta matriz são geneticamente idênticas. Todavia, podem ocorrer variações fenotípicas entre as brotações dentro de um mesmo clone. Acredita-se que as causas das variações sejam provavelmente, ambientais e causadas por fatores relacionados ao propágulo, isto é, tamanho da estaca, período em que as estacas são coletadas e as condições em viveiro relacionadas ao vigor do propágulo ou a qualidade do sistema radicular (HISHGI et al., 2000).

Deve-se considerar que o estado de maturação do material vegetal a ser propagado, tem um grande efeito na capacidade de propagação e subsequente crescimento dos propágulos originários de estacas ou da cultura de tecidos. Técnicas para manter ou reduzir a juvenilidade são a chave do sucesso para qualquer programa de propagação vegetativa, considerando-se as fases diferenciadas de maturação entre os clones que podem surgir Lerner (1958).

A propagação clonal pode ser alcançada pela macro ou micropropagação. A macropropagação envolve métodos convencionais, como a estaquia e a enxertia, enquanto que, a micropropagação é realizada por meio da técnica da cultura de tecidos. Muito tem sido feito para o melhoramento genético das espécies arbóreas nestas últimas décadas, principalmente no que se refere à hibridação entre árvores superiores e estabelecimento de pomares de sementes. No entanto, para alcançar os ganhos genéticos, em espécies florestais, é necessário um programa de melhoramento para selecionar árvores em poucas gerações, no qual são necessários não menos de 15 a 50 anos. Um dos caminhos para alcançar rapidamente os ganhos de produtividade desejados seria pelo método vegetativo através de material propagado por meio da clonagem (HISHGI et al., 2000).

A multiplicação clonal permite a manutenção plena das características da planta-mãe, de modo a obter estandes uniformes de rápido crescimento e produção de matéria-prima homogênea, o que possibilita a implantação de talhões formados por genótipos silvicultural e tecnologicamente superiores e resistentes a doenças (ALFENAS et al., 1997). Entretanto, na estaquia convencional o percentual de enraizamento de alguns clones é geralmente baixo. Outro inconveniente é a ocorrência de grandes variações na capacidade de enraizamento entre espécies e clones de eucalipto (PENCHEL et al., 1995), além da possibilidade de ocorrência da redução gradual do potencial de enraizamento com o envelhecimento ontogênico das matrizes (ASSIS, 1997).

A principal forma de multiplicação do eucalipto em escala comercial é a propagação via miniestaquia. Algumas das vantagens dessa técnica em relação aos demais métodos de propagação referem-se à viabilidade econômica; otimização da área de jardim clonal; maior grau de juvenilidade e de enraizamento (HIGASHI et al., 2000).

Inúmeros são os fatores que influenciam a propagação de plantas por estaquia no crescimento e na diferenciação das raízes, tais como: espécie, presença de indutores e inibidores de enraizamento, juvenilidade dos brotos, presença de gemas e/ou folhas, período de coleta das estacas e período de dormência (HARTMANN et al., 1997), estado nutricional (BELLAMINE et al., 1998; JOSTEN; KUTSCHERA, 1999; SCHWAMBACH et al., 2005), sanidade e variações nas condições climáticas (CORRÊA, 2004). Além das condições

ambientais, outros fatores interferem no enraizamento de estacas, entre eles destaca-se o substrato e o material vegetativo. De acordo com Gonçalves (1982) as funções básicas de um substrato são: capacidade de firmar as estacas, redução de umidade e aeração. O autor salienta que, substrato muito arenoso provoca um sistema radicular ralo, sem ramificações e friável, enquanto que substratos mais estruturados provocam um sistema radicular fibroso, ramificado e mais flexível.

Na década de 90 (século passado), foram desenvolvidas as técnicas de mini e microestaquia (ASSIS et al., 1992; ASSIS, 1997), possibilitando a clonagem comercial de genótipos de difícil enraizamento. Por meio do rejuvenescimento proporcionado pela micropropagação, o hormônio de enraizamento passou a não ser mais necessário ou apenas aplicado em pequenas concentrações, quando comparado ao processo convencional de estaquia. O estabelecimento de minijardins clonais em canteiros suspensos, quando comparado ao jardim clonal de campo, possibilitou reduções significativas no custo de implantação e manutenção, associado ao menor risco de ocorrência de doenças.

2.4 Micropropagação

A cultura de tecidos vegetais, ou cultura *in vitro* é realizada em laboratório, sob condições assépticas e implica no cultivo de células, tecidos ou órgãos, em meios de cultura apropriados, mantidos sob condições de temperatura, umidade, fotoperíodo e irradiância controlados (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). As aplicações dessa técnica tem-se mostrado de enorme importância no que se refere à propagação de espécies de interesse agrícola, farmacêutico, paisagístico e silvicultural. É também conhecida por micropropagação e atua como alternativa à propagação tradicional (KERBAUY, 1997; MANTELL; MATTHEWS; McKEE, 1994). Por meio dessa técnica pode se obter um número incalculável de propágulos, ou seja, é possível a obtenção maciça de indivíduos com a mesma origem celular, muitas vezes, em curto período de tempo.

De modo geral, a cultura de tecidos vegetais é aplicada como base para o estabelecimento de propagação e limpeza clonal via cultura de meristemas; hibridação somática por meio da fusão de protoplastos; conservação de recursos genéticos *in vitro*, onde é possível o estabelecimento de bancos de germoplasma. Acrescenta-se ainda que, essa ferramenta biotecnológica permite estabelecer estudos de metabólitos secundários a partir de suspensões celulares ou produção de sementes sintéticas (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

De maneira geral a cultura *in vitro* tem sido considerada uma metodologia de propagação quase indispensável para acelerar as técnicas convencionais de melhoramento genético. Dessa forma, considera-se que para o sucesso do cultivo *in vitro* são necessários conhecimentos de biologia vegetal no que tange aos aspectos anatômicos, fisiológicos, bioquímicos e genéticos.

2.4.1 Morfogênese

Morfogênese pode ser definida como sendo as alterações no desenvolvimento de um vegetal, resultando em mudanças estruturais nas células ou nos tecidos, capazes de originar embriões somáticos ou órgãos adventícios (ALMEIDA, 1994). De acordo com Zhuravlev e Omelko (2008), o termo morfogênese é atribuído ao desenvolvimento e a diferenciação de órgãos e tecidos de um organismo multicelular bastante estudada em plantas vasculares, vertebrados e insetos.

A morfogênese corresponde ao processo biológico, em que o vegetal assume uma forma específica durante o seu desenvolvimento, tanto em relação à sua forma externa, quanto à sua organização interna, abrangendo assim, todos os níveis de desenvolvimento, desde os componentes celulares até a planta inteira (GILBERT, 2000). É a integração entre os processos de crescimento (mudanças quantitativas) e diferenciação (alterações qualitativas), mediada por divisões e especializações das células, resultando em uma estrutura organizada (HANDRO; FLOH, 1990). De acordo com Moore (1979), o termo desenvolvimento quando empregado a plantas superiores refere-se a mudanças graduais e progressivas no tamanho, estrutura e função, as quais coletivamente correspondem a transformação de um zigoto em uma planta madura. O autor considerou que existem três processos relacionados, que juntos compreendem o desenvolvimento, ou seja: crescimento, diferenciação celular e morfogênese.

Os processos morfogênicos para a formação de novas estruturas celulares estão intimamente relacionados à *competência da célula* em responder a sinalização de fatores extrínsecos e intrínsecos, que se inicia com a quebra da determinação celular e com as primeiras divisões celulares que originarão os centros meristemáticos ou meristemóides (DHALIWAL et al., 2003). A aquisição de competência corresponde, portanto, à capacidade que uma determinada *célula-alvo* possui em responder de forma definida, a um sinal hormonal específico (CEDZICH et al., 2008; THOMPSON, 2008). As *células alvo* ou *células-tronco* (multipotentes, pluripotentes ou totipotentes) estão localizadas junto às células derivadas na região de diferenciação dos meristemas caulinares e radiculares, que apresentam elevada relação núcleo-citoplasma, onde se observa um núcleo geralmente esférico, isodiamétrico, contendo um ou mais nucléolos, com poucas regiões com eucromatina,

consequentemente com maior evidência de heterocromatina uniformemente distribuída (VERDEIL et al., 2007). O citoplasma das células alvo é denso, com muitos fragmentos de pequenos vacúolos e sem a presença de amiloplastos, apresentando ainda, muitos plasmodesmos, devido à forte dependência e interação com as células vizinhas, gerando um nicho que mantém sua identidade celular.

Para que os processos morfogênicos ocorram em respostas aos estímulos dados nas células alvo e os resultados sejam satisfatórios, é necessário um complexo controle hormonal múltiplo, espacial e temporal, por meio da regulação e expressão de sistemas gênicos múltiplos. Na planta intacta é mediada pela ação correlativa dos meristemas e de seus produtos.

2.4.2 Determinação

De acordo com o embriologista Hadom (1965), determinação é um processo em que se inicia um caminho específico de desenvolvimento, isoladamente das várias possibilidades das quais o sistema celular é competente. Portanto, um progressivo comprometimento da célula ou tecido para um caminho particular, é referido como sendo *determinação*.

Sussex (1985) definiu diferenciação como sendo as mudanças que ocorrem na célula ou em um grupo delas, provocando uma distinção na estrutura e na função. Esta definição tem implicações no âmbito intracelular, como no desenvolvimento de células com função especializada, e intercelular, como no desenvolvimento de órgãos, do embrião e da planta inteira. A diferenciação depende, na maioria dos casos, de estímulos ambientais e genéticos, sendo muitas vezes, os fitormônios os responsáveis pela regulação gênica. Basicamente, as auxinas e as citocininas controlam a morfogênese *in vitro*, que é modulada pelos demais hormônios como o ácido giberélico, o ácido abscísico e o etileno (CHRISTOU et al., 1989).

Embora diferentes estados determinados possam ser extremamente estáveis, eles não são necessariamente permanentes. Isto é particularmente observável na determinação de células de plantas, as quais mantêm a totipotência indefinidamente. Todas as células vivas da planta apresentam uma capacidade potencial em regenerar um organismo inteiro, isto é, possuem autonomia para expressar sua totipotência (FOSKET, 1994; KERBAUY, 1999), desde que submetidas a tratamentos adequados (KERBAUY, 1999).

Hicks (1980) definiu como determinação celular o processo pelo qual o desenvolvimento potencial torna-se restrito a uma via específica de diferenciação. Porém, para que ocorra a determinação, há necessidade de células com competência para responder a

um determinado estímulo específico. Em tecidos cultivados *in vitro*, a competência para algumas respostas morfogênicas pode ser intrínseca ao explante utilizado, ou então, ser induzida através de manipulações adequadas (CHRISTINSON; WARNICK, 1988).

De acordo com Meins (1979) esta estabilidade não implica em permanência, pois o estado determinado pode ser mantido por produtos característicos em células comprometidas específicas, as quais induzem sua própria síntese ou bloqueiem sua própria degradação.

Segundo Meins e Binns (1979) está implícita na interpretação de determinação celular, a noção de que as células submetem-se a mudanças estáveis, isto é, o estado determinado persiste quando células são removidas das influências que iniciaram as mudanças. A estabilidade é uma característica essencial do processo de determinação. Esta é a base para o comprometimento celular e, devido a estabilidade, células alteradas "recordam" o seu passado, resultando na natureza progressiva do desenvolvimento. Determinação também envolve uma mudança em competência, isto é, a capacidade das células em reagir aos sinais desenvolvimentais (ALMEIDA, 1994).

2.4.3 Competência celular

Células e tecidos de plantas passam por três estádios de desenvolvimento: *competência morfogênica*, *determinação do desenvolvimento* e *diferenciação morfológica* (CHRISTIANSON; WARNICK, 1983). *Competência morfogênica* é determinada como a capacidade da célula em reconhecer sinais específicos que direcionam um desenvolvimento particular (HICKS, 1994). No processo de organogênese, a competência é definida como a capacidade de responder ao estímulo hormonal necessário à indução da formação do órgão. A falha de competência de um tecido pode refletir na indução dos processos organogênicos (CARY et al., 2001).

O termo *Totipotência* ou *Pluripotência* é definido como a capacidade que as células exibem de se diferenciarem em qualquer tipo de célula, seja jovem ou adulta em condições de se manterem em cultura, sob condições específicas (SVOBODA; FLEMR, 2010). Para Kerbauy (1999) as células vegetais são autônomas e apresentam a potencialidade de regenerar plantas, desde que submetidas a tratamentos adequados. Todavia, continua o autor, a generalização do dogma da totipotencialidade não tem sido facilmente demonstrada, conhecendo-se muitas espécies cuja capacidade regenerativa não foi ainda evidenciada na prática, uma vez que, certos tecidos são mais favoráveis à regeneração de gemas, raízes e embriões somáticos, quando comparados a outros. Isto explica porque as plantas, apesar de

sua natureza sésil e necessidade de superar extremas condições ambientais e predação, desenvolveram uma grande habilidade de adaptação em seus processos de crescimento e desenvolvimento, gerando assim uma forte plasticidade que permite às plantas alterarem seu metabolismo, moldando-o de maneira mais adequada ao ambiente (RODRIGUES; KERBAUY, 2009).

No que se refere aos processos de regeneração *in vitro*, o potencial adaptativo das plantas, se reflete na capacidade de iniciar a divisão celular a partir de praticamente qualquer tecido da planta e regenerar órgãos perdidos ou subtraídos, respondendo metabolicamente diferente a cada estímulo (SLATER; SCOTT; FOWLER, 2003).

As vias de regeneração são fundamentadas na capacidade das células vegetais em proliferarem e organizarem-se em tecidos e, eventualmente, em plantas completas (KERBAUY, 1997; MANTELL; MATTHEWS; McKEE, 1994). Dessa forma, pode-se dizer que essa totipotencialidade permite que as células vegetais manifestem, em momentos diferentes e sob estímulos adversos, a capacidade de iniciar um novo indivíduo multicelular (TORRES et al., 2000).

Almeida et al. (2012) observaram em plantas de pupunheiras (*Bactris gasipaes* K.B.K.) cultivadas *in vitro*, a presença de células “tronco”, as células pré procambiais, que na dependência do estímulo respondem com capacidade multipotente, induzindo a formação de feixes vasculares; pluripotentes, formando gemas adventícias e totipotentes induzindo a formação de embriões somáticos com origem multicelular.

2.5 Meios de cultura

Os meios de cultura são *substratos* onde as microplantas (plantas micropropagadas) são cultivadas. Basicamente, são constituídos por combinações de sais minerais (macro e micronutrientes), carboidratos, vitaminas e reguladores de crescimento. Os meios nutritivos utilizados para as culturas fornecem as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão do desenvolvimento *in vitro* (TORRES et al., 1998). A constituição do meio é baseada nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas.

Teores adequados de macro e micronutriente especialmente nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e boro, são importantes no processo de enraizamento (BLAZICH, 1988; ASSIS; TEIXEIRA, 1998; ANSARI et al., 2004) das microplantas.

Nitrogênio, fósforo, zinco e manganês, são requeridos durante a iniciação das raízes. A importância do N está relacionada com a síntese de proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos. Tem papel importante na produção de triptofano, precursor natural do AIA e de substâncias de reserva. O zinco e manganês influenciam o nível de auxinas endógenas (BRONDANI et al., 2012). O cálcio é necessário para o crescimento e desenvolvimento das raízes, visto que a interrupção no suprimento deste resulta imediatamente na não formação dos primórdios de raízes e, se já formadas, na redução do crescimento e conseqüente morte (TREVIZAM et al., 2011). O efeito do boro no enraizamento adventício também tem sido bastante estudado. Este nutriente é requerido tanto durante a fase de iniciação das raízes, quanto durante o crescimento porque é requerido para a manutenção da divisão celular. O boro parece estar relacionado com processos metabólicos, que influenciam diretamente no enraizamento, como os níveis de auxinas endógenas e a atividade de AIA oxidase. Sua deficiência causa mudanças anatômicas, fisiológicas e bioquímicas que podem prejudicar a formação de raízes adventícias (BLAZICH, 1988; ONO, 1994; ONO; RODRIGUES, 1996; JOSTEN; KUTSCHERA, 1999; TREVIZAM et al., 2011).

Um dos primeiros meios de cultura desenvolvidos foi o de White (1942). Esse meio apresenta baixo nível de nitrogênio e de potássio, restringindo o seu uso para muitas células; entretanto, esta formulação com baixa concentração em sais, é usada ainda hoje, em muitas situações. O meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) foi uma das primeiras formulações melhoradas e usadas frequentemente em cultura de tecidos de plantas, apresentando altos níveis de nitrato, potássio e amônio. Segundo Leifert et al. (1991), o meio MS e suas adaptações representam, comercialmente, cerca de 50% da utilização na micropropagação. Para plantas lenhosas em geral, foi elaborado o meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1981), que apresenta uma proporção e composição salina inferior ao MS e maior disponibilidade da vitamina Tiamina – HCl, a qual apresenta resultados benéficos para a multiplicação em concentrações superiores à do meio MS (MANTOVANI; FRANCO, 1998; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

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

em grande parte baseados em modificações empíricas de formulações básicas (RAMAGE; WILLIAMS, 2002b; KANASHIRO, 2005; CORREIA, 2006; KANASHIRO et al., 2007).

Além dos nutrientes, os carboidratos também têm efeito sobre a formação de raízes adventícias (McCOWN, 1988; ONO; RODRIGUES, 1996; ASSIS; TEIXEIRA, 1998; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; PASQUAL, 2001; ALOUFA, 2003). Durante a etapa de enraizamento, quantidades ótimas de carboidratos devem ser consideradas, visto que sua influência sobre a formação das raízes *in vitro*, está relacionada ao requerimento de energia durante o processo de iniciação radicular (ASSIS; TEIXEIRA, 1998). Os carboidratos em si não aumentam a resposta ao enraizamento, mas são fontes de energia e de carbono para a síntese de substâncias essenciais para a formação de raízes, agindo ainda como agente osmótico nos meios de cultivo. A concentração de carboidrato utilizada nos meios de cultura podem variar de acordo com as fases multiplicação, alongamento e enraizamento, mas em geral são mantidas entre 20 e 30 g.L⁻¹ (McCOWN, 1988; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Na composição dos meios de cultura, acrescentam-se também fitorreguladores ou hormônios vegetais, sendo os mais frequentemente usados, as auxinas e as citocininas.

O modo de ação das auxinas vem sendo estudado há anos, entretanto, ainda não se conhece exatamente sua ação. Porém, é de conhecimento que são responsáveis pelo controle de muitos processos de desenvolvimento dos vegetais, estimulando divisões celulares, expansão e diferenciação (BERLETH; SACHS, 2001). Carland et al. (1999) e Ye (2002), relataram resultados obtidos em experimentos realizados com auxinas e constataram que esse produto estimula a diferenciação de tecidos vasculares. Alguns autores ressaltam que a ação dos carboidratos sobre o enraizamento pode estar intimamente ligada às auxinas, pois, são produtos usados para estimular o desenvolvimento de raízes laterais e a diferenciação de raízes em microplantas (NANDAGOPAL; RINJITHA KUMARI, 2007).

As auxinas podem influenciar diretamente no acúmulo basal de carboidratos, como também no aumento de sua concentração (VEIERSKOV, 1988; MCCOWN, 1988; ONO; RODRIGUES, 1996; ASSIS; TEIXEIRA, 1998; ALOUFA, 2003). No entanto, a relação exata entre auxinas, carboidratos e enraizamento é bastante complexa e o seu completo entendimento ainda é desconhecido e exige estudos mais elaborados neste aspecto (ALOUFA, 2003).

A via de desenvolvimento a ser tomada pelos tecidos das plantas pode ser determinada pela sensibilidade das células a auxina, a concentração de auxina ativa e as concentrações relativas de outros hormônios. Isto pode variar amplamente em diferentes tecidos e em

diferentes estádios de desenvolvimento. Auxina é prontamente conjugada a uma ampla variedade de moléculas, o que a torna inativa. A maior parte do AIA na planta está na forma de conjugados inativos. A conjugação e o catabolismo da auxina pode, assim, diminuir os níveis de auxina ativa. A síntese *de novo* e a hidrólise de conjugados contribuem para a regulação da homeostase pelo aumento dos níveis de auxina ativa (LJUNG; BHALERAO; SANDBERG, 2001; LJUNG et al., 2005).

As auxinas são sintetizadas não somente em tecidos jovens da parte aérea, mas também em raízes, particularmente no ápice meristemático da raiz primária (LJUNG et al., 2005). A auxina é sintetizada a partir do indol, por meio de vias dependente e independente do triptofano (WOODWARD; BARTEL, 2005). A distribuição da auxina ocorre de maneira específica e ativa. O padrão de uma resposta à auxina não é tão determinado pelos níveis relativos de síntese e catabolismo quanto o é pela capacidade de influxo e efluxo de auxina pelas células. Embora as taxas de síntese e conjugação sejam indiscutivelmente importantes para a condição total de auxina na planta, é o seu estrito gradiente de concentração através de apenas algumas células que têm um poderoso efeito no desenvolvimento das plantas. Essas observações têm tornado o transporte de auxina um dos tópicos mais estudados em termos de desenvolvimento vegetal. Desde sua descoberta, as citocininas têm sido relacionadas com quase todos os aspectos do desenvolvimento vegetal, incluindo a divisão celular, iniciação e crescimento do caule, senescência foliar e fotomorfogênese (MOK, 1994). As citocininas regulam também o desenvolvimento das sementes (RIEFLER et al., 2006) e o estresse abiótico (TRAN et al., 2007). Níveis endógenos reduzidos de citocinina inibem o desenvolvimento do caule e aumentam o crescimento e ramificação das raízes (WERNER et al., 2001), enquanto que elevados níveis de citocinina podem reduzir a dominância apical e o desenvolvimento radicular, atraso na senescência e aumento na regeneração *in vitro* (GAN; AMASINO, 1995; LI; MEDFORD et al., 1989).

As citocininas estão presentes em todos os tecidos vegetais, sendo abundantes em ápices radiculares e caulinares e em sementes imaturas. Citocininas podem atuar em longas distâncias ou nas proximidades das células onde são produzidas, ou mesmo nas próprias células que as produzem (SCHUMÜLLING, 2004). O autor ressalta ainda que, a biossíntese da citocinina ocorre nos principais órgãos das plantas. Embora as citocininas sejam produzidas em diferentes órgãos, o principal local de sua biossíntese é representado pelas raízes, de onde são transportadas para o caule pelo xilema. A análise da seiva bruta em várias plantas tem demonstrado a presença de citocininas em quantidades consideráveis, destacando-se entre elas a zeatina ribosídeo. Dessa forma, supõe-se que as citocininas são transportadas

principalmente pelo xilema sob a forma de ribosídeos (LETHAM; PALNI, 1983). Em menor proporção, as citocininas podem ainda ser transportadas na direção oposta, da parte aérea para as raízes, através do floema. As citocininas transportadas podem ter um papel importante no desenvolvimento coordenado da raiz e da parte aérea, como por exemplo, levando informações sobre a disponibilidade de nutrientes (SCHMÜLLING, 2004). Ainda segundo o autor, a maior parte das pesquisas feitas para determinar o papel das citocininas no desenvolvimento tem sido focada em analisar os efeitos da aplicação de citocinina. Esses estudos tem usado diferentes espécies e delineamentos experimentais, tornando difícil a comparação em alguns casos. Além disso, não é sempre evidente que os efeitos do hormônio aplicado são indicativos da atual função fisiológica do hormônio. O que se sabe é que a falta de citocininas pode causar um fenótipo de perda de função para traços fisiológicos e de desenvolvimento nos quais as citocininas são limitantes. O meristema apical caulinar é influenciado pela ação das citocininas, através da regulação da expressão gênica.

2.5.1 Interação auxina-citocinina e desenvolvimento

As plantas tem desenvolvido uma complexa rede de sinalização para perceber e responder aos sinais do ambiente. Invariavelmente, esses sinais estão envolvidos com hormônios vegetais. Tanto as auxinas como as citocininas são hormônios essenciais às plantas, desde o início de seu desenvolvimento, pois afetam os processos celulares de divisão, expansão e diferenciação. O balanço auxina-citocinina determina o tipo de órgão a ser formado a partir de calos indiferenciados cultivados *in vitro*: calos cultivados em meio com alta razão citocinina-auxina normalmente produzem muitas gemas caulinares e poucas raízes, enquanto calos cultivados em meio com baixa razão citocinina-auxina, normalmente produzem poucas gemas caulinares e muitas raízes. Concentrações balanceadas entre os dois hormônios, resultam na proliferação de calos indiferenciados (SKOOG; MULLER, 1957). De maneira semelhante em plantas intactas, a razão entre os níveis endógenos desses hormônios regula a formação de gemas e a dominância apical (KLEE; ESTELLE, 1991; MEDFORD et al., 1989).

Além da formação de órgãos *in vitro* e *in vivo*, a dominância apical é um dos eventos clássicos do desenvolvimento que se acredita ser controlado pela interação entre auxinas e citocininas. A auxina, derivada do ápice caulinar, inibe o crescimento de gemas axilares, enquanto que a citocinina, normalmente derivada das raízes, promove esse crescimento (LEYSER, 2003; SHIMIZU-SATO; MORI, 2001). Experimentos com ervilha mostraram que

a auxina regula negativamente a biossíntese local de citocininas no caule, sendo o inverso também verdadeiro (TANAKA et al., 2006; NORDSTROM et al., 2004). Como exemplo, podem ser citados os relatos de Eklöf et al. (2000), em que os autores revelam que plantas de tabaco superprodutoras de citocininas têm menores níveis de AIA e plantas de tabaco superprodutoras de AIA apresentam um reduzido conteúdo de citocininas.

Auxinas e citocininas interagem de uma maneira complexa para controlar muitos aspectos do crescimento e diferenciação. A interação entre esses dois hormônios pode ser sinérgica, antagônica ou aditiva, sugerindo uma complexa rede de interação de sinais. Além dessa complexidade, o modo de interação entre auxinas e citocininas é muitas vezes dependente da espécie e do tecido vegetal. A variedade de maneiras na qual auxina e citocinina regulam respostas fisiológicas (por exemplo, os dois hormônios agem sinérgicamente para regular a divisão celular, e antagonicamente para controlar o crescimento de brotos ou raízes laterais) sugere que podem haver múltiplos mecanismos de interação (COENEN; LOMAX, 1997). Essa interação pode acontecer pela regulação tanto da homeostase, quanto da percepção desses hormônios (NORDSTRÖM et al., 2004), afetando, inclusive, o nível de sinalização (MULLER; SHEEN, 2008).

Aminoácidos e amidas também são adicionados aos meios de cultura e têm importância na amplificação das respostas morfogênicas, proporcionando maior crescimento e facilitando a diferenciação no sentido da regeneração. A tirosina, por exemplo, apresenta influência na iniciação da parte aérea em cultura de calos, a arginina atua sobre o enraizamento e a L-serina mostra-se muito eficaz na obtenção de embriões haploides. As amidas L-glutamina e L-asparagina são benéficas na obtenção de embriões somáticos.

Outro composto fundamental para o desenvolvimento *in vitro* são as vitaminas, compostos orgânicos que, em baixas concentrações, desempenham funções reguladoras catalíticas no metabolismo celular, sendo a tiamina, a vitamina mais comumente usada em cultura de tecidos. Outras vitaminas utilizadas incluem ácido nicotínico, piridoxina e riboflavina (GEORGE, 1996). De acordo com Ammirato (1993), além das vitaminas do complexo B, a presença da biotina no meio de cultura também é importante, por atuar no metabolismo do ácido aspártico e nas reações do ciclo de Krebs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização da área experimental

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e no laboratório de Fisiologia das Árvores, ambos pertencentes ao Departamento de Ciências Florestais na Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), Piracicaba - SP.

3.2 Material vegetal

O trabalho foi conduzido a partir de brotações obtidas em minijardim clonal de três clones de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K.D.Hill & L.A.S.Johnson (USP/IPEF 91; USP/IPEF 92 e USP/IPEF 93). As estacas de procedência de cepas cultivadas em sistema de canaletão em pleno sol no viveiro do Departamento de Ciências Florestais na ESALQ foram cedidas pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) e obtidas a partir de sementes australianas de acordo com os dados descritos por Vieira (2004).

3.3 Mini jardim clonal

3.3.1 Resgate por estaquia

Para obtenção das fontes de explantes para o cultivo *in vitro*, foram constituídos minijardins clonais a partir do resgate por estaquia das matrizes de *E. citriodora* pertencentes ao jardim clonal do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF), na ESALQ/USP, Piracicaba, SP. Para o resgate das matrizes, foram coletados ramos jovens com aproximadamente 12 cm, com 3 a 4 pares de folhas, sendo a ponteira descartada e a área foliar reduzida a 50%. As bases das estacas foram cortadas em bisel e imersas por 10 segundos em solução hidroalcoólica (1:1 v/v) contendo 8g.L^{-1} de ácido indol butírico (AIB) de acordo com Brondani (2008), e estaqueadas em tubetes plásticos de forma cônica de 55 cm^3 contendo como substrato a mistura de vermiculita média e substrato comercial a base de casca de pinos e vermiculita (1:1, v/v). O material vegetal foi mantido em casa de vegetação automatizada com nebulização intermitente, resultando no controle de temperatura e umidade relativa do ar ($33\pm 5^\circ\text{C}$ e 80%, respectivamente). O enraizamento foi avaliado aos 90 dias após o estaqueamento.

3.3.2 Constituição do minijardim clonal

As estacas enraizadas em tubetes foram transplantadas em vasos plásticos (18 x 16 x 11 cm) com duas aberturas na porção inferior, em substrato composto por areia, fração fina ($0,10 \text{ mm} < \text{tamanho de partícula} < 0,25 \text{ mm}$), peneirada em malha fina ($0,25 \text{ mm } \varnothing$), lavada e autoclavada durante 1 hora a 121°C ($1,0 \text{ kgf cm}^{-2}$). Os vasos permaneceram em bancadas de grades metálicas a 85 cm do solo, com duas mudas/clone.

Após 10 dias do transplante das estacas, realizou-se a quebra parcial (dobra) do ápice das mudas para a indução de brotações apicais e axilares dos clones, acelerando a formação das minicepas (Figura 7).



Figura 7 - Esquematização da metodologia de quebra parcial do ápice das mudas para indução de brotações axilares (minicepas)

3.3.2.1 Manejo das minicepas

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

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

Macronutrientes	Quantidade (mg.L ⁻¹)	Micronutrientes	Quantidade (mg.L ⁻¹)
N-NO ₃ ⁻	60	Fe	2
N-NH ₄ ⁺	30	Cu	0,1
P	12	Mn	1,6
Ca	40	Mo	0,02
K	80	B	1
Mg	12	Zn	1
S	10		

3.4 Micropropagação

3.4.1 Coleta dos explantes

As minicepas foram pulverizadas com 2,4g L⁻¹ (p/v) do fungicida Cerconil[®] um dia antes de cada coleta das brotações usadas como explantes, as quais foram mantidas úmidas até a retirada das folhas. Em seguida, foram lavadas em água corrente, seccionadas e separadas em segmentos apicais e nodais (com um par de gemas axilares) com 1,5 cm de comprimento (Figura 8).

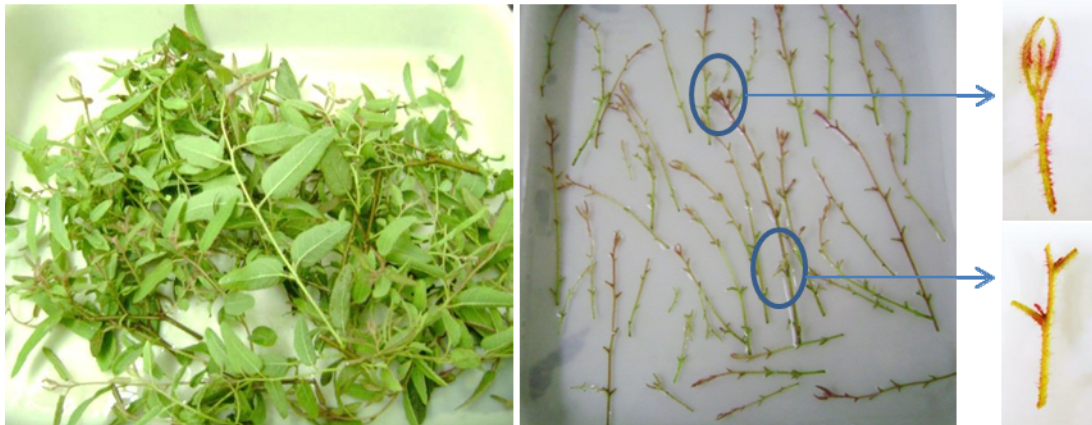


Figura 8 - A: Brotações de minicepas de *Eucalyptus citriodora*; B: Brotações após toalete; C: Explantes: Segmentos apicais e nodais (barra: 1,5cm)

3.4.2 Protocolo para desinfestação dos explantes

Os seguintes passos foram adotados durante o protocolo para desinfestação dos explantes:

1. Imersão em água destilada não autoclavada durante 20 minutos (com troca da água a cada 5 minutos, totalizando 4 imersões);
2. Imersão em solução de Cerconil ($2,4\text{g L}^{-1}$ p/v), por 10 minutos;
3. Enxágue com água deionizada e autoclavada (2 vezes);
4. Imersão por 15 segundos em solução hidroalcoólica 70% (água:álcool, v/v);
5. Enxágue em água deionizada e autoclavada (1 vez);
6. Imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial (30%, 2% de cloro ativo) durante 15 minutos;

Todas as soluções utilizadas referentes à desinfestação foram acrescidas de 6 gotas de Tween 20 sob agitação constante.

3.4.3 Estabelecimento da cultura *in vitro*

O trabalho foi dividido em três fases apresentadas sumariamente no fluxograma abaixo (Figura 9).

Micropropagação de *E. citriodora*

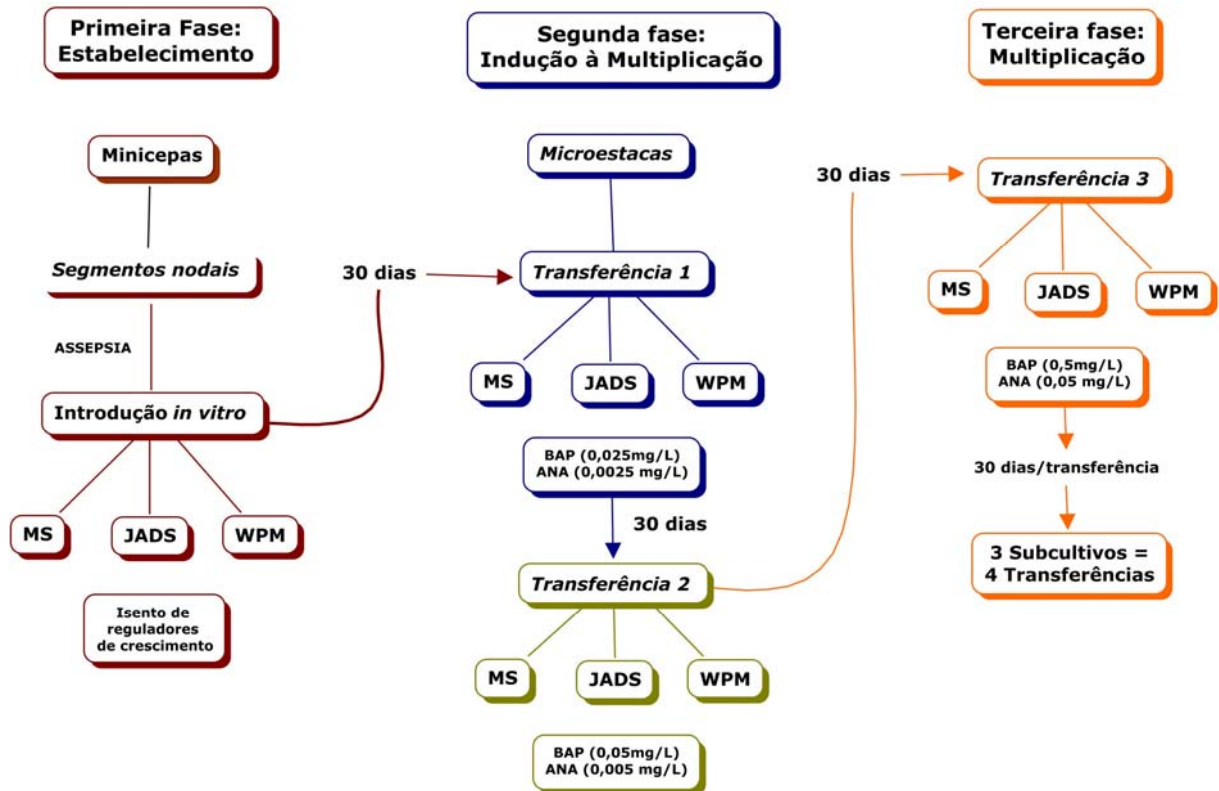


Figura 9 - Fluxograma do estabelecimento *in vitro* de *Eucalyptus citriodora*

Os explantes dos três clones foram inoculados em três diferentes meios básicos de cultura, MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), WPM (LLOYD; MCCOWN 1981) e JADS (CORREIA et al., 1995), (Tabela 2), todos isentos de reguladores de crescimento e geleificados com Agar.

Tabela 2 - Constituição dos meios de cultura MS, WPM e JADS

	g. L ⁻¹	mg. L ⁻¹		
Macronutrientes	Peso molecular	MS	WPM	JADS
NH ₄ NO ₃	80,04	1.650,00	400	320
KNO ₃	101,11	1.900,00	–	809
CaCl ₂ .2H ₂ O	147,02	440	96	–
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,15	–	556	1.181,00
KH ₂ PO ₄	136,09	170	170	408
K ₂ SO ₄	174,26	–	990	–
MgSO ₄ .7H ₂ O	246,48	370	370	739,5
Micronutrientes	Peso molecular	MS	WPM	JADS
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	372,24	37,3	37,3	74,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	278,02	27,8	27,8	55,6
MnSO ₄ .H ₂ O	169,01	16,9	16,9	16,9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287,54	8,6	8,6	4,32
H ₃ BO ₃	61,83	6,2	6,2	3,1
KI	165,99	0,83	–	–
CuSO ₄ .5H ₂ O	249,68	0,025	0,25	1,25
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241,95	0,25	0,25	0,15
CoCl ₂ .6H ₂ O	237,93	0,025	–	0,25
Vitaminas	Peso molecular	MS	WPM	JADS
Tiamina-HCl	337,3	0,1	1	5
Piridoxina-HCl	205,6	0,5	1	0,5
Ácido Nicotínico	123,11	0,5	1	0,5
Pantotenato Ca ²⁺	476,54	–	1	2,4
Biotina	244,3	–	0,01	–
Aminoácidos	Peso molecular	MS	WPM	JADS
Cisteína	121,16	–	–	5
Glicina	75,07	2	1	–
Fonte de Carbono	Peso molecular	MS	WPM	JADS
Mio-inositol	180,16	100	100	100
Sacarose	342,3	30.000,00	30.000,00	30.000,00

3.4.4 Multiplicação

Brotações provenientes da fase de estabelecimento, com uma a três gemas de aproximadamente 1,5cm, foram transferidas para frascos com 30 ml do mesmo meio básico de cultura da introdução (MS, WPM e JADS), suplementados a cada subcultivo com concentrações combinadas e crescentes de benzilaminopurina (BAP-0,025; 0,05 e 0,50mg L⁻¹) e ácido naftalenoacético (ANA) (0,0025; 0,005 e 0,050mg L⁻¹), sendo que para a maior

concentração de ambos os fitorreguladores foram realizados 4 subcultivos, totalizando 6 subcultivos. Avaliou-se o número de gemas formadas por explante aos 60 dias após a transferência. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3x3x3x3) testando-se três clones, três meios de cultura, três concentrações de BAP combinadas com três concentrações de ANA, contendo cinco repetições com 10 explantes.

3.4.4.1 Avaliação dos Aspectos Fisiológicos

Após quatro subcultivos em intervalos de 30 dias, 20 repetições (número de frascos), de cada tratamento foram separadas para avaliação dos parâmetros fisiológicos (peso da matéria fresca, peso da matéria seca e número de brotos por cepa) e avaliação da aparência por nota (zero a cinco).

3.4.4.2 Avaliação Nutricional

Após a mensuração do peso de massa fresca, as microcepas foram armazenadas em sacos de papel e acondicionadas em estufa a 60°C até manutenção de peso constante. Em seguida, as microcepas foram pesadas e então moídas para o preparo das amostras para posterior análise química do teor nutricional no Laboratório de Ecofisiologia Florestal e Silvicultura (LEFS), da ESALQ/USP (Figura 10).

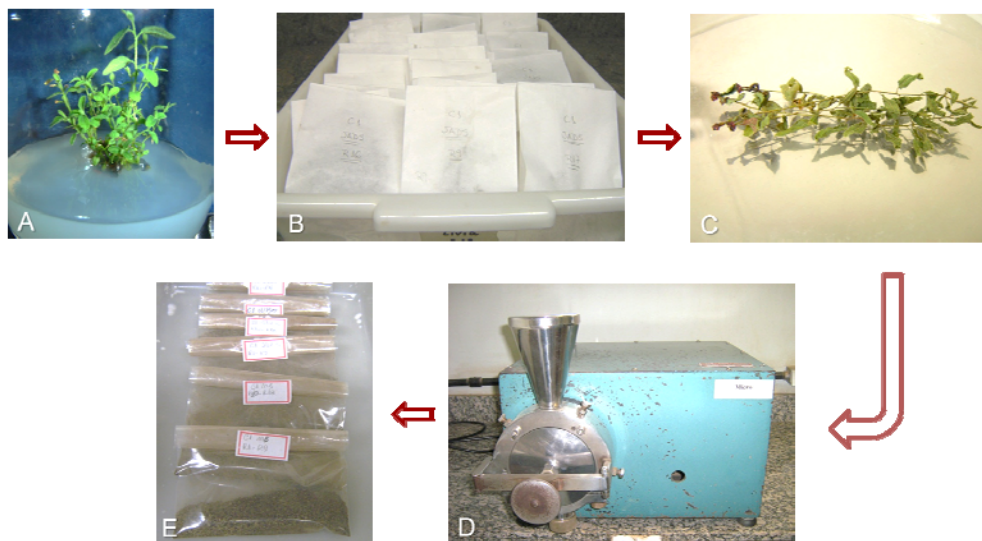


Figura 10 - Metodologia aplicada para avaliações dos parâmetros fisiológicos das microplantas submetidas a diferentes tratamentos. A: Microcepas desenvolvidas *in vitro*; B: microcepas armazenadas em sacos de papel, devidamente identificadas e conduzidas para estufa até obtenção de peso constante; C: microcepas com peso constante após sete dias mantidas em estufa a 60°C; D: moinho utilizado para moagem das amostras; E: amostras armazenadas em sacos plásticos devidamente identificados para determinação do teor nutricional

**3.5
Co
ndi
ção**

s de cultivo *in vitro*

Durante todas as fases de desenvolvimento *in vitro* o material vegetal foi mantido em sala de crescimento com temperatura mantida a 25°C (\pm 2°C), fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.6 Seleção de clones responsivos à técnica de micropropagação

Os clones foram submetidos às seguintes análises:

- Índice de contaminação das microestacas: selecionando-se os clones com maior tolerância aos tratamentos de desinfestação, bem como o menor índice de contaminação;
- Respostas morfogênicas: selecionando-se as mini e microestacas de clones que apresentaram as melhores respostas morfogênicas, no sentido de garantir melhor desenvolvimento das mudas e também os melhores índices de propagação.

3.7 Procedimentos estatísticos

Os dados mensurados de todos os experimentos foram submetidos ao teste de Lilliefors ($p < 0,05$) e de Bartlett ($p < 0,05$) e, em seguida, realizou-se a análise de variância

(ANOVA, $p < 0,05$ e $p < 0,01$). Os dados qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e, os quantitativos foram submetidos a análise de regressão polinomial ($p < 0,01$ e $p < 0,05$).

|

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Mini jardim clonal

4.1.1 Resgate por estaquia

Na produção de mudas de eucalipto, a propagação por estaquia é, ainda, a técnica de maior viabilidade econômica para o estabelecimento de plantios clonais, pois permite a multiplicação de genótipos selecionados a um custo menor, em curto período de tempo (PAIVA; GOMES, 1995). Entretanto, a dificuldade de enraizamento das estacas de algumas espécies envolve a participação de inúmeros fatores relacionados à própria planta (planta matriz) bem como o ambiente, que pode constituir uma série de dificuldades (GONTIJO et al., 2003), podendo ser superadas se forem fornecidas condições e ótimos fatores para o enraizamento das mesmas (OLIVEIRA, 2000). Baccarin (2012) relatou que um dos maiores problemas relacionados à estaquia, consiste na obtenção de brotos que apresentam competência à rizogênese. O autor afirma que essas características estão diretamente relacionadas à origem genética da planta-mãe e ao grau de juvenilidade em que se encontram as brotações que serão utilizadas para a estaquia, corroborando dessa forma, com as observações de Gontijo et al. (2003). Os resultados obtidos neste trabalho corroboram essas informações, uma vez que entre os 10 ramos estaqueados de cada um dos clones utilizados, cinco estacas do clone I93 enraizaram, quatro do clone I92 e apenas duas do clone I91. Por essa razão, foram padronizadas para a constituição do minijardim clonal duas estacas enraizadas por clone.

4.1.2 Constituição do minijardim clonal

Com a quebra do ápice caulinar das estacas enraizadas em vasos e mantidas em casa de vegetação, observou-se após 21 dias de cultivo o desenvolvimento das gemas axilares (indução de brotações). Tal fato ocorreu em função da quebra da dominância apical, a qual proporciona a emissão de novas brotações, as miniestacas, que serão induzidas ao 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 (XAVIER; WENDLING, 1998; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000; SCHWAMBACH et al., 2008).

Dentre os clones de *E. citriodora* avaliados neste trabalho, não foram observadas diferenças quanto a resposta a indução de brotações, sendo que todos responderam igualmente, produzindo miniestacas com alto vigor e sanidade aparente para posterior introdução no cultivo *in vitro*.

4.2 Micropropagação

4.2.1 Estabelecimento da cultura *in vitro*

A contaminação está associada ao tipo de planta, procedência, sazonalidade e condições ambientais em que se desenvolve. Em determinadas espécies, o material vegetal proveniente de condições de campo pode apresentar elevada concentração de micro-organismos (SATO et al., 2001). Contudo, mesmo as plantas submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação são fontes potenciais de micro-organismos, os quais podem se tornar limitantes aos procedimentos de cultivo *in vitro* (MEDEIROS, 1999). Outro fator agravante que contribui para a contaminação dos explantes quando cultivados *in vitro* é a presença de tricomas foliares onde os micro-organismos se alojam em abundância (PASCHOLATI; LEITE, 1995), dificultando o estabelecimento da cultura, como no caso do *E. citriodora*, que possui grande quantidade de tricomas em toda a superfície da epiderme dos explantes (Figura 11). A presença dos tricomas potencializou o índice de contaminação fúngica e/ou bacteriana, atingindo 90 a 93% de perda dos explantes, necessitando, portanto, a realização de vários testes para que a desinfestação fosse eficiente.

Para cada espécie vegetal e tipo de explante, a taxa de contaminação, juntamente com a sensibilidade dos tecidos, determina a melhor estratégia de ação e de produtos a serem utilizados para se obter sucesso na técnica *in vitro* (XAVIER et al., 2009). Após definição do protocolo de desinfestação, foi possível iniciar os testes para estabelecimento nos diferentes meios de cultura para os três clones desejados.

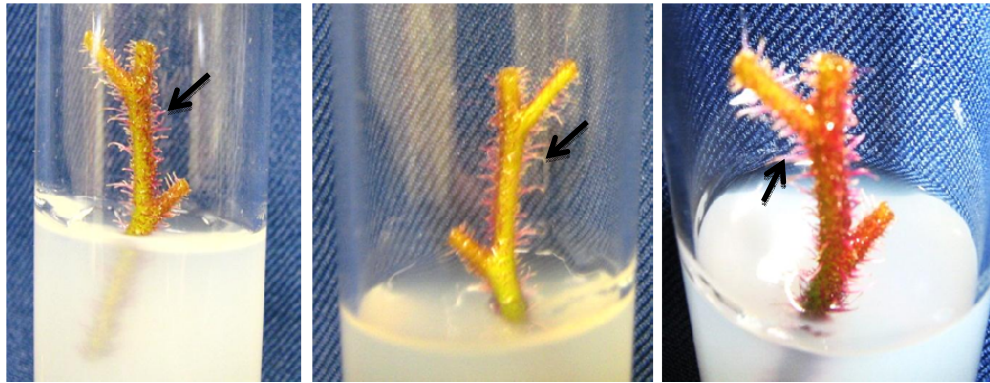


Figura 11 - Explantes de *E. citriodora* introduzidos *in vitro*. Observe a excessiva presença de tricomas por toda extensão dos explantes (seta)

Os resultados alcançados permitiram inferir que o sucesso do estabelecimento *in vitro* do *E. citriodora* é extremamente dependente da sazonalidade, sendo o início do verão a melhor época do ano para a coleta de explantes dos clones avaliados, apresentando brotações mais vigorosas e respostas mais rápidas aos estímulos dados. Este fato é corroborado pelas afirmações de Murashige (1974), em que o autor relata que são vários os fatores a serem considerados na seleção dos explantes, dentre eles o órgão a ser utilizado, a idade fisiológica, a época do ano em que é realizada a coleta e as condições gerais da planta doadora. Isso porque, a variação sazonal consiste em um conjunto de fatores que alteram o metabolismo vegetal, por exemplo, a variação da temperatura durante o ano provoca mudanças das rotas biossintéticas nos vegetais, implicando em diferentes tipos e quantidades de certas substâncias (SILVA, 2004), lembrando que a principal alteração ocorre no metabolismo de ácidos graxos, especialmente dos componentes da parede celular (TAIZ; ZEIGER, 2004), dificultando assim as respostas morfogênicas.

4.2.2 Multiplicação

A multiplicação constitui uma das etapas da micropropagação, cujo objetivo é a obtenção do maior número de brotações a partir de subcultivos sucessivos (DEBERGH; READ, 1990). Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram diferenças qualitativas no comportamento dos clones em relação aos diferentes meios de cultura. Observou-se que o vigor das microcepas variou de clone para clone sendo que, os clones I91 e I92, apresentaram melhores resultados no meio de cultura WPM, enquanto o clone I93 respondeu melhor ao meio de cultura JADS, ressaltando desta forma que os resultados foram genótipo-dependentes. Em um âmbito geral, o meio de cultura MS não proporcionou resposta

satisfatória para nenhum dos clones, enquanto o meio de cultura JADS permitiu melhores resultados quanto ao vigor e ao desenvolvimento dos três clones. Estes resultados podem ser observados na figura 12.

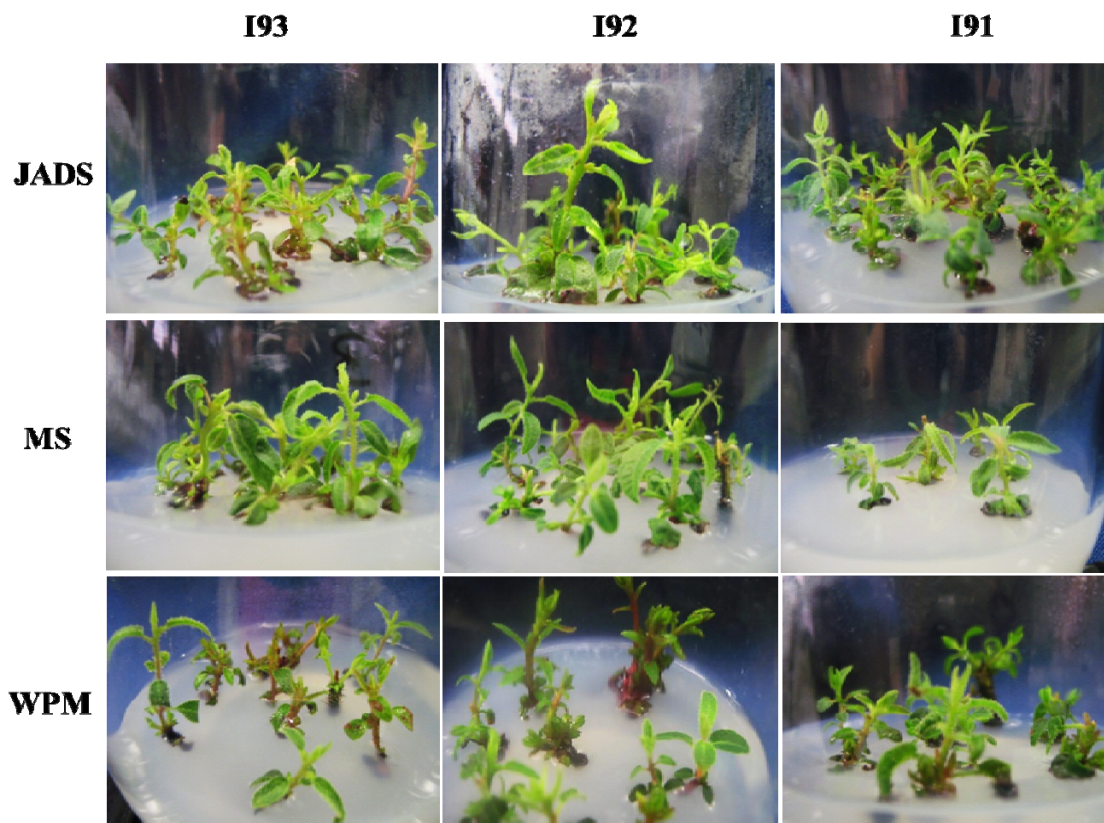


Figura 12 - Clones de *Eucalyptus citriodora* em fase de multiplicação em diferentes meios de cultura

As taxas de crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas *in vitro* são geneticamente determinadas, embora sejam limitadas pelo microambiente físico e químico dos recipientes de cultivo, como excesso de nutrientes, alta concentração de reguladores de crescimento e baixa irradiância, que podem comprometer a formação das plantas (CASANOVA et al., 2008), corroborando com Christou et. al. (1980) que atribui aos fitormônios a maior responsabilidade pela regulação gênica. Neste trabalho, o aumento gradativo de reguladores de crescimento foi essencial à produção *in vitro* de *E. citriodora*, uma vez que a adição direta de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de benzilaminopurina (BAP) e $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido naftalenoacético (ANA) ao meio de cultura, aparentemente promoveu estresse nas microcepas, favorecendo a manifestação endofítica (Figura 13). Em pesquisas realizadas com rizobactéria, Antoun et al. (1998), observaram que os fitormônios podem ser benéficos em

concentrações baixas e prejudiciais em concentrações mais elevadas, sendo que seu papel na promoção do crescimento deve ser mais complexo do que normalmente seria esperado.



Figura 13 - Clone de *Eucalyptus citriodora* evidenciando manifestação de fungo endofítico após adição de fitorreguladores (seta)

Cabe salientar que os micro-organismos endofíticos ou endófitos são caracterizados como sendo aqueles que vivem no interior de células ou tecidos vegetais em parte ou em todo o ciclo de vida da planta, sem, no entanto, demonstrar qualquer sintoma visível de sua presença (HARDOIM et al., 2008; SUN et al., 2008; QIN et al., 2011). Todavia, sua manifestação *in vitro* ocorre em condições de qualquer estresse abiótico que eventualmente ocorra durante as diferentes fases de micropropagação (ALMEIDA et al., 2005). Dessa forma, pode-se inferir que as concentrações de reguladores de crescimento adicionados ao meio, podem ter causado um estresse fisiológico nas microcepas que acarretou a manifestação endofítica, a qual não foi observada quando o acréscimo dos reguladores de crescimento foi feito gradativamente.

Além da concentração hormonal, segundo Bennett, McDavid e McComb (2003) existem alguns fatores importantes que contribuem para o sucesso da micropropagação de *Eucalyptus* sp, como a estabilização da cultura *in vitro* por subcultivos sucessivos, a composição do meio (mineral e hormonal) e um protocolo de cultura ajustado à espécie a ser estudada. No cultivo *in vitro* de *E. citriodora* observou-se que o índice de multiplicação foi influenciado pela interação entre o meio de cultura utilizado com relação aos clones e ao número de subcultivos. Como se observa na Figura 14, no primeiro subcultivo avaliado, o melhor resultado foi obtido no meio de cultura JADS, seguido do meio de cultura MS, os quais não apresentaram diferenças significativas, enquanto que o meio de cultura WPM não se mostrou efetivo a indução à multiplicação. No segundo subcultivo, o meio de cultura MS

se destacou perante os outros meios significativamente, a taxa de indução a brotação do meio de cultura JADS caiu de forma considerada, igualando-o ao resultado do WPM. No último subcultivo avaliado, todos os meios de cultura diferiram significativamente, seguindo a sequência MS, JADS e WPM.

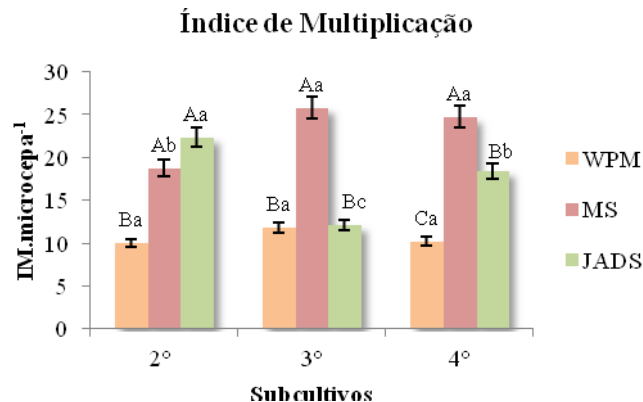


Figura 14 - Médias do índice de multiplicação pelo teste de Tukey em relação aos subcultivos de *Eucalyptus citriodora* em diferentes meios de cultura

Resultados naturalmente explicados se considerarmos a constituição nutricional dos meios de cultura, uma vez que o meio MS é extremamente rico em nitrogênio, presente na forma de nitrato de amônia (NH_4NO_3 1650 mg.L^{-1}) e nitrato de potássio (KNO_3 1900 mg.L^{-1}) em concentrações superiores às encontradas nos meios JADS (NH_4NO_3 320 mg.L^{-1} e KNO_3 809 mg.L^{-1}) e WPM (NH_4NO_3 400 mg.L^{-1}). O nitrogênio é um elemento essencial ao desenvolvimento dos vegetais, por possuir função estrutural fazendo parte de muitos componentes da célula, como proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, enzimas, coenzimas, vitaminas e pigmentos, e participa de processos como absorção iônica, fotossíntese, respiração, multiplicação e diferenciação celular (CASTRO, 2007), atuando principalmente no aumento da parte aérea e consequente a multiplicação dos brotos (AMMIRATO et al., 1993).

Observando as respostas individualizadas de cada meio de cultura aos diferentes subcultivos, percebe-se que o WPM, apesar de apresentar um aumento não significativo no segundo subcultivo, manteve seu comportamento em baixos níveis de multiplicação. Este fato pode ser atribuído a sua constituição mineral, considerando que os índices de nutrientes são os mais baixos, em comparação aos meios de cultura MS e JADS, diminuindo o ritmo de multiplicação comparativamente. Além disso, o fato deste meio disponibilizar nitrogênio apenas na forma NH_4^+ dificulta o desenvolvimento da planta, primeiramente por ser a forma

mais rápida de absorção, exaurindo mais rapidamente a presença deste nutriente no meio de cultura, e também pelo fato de que suprir nitrogênio em mistura balanceada de cátions e ânions, tende a reduzir o rápido aumento no pH do meio, que é comumente observado quando o nitrogênio é fornecido apenas na forma do ânion nitrato (ASHER; EDWARDS, 1983). Mesmo quando o pH é mantido neutro, a maioria das plantas cresce melhor se tiver acesso tanto a NH_4^+ quanto o NO_3^- , pois a absorção e a assimilação das duas formas de nitrogênio promovem um balanço cátion-ânion dentro da planta (RAVEN; SMITH, 1976; BLOOM, 1994).

O meio de cultura MS teve um aumento significativo nos dois últimos subcultivos avaliados. Isso provavelmente se deve à adaptação das microcepas ao meio, que segundo Rodrigues e Kerbauy (2009) desenvolvem grande habilidade de adaptação em seus processos de crescimento e desenvolvimento, gerando assim uma forte plasticidade que permitiu às plantas alterarem seu metabolismo, moldando-o de maneira mais adequada ao ambiente. Apesar da alta concentração de nitrogênio, potássio e zinco, os demais sais estão presentes de forma moderada no meio de cultura MS. Dessa forma, acredita-se que após assimilar a concentração hormonal a qual foram submetidas, as microcepas possivelmente assimilaram mais eficientemente os nutrientes disponíveis no meio de cultura em maior concentração e então responderam ao estímulo para multiplicação. Possivelmente essa melhor assimilação ocorreu em decorrência dos transportes de auxina na planta, que é através de um transportador H^+ - AIA⁻ do tipo simporte que co-transporta dois prótons juntos à auxina aniônica. Este transporte secundário ativo da auxina permite um maior acúmulo da mesma do que a simples difusão, pois é movido através da membrana pela força-motriz de prótons (TAIZ et al., 2004).

O meio JADS se comportou de maneira significativamente diferente nos três subcultivos avaliados. Primeiramente, atingiu nível altíssimo de multiplicação, seguindo de uma queda significativa e então voltou a responder aos estímulos dados à multiplicação dos brotos. Borges et al. (2011), em estudos com *Eucalyptus globulus*, observaram que os subcultivos contínuos na mesma composição do meio de cultura podem ter sido uma das causas do declínio na taxa de multiplicação devido à falta de ajuste dos meios em alguns clones. Relatam ainda que, a alternância dos subcultivos em meio de cultura com diferentes tipos ou doses de reguladores ou mesmo, a alternância entre meios com diferentes composições salinas poderiam melhorar ou manter as taxas de multiplicação dos clones, sendo este ponto merecedor de maiores estudos para ajustes na micropropagação de híbridos. O aumento após a queda, provavelmente resultou do retorno à assimilação dos nutrientes disponíveis no meio.

De maneira geral, a cada subcultivo as microcepas passam por uma fase de crescimento e multiplicação exponencial, em que se observa o aumento da massa vegetal, que segundo Handro e Floh (1990) estes processos, associados à diferenciação, são mediados por divisões e especializações das células que resultam em uma estrutura organizada. Na etapa final, as microcepas iniciam um processo de senescência, em função de diversos estresses como deficiência nutricional, falta de água no meio nutritivo, acúmulo de etileno e outros gases no frasco, além de barreiras físicas ao crescimento. Para cada genótipo em micropropagação, deve-se observar seu crescimento para se determinar o período mais adequado de cada subcultivo, a fim de se obter a resposta desejada com a propagação *in vitro* (XAVIER et al., 2009). Variações entre genótipos são frequentemente relatadas em relação às taxas de multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus* (CORREIA, 1995; BENNETT et al., 1994; SOBROSA; CORDER, 2003; BRONDANI et al., 2009), demonstrando ser esse fator o que exerce grande influência na resposta *in vitro*.

Sendo assim, é necessária a análise quanto ao comportamento dos três diferentes clones aos diferentes meios de cultura na fase de multiplicação das microcepas. Pode-se observar na Figura 15, que o meio MS, apesar de ter o melhor índice de multiplicação nos subcultivos, não foi o mais adequado para os clones, apresentando os menores índices. Este resultado pode ser explicado com as observações de Correia et al. (1995), em que os autores relatam que as taxas de multiplicação estão diretamente relacionadas ao potencial genético do material vegetal, às condições ambientais e microbianas para seu crescimento e ao valor nutricional do meio de cultura, bem como à sua capacidade de difusão.

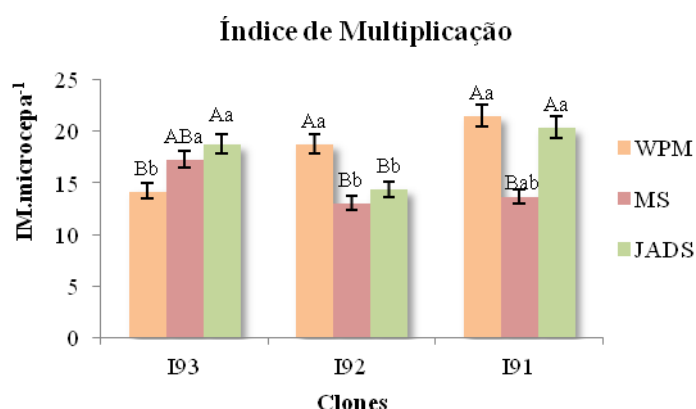


Figura 15 - Médias do índice de multiplicação pelo teste de Tukey em relação aos clones de *Eucalyptus citriodora* cultivado em diferentes meios de cultura

Para o clone I91 o meio de cultura WPM mostrou-se melhor, mesmo não existindo diferença significativa entre ele e o meio de cultura JADS, ao passo que o meio de cultura MS não se mostrou adequado para a indução à multiplicação deste clone. Em relação ao clone I92, diferiu significativamente em WPM e o I93 do JADS, sendo que o meio MS para o clone I93, não diferiu significativamente de nenhum dos meios (WPM e JADS). Este resultado pode ser explicado se ponderar a lei do mínimo de Liebig, que afirma que as plantas utilizam os nutrientes numa proporção definida, prevendo uma estreita relação entre a adição limitante de um nutriente no crescimento e desenvolvimento das plantas (MALAVOLTA, 1992). Sendo assim, considera-se que o meio de cultura WPM, por ser o meio com concentração salina mais baixa em relação aos outros meios (MS e JADS), supriu adequadamente as necessidades dos clones I91 e I92, enquanto o clone I93, por aparentemente ser o mais sensível em nutrição, exigiu os maiores valores nutricionais, que compõem o meio de cultura JADS. Normalmente se observa variabilidade clonal no comportamento *in vitro*, com genótipos que se adaptam facilmente a estas condições, respondendo bem a vários meios de cultura, e clones que necessitam de ajustes específicos no meio de cultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Na regeneração *in vitro*, o potencial adaptativo das plantas, se reflete na capacidade de iniciar a divisão celular com resposta metabolicamente diferente a cada estímulo (SLATER; SCOTT; FOWLER, 2003). Estas considerações corroboram com Brondani et al. (2009) que observaram recalitrância na fase de multiplicação *in vitro* de um clone de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunii*, evidenciando dessa forma, a necessidade de ajustes nos protocolos de multiplicação *in vitro* para determinados genótipos que não se adaptaram às condições pré-estabelecidas de cultivo.

O comportamento dos genótipos avaliados (I91, I92 e I93), pode ser confirmado, na figura 16.

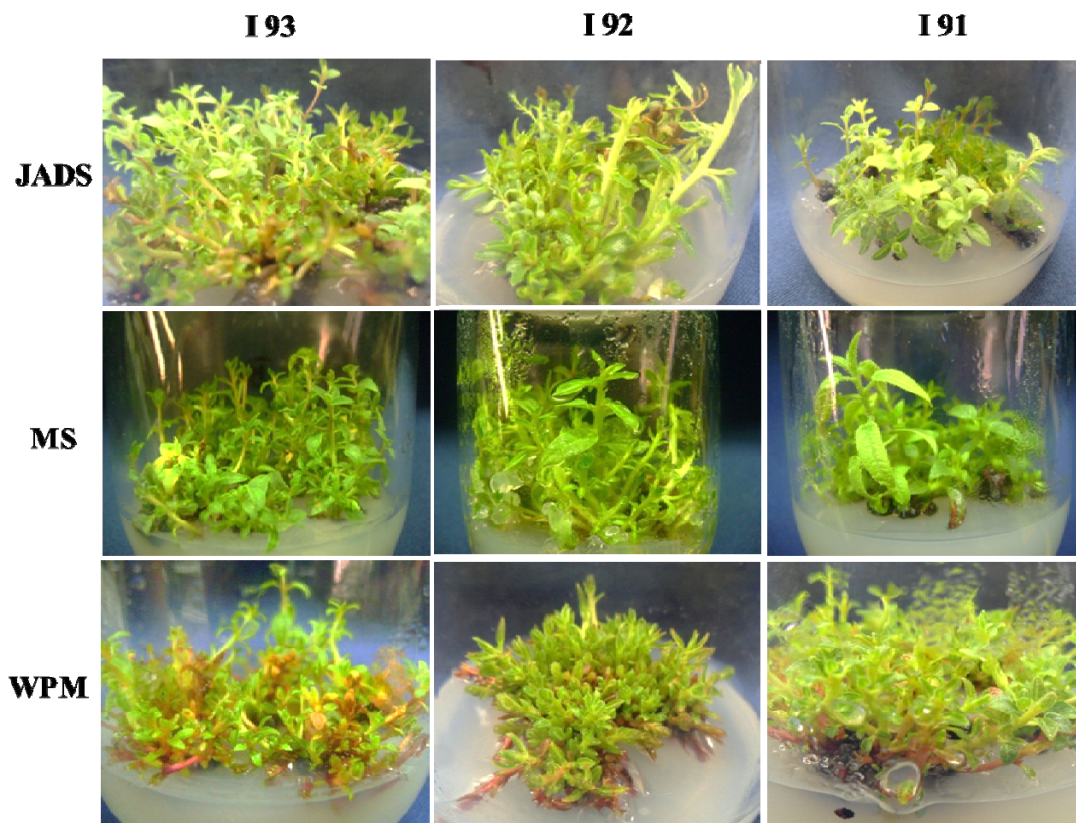


Figura 16 - Microcepas dos três clones avaliados de *Eucalyptus citriodora* cultivadas em diferentes meios de cultura. Observe as diferentes respostas dos clones I93, I92 e I91 aos meios

Nota-se que no meio JADS, todos os clones responderam positivamente tanto no que se refere ao índice de multiplicação quanto ao vigor e desenvolvimento das microcepas, sendo o clone I93, destaque perante os outros. Este resultado remete à “Lei do ótimo” de Liebscher, que prevê um aumento na eficiência de utilização dos nutrientes quando as concentrações de outros nutrientes estão mais próximas ao ideal. Esta lei foi originalmente descrita como uma modificação da Lei do mínimo de Liebig. Liebscher dizia que a interação entre os nutrientes aumenta quando níveis da disponibilidade dos mesmos aumentam até certa quantidade (LIEBSCHER, 1992). Sendo assim, a atividade de um nutriente limitante é mais pronunciada quando outros nutrientes se aproximam de valores ótimos. Já, no meio de cultura MS embora as microcepas tenham respondido à multiplicação, observou-se que essas eram constituídas por brotos alongados, com tamanhos variados, com aparente comportamento de metabolismo acelerado, provavelmente pelo excesso de nitrogênio disponível. O meio WPM, com exceção do clone I93, se mostra como o meio com maior vigor e condições de brotos saudáveis em relação aos demais.

Para melhor entender como os meios de cultura e os nutrientes disponíveis em cada um influenciaram o comportamento *in vitro* dos clones I93, I92 e I91, as microcepas foram submetidas à análise nutricional (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores reais do acúmulo dos macronutrientes e micronutrientes, pelos clones avaliados de *Eucalyptus citriodora* em relação aos meios de cultura utilizados

MEIO	CLONE	REP	g. L ⁻¹					mg. L ⁻¹					
			N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
WPM	I93	1	26,3	2,2	29,2	5,2	1,8	5,2	47,0	8,6	445,9	109,0	143,0
WPM	I93	2	25,3	2,0	30,4	5,5	1,7	7,0	50,0	7,7	473,3	110,0	143,0
WPM	I92	1	22,3	2,1	37,2	6,4	1,2	10,6	51,0	7,3	420,0	104,0	135,0
WPM	I92	2	20,5	1,6	34,0	5,8	1,0	10,1	44,0	7,3	402,2	95,0	125,0
WPM	I91	1	29,9	2,5	36,0	5,8	1,7	8,5	53,0	6,2	507,8	104,0	138,0
WPM	I91	2	30,0	2,5	34,8	5,5	1,8	8,4	48,0	7,1	501,5	105,0	135,0
MS	I93	1	55,1	2,0	29,6	3,7	1,5	2,6	44,0	0,5	405,0	106,0	145,0
MS	I93	2	47,8	1,7	31,6	5,1	1,7	2,8	44,0	0,5	372,7	147,0	144,0
MS	I92	1	48,9	1,6	30,8	5,2	1,8	3,1	49,0	3,9	305,0	121,0	140,0
MS	I92	2	46,0	1,1	33,2	5,4	1,8	3,3	42,0	1,0	315,5	137,0	132,0
MS	I91	1	58,5	2,1	24,4	3,5	1,5	2,9	44,0	2,1	463,1	111,0	150,0
MS	I91	2	53,4	2,4	25,2	3,5	1,5	3,3	46,0	1,2	418,3	109,0	141,0
JADS	I93	1	28,5	3,3	24,4	11,7	4,5	4,1	28,0	19,4	405,1	177,0	54,0
JADS	I93	2	27,4	3,6	24,0	12,1	4,5	4,2	28,0	19,8	449,8	180,0	51,0
JADS	I92	1	27,8	3,3	28,8	15,1	4,3	5,6	30,0	18,5	353,8	159,0	55,0
JADS	I92	2	26,3	2,6	29,6	15,2	4,3	5,0	35,0	18,0	343,5	154,0	49,0
JADS	I91	1	27,1	3,0	26,8	12,1	4,4	3,9	35,0	19,2	358,8	165,0	55,0
JADS	I91	2	27,3	3,6	26,4	11,5	4,5	4,1	32,0	18,5	417,0	172,0	51,0

As colunas coloridas de cor de rosa representam os meios de cultura que obtiveram respostas significativas em maior acúmulo do nutriente, as coloridas em azul, representam os menos significativos. Os valores destacados em vermelho representam os clones mais significativos no acúmulo do nutriente, enquanto os destacados em azul representam os menos significativos pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Os resultados obtidos nesta análise corroboram com os resultados dos índices de multiplicação dos clones nos diferentes meios de cultura. Segundo Malavolta, Vitti e Oliveira (1997), a velocidade de absorção de um nutriente mineral pode sofrer aumento, diminuição ou não ser influenciada pela presença de outro elemento. Desta forma, os efeitos interiônicos podem ser definidos como antagonismo, quando a presença de um elemento diminui a absorção de outro, cuja toxidez é evitada; inibição, quando ocorre diminuição da absorção de um elemento sendo esta provocada pela presença de outro íon e sinergismo, quando a presença de um nutriente mineral aumenta a absorção de outro mineral. Existem outros

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

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

A avaliação dos macronutrientes (Figura 17), começando pelo acúmulo de nitrogênio, que como apresentado anteriormente, foi significativo no meio de cultura MS, comprovando sua maior concentração perante os outros meios utilizados, demonstra que embora não haja diferenças significativas, pode-se notar que o clone I91 tem uma tendência em acumular maiores quantidades de nitrogênio, independente do meio, e o clone I92 apresenta característica inversa, acumulando menores quantidades do nutriente, mostrando assim suas exigências nutricionais, sendo o I91 mais exigente que o clone I92 corroborando com os resultados obtidos para estes clones no que se refere ao índice de multiplicação.

Ainda através da análise da tabela 3, pode-se observar que o acúmulo de fósforo em microplantas cultivadas em meio JADS se destaca significativamente aos outros meios que não diferem entre si estatisticamente. Esse resultado é esperado pela mesma razão que o nitrogênio no meio MS, já que o meio JADS possui em sua constituição maiores teores de fósforo, com 480 mg.L^{-1} de KH_2PO_4 , enquanto o WPM e o MS possuem 170 mg.L^{-1} , do mesmo composto. O clone I91 apresentou o maior acúmulo deste nutriente, demonstrando desta forma ser o clone mais exigente em fósforo dentre os clones avaliados. Em todos os meios de cultura utilizados, este clone superou os níveis de acúmulo de fósforo.

Nota-se que, em relação ao elemento potássio, houve diferença significativa somente no meio JADS, pois os meios WPM e MS não diferiram entre si. Isso provavelmente se explica, pela relação do íon Ca^{2+} e o íon K^+ , onde o Ca^{2+} em altas concentrações tem efeito de inibição competitiva sobre o íon K^+ (CORREIA, 2006) e no meio JADS a concentração de cálcio é superior a concentração existente nos outros meios (MS e WPM). Apesar das concentrações de potássio serem diferentes em cada meio, esta não foi importante no acúmulo

para os clones, onde observa-se que o clone mais exigente em potássio é o I92, independente do meio de cultura utilizado.

O teor de cálcio apresentou valor significativo à interação dos parâmetros meio de cultura e clone. O meio JADS foi o que apresentou maior valor dentre os outros meios, isso se justifica quando se analisa sua composição. A concentração de Ca fornecida é de 200,44 mg.L⁻¹ quase o dobro quando comparada ao WPM (119,95 mg L⁻¹) e ao MS (120,54 mg L⁻¹). Mesmo sendo a única fonte de cálcio presente no meio de cultura JADS, esta foi suficiente para suprir as necessidades dos clones, apresentando os valores mais significativos de absorção nos três clones avaliados. No meio de cultura WPM, os clones não diferiram significativamente. Em MS observou-se que o clone I92 apresentou o resultado mais significativo em relação ao clone I91 enquanto o clone I93 não diferiu significativamente dos demais clones avaliados. Observa-se que os meios WPM e MS, não diferem significativamente, no entanto, quando se fornece maiores quantidades de cálcio (JADS) a diferença no acúmulo em relação aos clones é evidenciada. Desta forma, fica evidente a maior necessidade de cálcio do clone I92, que difere dos demais acumulando maiores valores do nutriente. O Ca²⁺ tem ação de sinergismo sobre o íon K⁺, o que possivelmente explica os maiores índices de acúmulo de Ca e K no clone I92 (CORREIA, 2006).

Na constituição dos meios de cultura WPM e MS a concentração de magnésio é de 36,49 mg L⁻¹, sendo no entanto menor que a encontrada no meio JADS que é de 72,93 mg L⁻¹. Isso se reflete no acúmulo deste nutriente para os clones avaliados. Todos os clones tiveram maiores acúmulos no meio JADS, e os meios WPM e MS não diferiram estatisticamente, como esperado por possuírem a mesma concentração em sua constituição. Avaliando a significância existente entre os clones, percebe-se que o I92 difere apenas na absorção de magnésio no meio de cultura WPM, provavelmente porque este clone é o mais exigente em potássio, pois o íon K⁺ tem efeito de inibição competitiva com relação aos íons Mg²⁺.

Quanto ao acúmulo de enxofre, o meio WPM difere significativamente dos demais meios utilizados. Isso provavelmente se explica, por ser o único meio que possui duas fontes distintas deste nutriente, o K₂SO₄ e o MgSO₄.7H₂O. Os meios JADS e MS não diferiram significativamente. Quanto aos clones, no meio WPM, o clone I92 se mostra o mais exigente em enxofre e o I93 o menos exigente, porém não diferem nos meios JADS e MS.

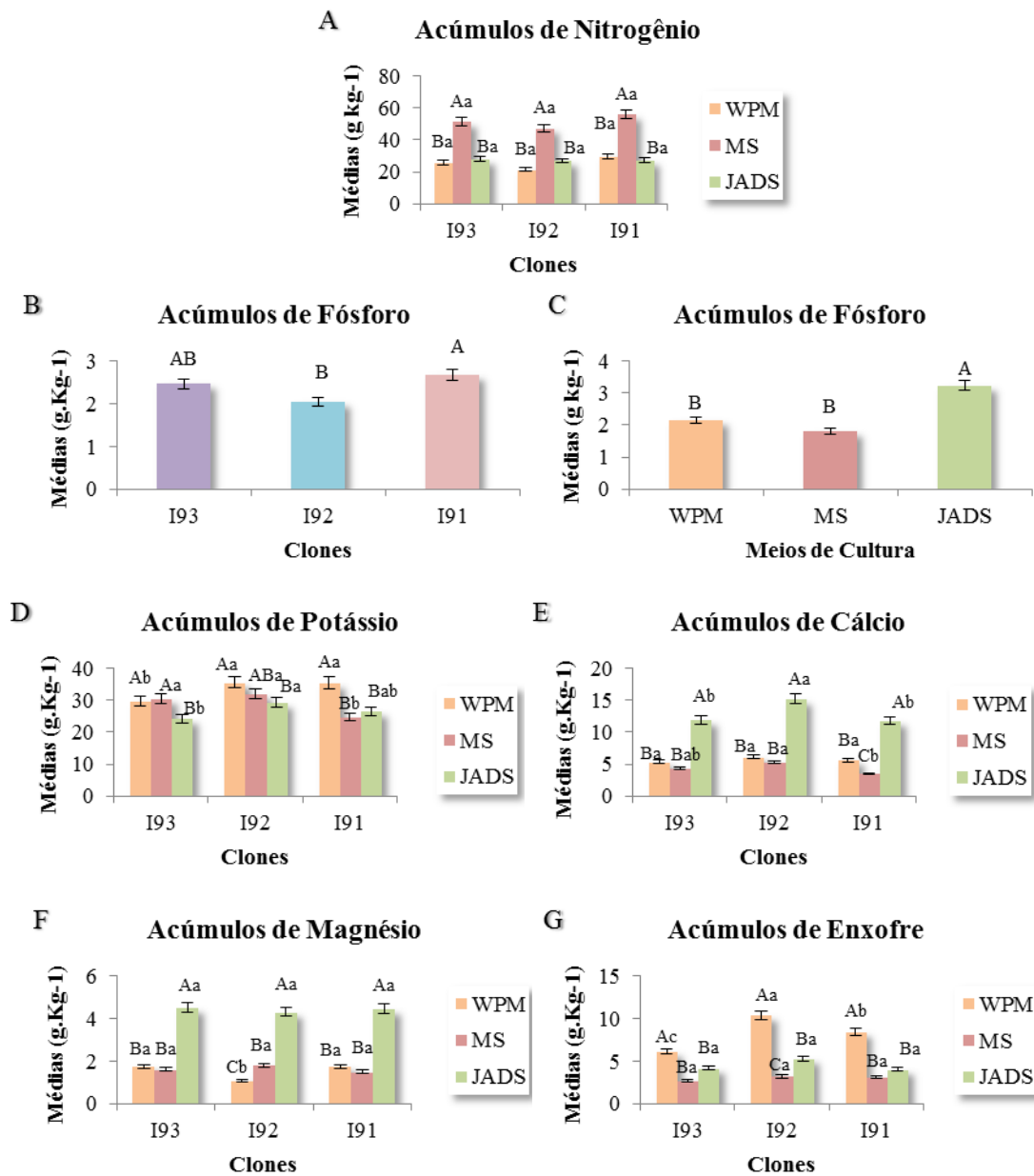


Figura 17 - Gráfico de médias do acúmulo de nutrientes em relação aos clones de *Eucalyptus citriodora*.: A: Nitrogênio, em relação ao meio de cultura e aos clones; B: Fósforo, em relação aos clones; C: Fósforo em relação ao meio de cultura; D: Potássio, em relação ao meio e aos clones; E: Cálcio, em relação ao meio de cultura e aos clones; F: Magnésio, em relação ao meio e aos clones; G: Enxofre, em relação ao meio de cultura e aos clones, pelo teste de Tukey

É notória a importância do estímulo dos micronutrientes, havendo uma clara necessidade de explorar seu papel morfogênico com mais detalhe. As funções dos microelementos 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). Ramage e Willians (2002) afirmam que o papel dos micronutrientes no controle da regeneração *in vitro* tem recebido pouca atenção, apesar de notório que alguns aumentam a regeneração significativamente. Avaliando as respostas dos acúmulos dos micronutrientes dos clones de *E. citriodora* nos três meios utilizados (Figura 18), pode-se observar que o Boro, não foi significativo em relação aos clones, somente quanto aos meios. Isso mostra que a necessidade dos clones ao elemento é a mesma, não diferindo pelo material genético. Quanto aos meios de cultura, a resposta foi a esperada, pois o meio JADS diferiu significativamente dos demais por possuir menores teores de acúmulo do nutriente, fato este que se explica por possuir em sua constituição menor quantidade de H_3BO_3 ($3,1 \text{ mg.L}^{-1}$) que os meios WPM e MS ($6,2 \text{ mg.L}^{-1}$).

O acúmulo de cobre no clone I93 foi inversamente proporcional ao do clone I91. Observa-se que o clone I93 é o mais exigente em cobre e o I91 o menos, enquanto o I92 não difere significativamente de nenhum dos clones. As respostas obtidas quanto ao meio de cultura já eram esperadas, pois a constituição dos meios disponibiliza quantidades proporcionais ao resultado, em que o meio JADS difere significativamente como o que mais disponibilizou cobre, tendo em sua constituição, $1,25 \text{ mg.L}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, seguido de $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ do meio WPM e $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$ do meio MS.

O ferro diferiu significativamente tanto ao meio de cultura utilizado, quanto aos clones avaliados, porém não há interação dos parâmetros, assim como o cobre e o zinco. A resposta aos meios de cultura contradiz a constituição destes, pois o meio WPM apresentou o maior teor de acúmulo de ferro em relação aos demais meios, JADS e MS, porém o meio JADS é o que possui maior quantidade de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $55,6 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto o WPM e o MS possuem $27,8 \text{ mg.L}^{-1}$. Uma possível explicação é devido à interação com os demais nutrientes, deixando o ferro no meio WPM mais facilmente disponível que no JADS. De acordo com Correia (2006) as concentrações de cálcio influenciam significativamente as reduções dos teores de ferro e a elevação dos teores de cloro. Malavolta, Vitti e Oliveira (1997) afirmam que a absorção de ferro pode ser influenciada por outros cátions como potássio, cálcio e magnésio, bem como cobre, zinco e manganês, por inibição competitiva. A redução do teor de ferro em cálcio pode estar relacionada também ao pH do meio de cultura que permaneceu mais elevado durante o período de cultivo (CORREIA, 2006), o que explicaria a resposta inferior de acúmulos de ferro em JADS. Segundo Bear (1964), a elevação de uma unidade no pH faz com que a concentração do ferro diminua 1000 vezes.

A disponibilidade do manganês nos três meios de cultura é a mesma, tanto do elemento, em que os meios disponibilizam $5,493 \text{ mg.L}^{-1}$, quanto da solução nutritiva, $16,9$

mg.L⁻¹ de MnSO₄.H₂O. Porém, o meio JADS apresentou teor de absorção significativamente maior em relação aos demais meios, pois provavelmente a inibição causada sobre o ferro pelos íons acima citados, inclusive o manganês, pode ter ajudado no acúmulo deste elemento. Já os clones avaliados não diferiram estatisticamente ao acúmulo de manganês.

O acúmulo de zinco pelo clone I93 é inversamente proporcional ao do clone I92. É possível observar que o clone I93 é o mais exigente em cobre e o I92 o menos, enquanto o I91 não difere significativamente de nenhum dos clones. As respostas obtidas quanto ao meio de cultura já eram esperadas, pois a constituição dos meios disponibiliza quantidades proporcionais ao resultado, em que o meio JADS difere significativamente como o que menos disponibilizou zinco, tendo em sua constituição, 4,32 mg.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O, seguido de 8,6 mg.L⁻¹ do meio WPM e MS.

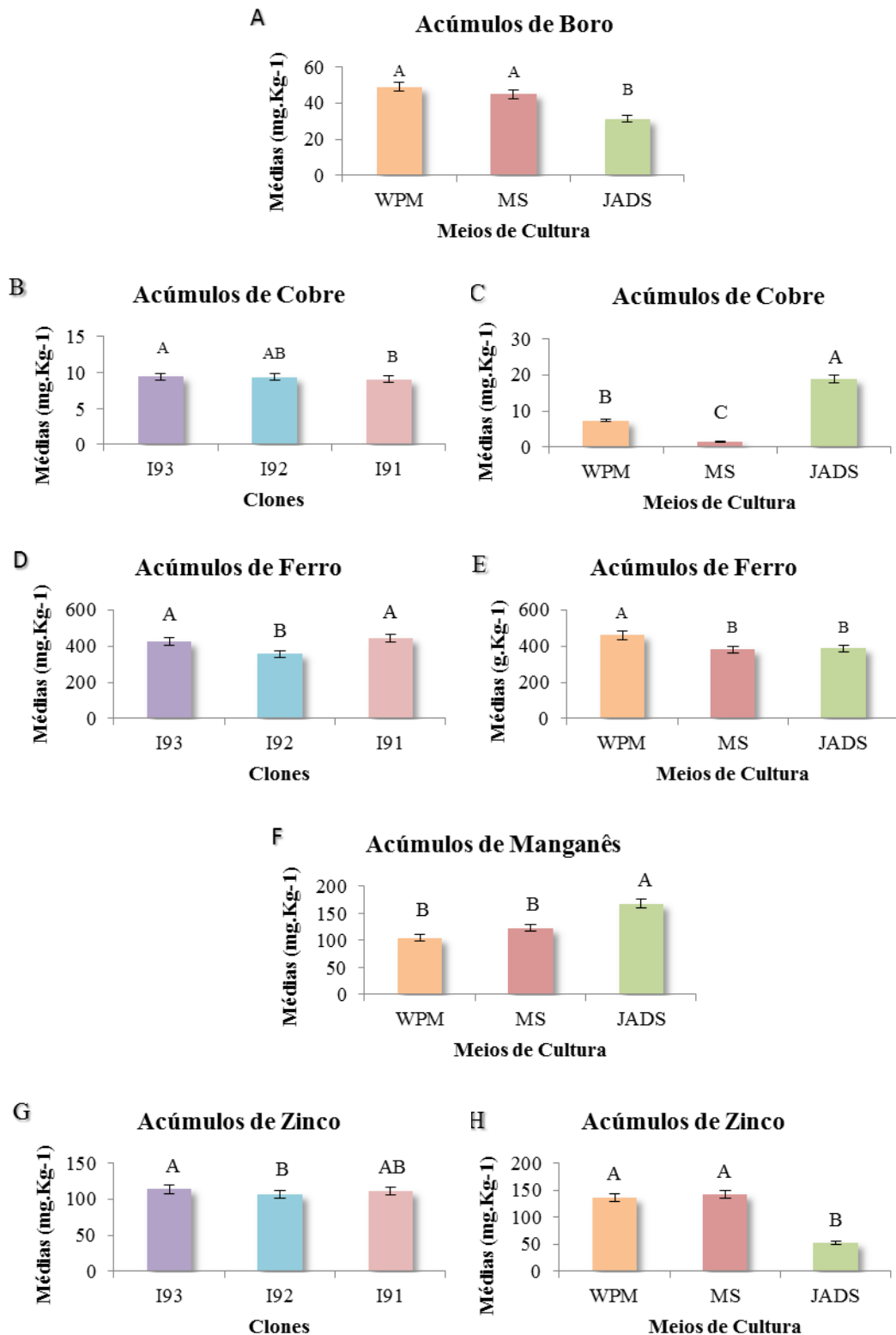


Figura 18 - Gráfico de médias do acúmulo de nutrientes em relação aos clones de *Eucalyptus citriodora*.: A: Boro, em relação ao meio de cultura e aos clones; B: Cobre, em relação aos clones; C: Cobre, em relação ao meio de cultura; D: Ferro, em relação aos clones; E: Ferro, em relação ao meio de cultura; F: Manganês, em relação ao meio de cultura; G: Zinco, em relação aos clones; H: Zinco, em relação ao meio de cultura, pelo teste de Tukey

O clone I93, se mostrou o mais exigente em cobre e zinco, pois acumulou teores significativamente maiores dos elementos em relação aos demais clones avaliados, porém foi o clone que menos acumulou potássio e enxofre. O clone I92, se mostrou mais exigente em potássio, cálcio e enxofre, e menos em magnésio, ferro e zinco. O clone I91, foi o mais exigente em fósforo, com uma aparente tendência a maior exigência em nitrogênio e menor exigência em potássio, cálcio e cobre. A partir da comparação entre as exigências dos clones a determinados nutrientes, foi possível compreender melhor os resultados dos mesmos, quanto a médias para produção de matéria seca e número de brotos.

Como se pode observar na figura 19, nos meios WPM e JADS, houve uma correlação entre o número de brotos e o peso da matéria seca das microcepas, no entanto, o meio MS não apresentou tal correlação, provavelmente por apresentar brotações mais alongadas com folhas maiores, porém em números bem inferiores.

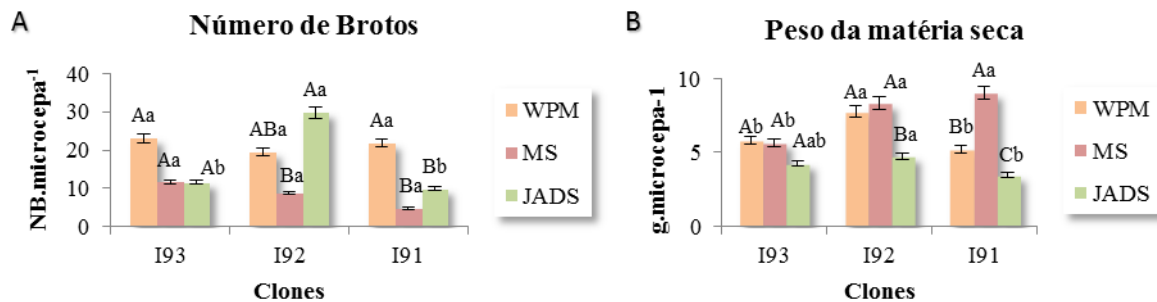


Figura 19 - Gráfico de médias dos clones de *Eucalyptus citriodora*: A: do número de brotos e B: do peso da matéria seca por microcepas, pelo teste de Tukey em relação aos clones

Os meios WPM e MS não obtiveram diferença significativa entre os clones quanto ao número de brotos, porém em relação ao peso da matéria seca, o clone I92 se destacou perante os demais em WPM. Em MS, os melhores resultados em produção de matéria foram os clones I91 e I92, que não diferiram significativamente entre si, sendo o pior resultado, o do clone I93, que apresentou o menor peso de matéria seca. Já o meio JADS, obteve diferença significativa com o clone I92, quanto ao número de brotos e ao peso da matéria seca, porém ao segundo parâmetro o clone I93 não diferiu significativamente de nenhum dos clones avaliados e o clone I91 apresentou o menor valor em peso da matéria seca.

A diferenciação de células, tecidos e órgãos, bem como o crescimento do vegetal, são regulados por fatores ambientais, hormonais e genéticos, pois de acordo com as observações de Almeida et al. (2012), dependendo do estímulo recebido, as células alvo podem induzir diferentes respostas morfogênicas. Analisando os clones isoladamente, o I93 não apresentou

diferença significativa a nenhum dos parâmetros avaliados, o I92, quanto ao número de brotos, apresentou índices significativamente inferiores em MS, se comparado ao meio WPM e JADS, porém quanto ao peso da matéria seca, o JADS foi o meio que apresentou índices significativamente mais baixos. O clone I91, apresentou índice significativamente maior em WPM quanto ao número de brotos, mas o ganho de matéria relatou diferenças significativas entre todos os meios, seguindo a ordem de melhor índice em MS, WPM e JADS.

Como comentado anteriormente, se correlacionados os dados quanto à exigência dos clones I93, I92 e I91, com os dados de produção de matéria seca e número de brotos produzidos pelos mesmos, pode-se observar que o clone I93 apresentou baixos níveis de peso da matéria seca. Este fato corrobora com os baixos valores apresentados por esse clone em relação ao acúmulo de enxofre e potássio, nutrientes essenciais para a produção de matéria seca. Correia (2006) verificou que na maior concentração de enxofre foi alcançada maior média para produção de massa seca. O enxofre é constituinte de várias coenzimas, além de vitaminas essenciais ao metabolismo. Muitos dos sintomas da deficiência de enxofre são similares aos da deficiência de nitrogênio, incluindo clorose, redução do crescimento e acúmulo de antocianinas. Tal similaridade não surpreende, pois ambos os nutrientes são constituintes de proteínas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O potássio atua na ativação de grande número de enzimas e está envolvido no controle estomático, regulação do potencial osmótico, transporte de carboidratos e na ativação de muitas enzimas envolvidas na respiração e na fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2009), assim como na participação do transporte através da membrana e na neutralização de ânions (MALAVOLTA, 2006; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

O clone I92 se comportou de maneira inversa ao I93, acumulando de forma significativa os maiores valores de potássio, enxofre e cálcio. O cálcio é constituinte estrutural da lamela média das células (AMARAL, 2003; TREVIZAM et al., 2005). Seus íons são considerados um modulador de muitas reações químicas e bioquímicas que ocorrem no desenvolvimento e crescimento das plantas (MARSCHNER, 1986). Está envolvido no funcionamento das membranas e na absorção iônica (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997) e quando fornecido em altas concentrações, pode atingir mais de 10% do peso da matéria seca, sem que ocorram sintomas de toxicidade ou de inibição do crescimento da planta (AMARAL, 2003).

O clone I91 apresentou índices favoráveis à produção de matéria seca apenas em meio MS, isso provavelmente se explica pela sua tendência em acumular mais nitrogênio e por ser o clone que mais acumulou fósforo. Higashi e Gonçalves (2006), estudando o efeito da

omissão seletiva de nitrogênio no meio de cultura JADS em brotações de *Eucalyptus grandis* observaram, aos 21 dias de cultivo, uma redução de 82,02% da massa seca e de 47% do teor de nitrogênio, em relação aos controles. Entre os macronutrientes, o nitrogênio foi o elemento que apresentou maior efeito na redução da biomassa, seguido das omissões seletivas dos micronutrientes ferro (45,98%) e zinco (46,76%). Assim como o nitrogênio, o fósforo é essencial para o crescimento das plantas e está envolvido na maioria dos processos metabólicos. É um componente integral de compostos como ésteres de carboidratos, fosfolipídios, coenzimas e ácidos nucleicos (RAGHOTHAMA; KARTHIKEYAN, 2005). Em estudos com *Pfaffia glomerata*, Russowski e Nicolosso (2003) observaram que aos 40 dias de cultivo, o crescimento em altura das brotações, o número de segmentos nodais por explante, o índice de área foliar, o número de folhas, a massa seca da parte aérea e das raízes e a massa seca total do explante foram maiores na concentração equivalente a 80% de fósforo em relação à concentração padrão, próxima a $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$. Em relação aos outros meios, o clone I91 não respondeu adequadamente, possivelmente por acumular baixos níveis de potássio, cálcio e cobre. Assim como o ferro, o cobre está associado com enzimas envolvidas em reações redox, como a enzima plastocianina, a qual está envolvida no transporte de elétrons durante as reações dependentes de luz da fotossíntese (HAEHNEL, 1984). Parâmetros qualitativos foram necessários para melhor avaliar as respostas dos clones aos meios de cultura (tabela 4). O tamanho das folhas, multiplicação hetero ou homogênea, alongamento das microestacas, assim como o vigor, são essenciais para confirmar as respostas aos aspectos fisiológicos avaliados (nutrição, peso da matéria seca e número de brotos).

Tabela 4 - Parâmetros qualitativos do comportamento das microcepas de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura e o clone

Meios / Clones	Crescimento das brotações	Tamanho das Folhas	Vigor das microcepas
JADS			
I93	Multiplicação homogênea e Estacas alongadas	Médias	Ótimo
I92	Multiplicação homogênea e Crescimento médio das estacas	Pequenas	Bom
I91	Multiplicação homogênea e Crescimento médio das estacas	Pequenas	Bom
MS			
I93	Multiplicação heterogênea e Estacas muito alongadas	Grandes	Bom
I92	Multiplicação heterogênea e Estacas muito alongadas	Médias	Regular
I91	Multiplicação heterogênea e Estacas muito alongadas	Grandes	Bom
WPM			
I93	Multiplicação homogênea e Estacas alongadas	Pequenas	Bom
I92	Multiplicação homogênea e Estacas alongadas	Médias	Ótimo
I91	Multiplicação homogênea e Estacas alongadas	Médias	Ótimo

O comportamento heterogêneo da multiplicação, o tamanho das folhas e o fato das microestacas terem alongado demasiadamente em meio de cultura MS, quando comparados aos outros meios de cultivo avaliados, corroboram com o fato deste ser o meio com teores significativamente maiores em nitrogênio, acarretando em um metabolismo acelerado e desorganizado das microcepas. Maiores concentrações de NO_3^- e NH_4^+ , como os encontrados no meio MS, influenciam o crescimento de brotações, o incremento em massa seca e o conteúdo de carboidratos, proteínas e aminoácidos (GABRIEL, 2009). O meio JADS, a partir dos parâmetros qualitativos, condiz com os dados estatísticos, como o meio intermediário para o desenvolvimento de microcepas de *E. citriodora*, enquanto o meio WPM continua se destacando no comportamento geral de todos os clones avaliados. O tamanho das folhas nos três meios utilizados condiz com a produção de matéria seca que segue a hierarquia do meio MS, WPM e JADS. O comportamento visual e consequente comprovação dos dados qualitativos podem ser observados na figura 20.

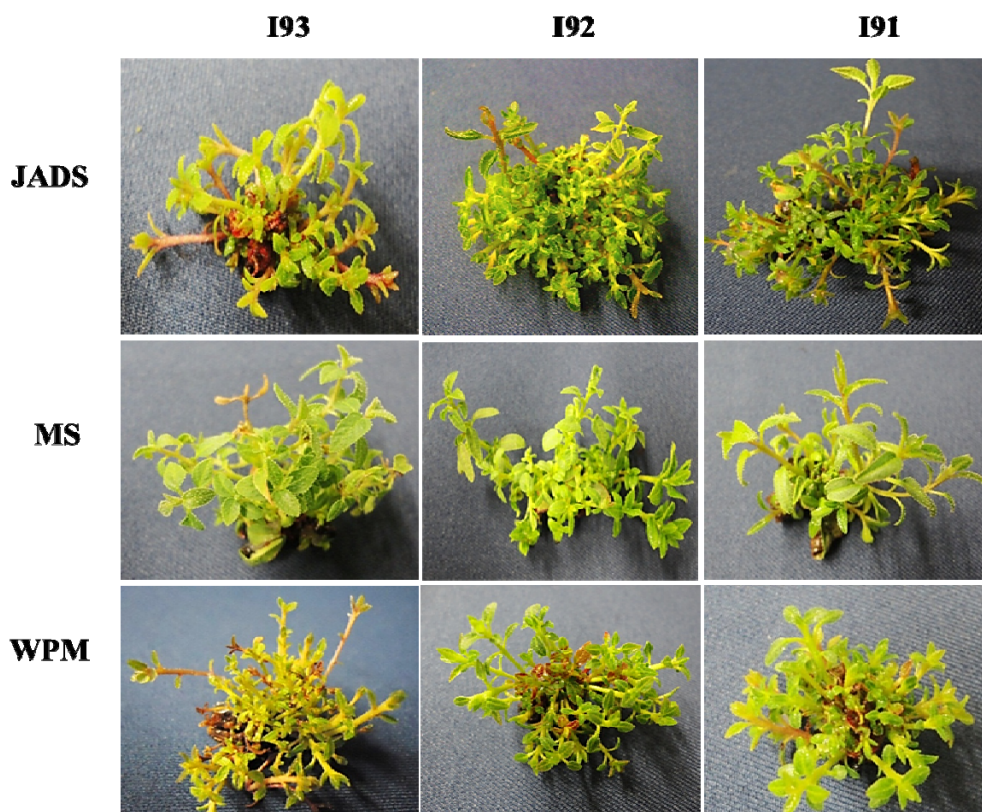


Figura 20 - Microcepas de *Eucalyptus citriodora* cultivadas em diferentes meios de cultura. Observe as diferentes respostas dos clones I93, I92 e I91 aos meios avaliados, no último subcultivo em meio para multiplicação das microcepas

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

5 CONCLUSÃO

As respostas aos diferentes meios de cultura foram visivelmente genótipo-dependentes, considerando a necessidade de melhor adaptação às condições *in vitro* ajustando as concentrações salinas de acordo com o material genético utilizado.

A disponibilidade dos nutrientes às plantas está diretamente relacionada a quantidade de cátions e ânions disponíveis no meio de cultura, levando em consideração as relações existentes entre cada íon. Estas relações interferem na capacidade das plantas em assimilar os nutrientes, sendo essencial a tentativa de alcançar o equilíbrio iônico.

A produção de matéria seca, essencial ao desenvolvimento das plantas, está diretamente relacionada às exigências nutricionais do material genético, a disponibilidade de nutrientes e à relação auxina/citocinina.

As brotações produzidas pelas microcepas são respostas aos fatores epigenéticos. O estímulo dos nutrientes, pela sua forma iônica correspondente, correlacionados com as taxas hormonais disponíveis e as condições de luz e temperatura controladas, a que o material genético é exposto, direcionam o desenvolvimento das microcepas, aumentando o vigor, o tamanho das folhas, o número e homogeneidade das brotações.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C.; SILVEIRA, S.F.; SANFUENTES, E.A. Current status and control strategies of disease associated to clonal propagation of Eucalyptus in Brazil. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTUS, 1997, Colombo. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, CNPF, 1997. v. 4, p. 106-111.
- ALMEIDA, C.V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 467-470, 2005.
- ALMEIDA, D. **Espécies de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e tipifi cação dos méis por elas produzidos em área de cerrado do município de Pirassununga, estado de São Paulo**. 2002. 103 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- ALMEIDA, M. **Emprego da cultura “in vitro” para a multiplicação vegetativa de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) Palmae**. 1994. 120 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.
- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C.V.; GRANER, E.M.; BRONDANI, G.E.; ABREU-TARAZI, M.F. Pre-procambial Cells are Niches for Pluripotent and Totipotent stem-like cells for Organogenesis and Somatic Embryogenesis. **Plant Cell Reports**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, v. 31, p. 1495-1515, 2012.
- ALMEIDA-ANACLETO, D. **Recursos alimentares, desenvolvimento das colônias e características físico-químicas, microbiológicas e polínicas de mel e cargas de pólen de meliponíneos, do município de Piracicaba, Estado de São Paulo**. 2007. 133 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- ALOUFA, M.A.I. Enraizamento *in vitro* de plantas lenhosas: dificuldades e soluções. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. p. 3-5.
- AMARAL, A.F.C. **Comportamento *in vitro* de explantes de matrizes de cenoura (*Daucus carota* L.) tratadas com variáveis níveis de potássio**. 2003. 103 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- AMMIRATO, P.G.V. Embryogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.G.V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture**. New York: MacMilan, v. 1, p. 123, 1993.
- ANDRADE, A.M.; GOMES, S.S. Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, RJ, v. 7, n. 1, p. 181-189, 2000.

ANDRADE, E.N. de. **O eucalipto**. Jundiaí: Cia. Paulista de Estradas de Ferro, 1961. 667 p.

ANDRADE, E.N. de; VECCHI, O. **Os Eucalyptus**: sua cultura e exploração. São Paulo: Typographia Brazil de Rothschild, 1918. 225 p.

ANDRADE, H.B. **Avaliação de espécies e procedências de Eucalyptus L'Héritier (Myrtaceae) nas regiões Norte e Noroeste do Estado de Minas Gerais**. 1991. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Melhoramento de Planta) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.

ANSARI, T.M.; IKRAM, N.; NAJAM-UL-HAQ, M.; FAYYAZ, I.; FAYYAZ, Q.; GHAFOR, I.; KHALID, N. Essential trace metal (zinc, manganese, copper and iron) levels in plants of medicinal importance. **International Journal of Biological Sciences**, Bethesda, Maryland, EUA, v. 4, p. 95-99, 2004.

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C.J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on nonlegumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, Netherlands v. 204, p. 57-67, 1998.

ARAÚJO, M.S. **Avaliação de espécies e procedências de eucalipto na região de Imbuzeiro PB**. 1993. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993.

ASHER, C.J.; EDWARDS, D.G. Modern solution culture techniques. In: LÄUCHLI, A.; BIELESKI, R. L. (Ed.). **Inorganic plant nutrition**. New York: Spriger-Verlag, 1983. p. 94-119.

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

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

ASSIS, T.F.; ROSA, O.P.; GONÇALVES, S.I. Propagação clonal de *Eucalyptus* por microestaquia. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7, 1992, Nova Prata. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1992. p. 824.

ASSIS, T.F.; BRUNE, A.; NASCIMENTO FILHO, M.B.; FONSECA, J.B. Teste de progênies de *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden. **Silvicultura**, São Paulo, SP, n. 28, p. 165-167, 1983.

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

BARROS, N.F. de; NEVES, J. C. L.; NOVAIS, R. F. Recomendações de fertilizantes minerais em plantios de eucalipto. In: GONÇALVES, J.L.M.; BENEDETTI, V. **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2000. p. 269-286.

BARROS, N.F. de; NOVAIS, R.F. **Relações solo-eucalipto**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1990. 330 p.

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

BELLAMINE, J.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; GASPAR, T. Confirmation of the role of auxin and calcium in the late phases of adventitious root formation. **Plant Growth Regulation**. v. 26, p. 191-194, 1998.

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

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

BERLETH, T.; SACHS, T. Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 57–62, 2001.

BLAZICH, F.A. Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. (Ed.). **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides, 1988. p. 132-149.

BOLAND, D.J.; BROPHY, J.J.; HOUSE, A.P.N. **Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing**. Melbourne: Ikata Press, 1991. 252 p.

BOLAND, R.J. Jr.; TENKASI, R.V.; TE'ENI, D. Designing information technology to support distributed cognition. **Organization Science**, Hanover, MD USA, v. 5, n. 3, p. 456-477, 1994.

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.

BRACELPA. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/bra2/index.php?q=node/543>>. Acesso em: 15 Ago. 2012.

BRAGA, H.C. **Os óleos essenciais no Brasil: estudo econômico**. Rio de Janeiro: Departamento de Pesquisa Agropecuária, 1971. 156 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 24 Set. 2012.

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.; BACCARIN, F.J.B.; ONDAS, H.W.W.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Avaliação morfológica e produção de minijardim clonal de *Eucalyptus benthamii* em relação a Zn e B. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 32, n. 70, p. 35-48, 2012.

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

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

CARLAND, F.M.; BERG, B.L.; FITZGERALD, J.N.; JIANAMORNPHONGS, S.; NELSON, T.; KEITH, B. Genetic regulation of vascular tissue patterning in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Waterbury, VT. v. 11, p. 2123–2137, 1999.

CARY, A.; UTTAMCHANDANI, S.J.; SMETS, R.; VAN ONCKELEN, H.A.; HOWELL, S.H.H. *Arabidopsis* mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signals. **Planta**, Springer- Berlin Heidelberg, v. 213, p. 700-707, 2001.

CASANOVA, E.; MOYSSET, L.; TRILLAS, M.I.; Effect of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. **Biologia Plantarum**, Praha, Czech Republic v. 52, n. 1, p. 1-8, 2008.

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

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

CEDZICH, A.; STRANSKY, H.; SCHULZ, B.; FROMMER W.B. Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures. **Plant Physiology**, Waterbury, VT, v. 148, p. 1857-1867, 2008.

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. **Developmental Biology**, New York, v. 95, p. 288-293, 1983.

_____. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **Hort Science**, St. Joseph, Mich, v. 23, p. 515-519, 1988.

COENEN, C.; LOMAX, T.L. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. **Trends in Plant Science**, Cambridge, MA USA, v. 2, p. 351–356, 1997.

CORRÊA, L.R.; FETT-NETO, A.G. Effects of temperature on adventitious root development in microcuttings of *Eucalyptus saligna* Smith and *Eucalyptus globulus* Labill. **Jornal of Thermal Biology**. New York, v. 29, p. 315-324, 2004.

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

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

COZZO, D. **Eucalyptus e eucaliptotecnica**. Buenos Aires: El Ateneo, 1955. 393 p.

DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMANN, P.C. (Ed.). **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1990. p. 1-13.

DHALIWAL, H.S.; RAMESAR-FORTNER, N.S.; YEUNG, E.C.; THORPE, T.A. Competence, determination, and meristemoid plasticity in tobacco organogenesis *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 81, n. 6, p. 611-621, 2003.

EKLÖF, S.A.; STOT, C.; BLACKWELL J.; MORITZ T.; OLSSON O.; SANDBERG, G. Auxin–cytokinin interactions in wild-type and transgenic tobacco. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 38, p. 225–235, 1997.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. **Zoneamento ecológico para plantios florestais no estado de Santa Catarina**. Colombo, 1988. 113 p. (EMBRAPA. CNPF. Documentos, 21).

ESTANISLAU, A.A.; BARROS, F.A.S.; PEÑA, A.P.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 11, n. 2, p. 95¹00, 2001.

FERREIRA, M.; SANTOS, P.E.T. Melhoramento genético florestal dos *Eucalyptus* no Brasil: breve histórico e perspectivas. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, CNPF, 1997. v. 1, p. 14-34.

FOSKET, D.E. **Plant growth and development: a molecular approach**. San Diego: Academic Press, 1994. 580 p.

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

GAN, S.; AMASINO, R.M. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. **Science**, Washington, v. 270, p. 1986–1988, 1995.

GEORGE, E.F. **The derivation, preparation, and use of culture media.** In: **Plant propagation by tissue culture.** Edington: Exegetics, 1996. p. 344-419.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. Plant propagation by tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, Springer, v. 93, p. 353–355, 2008.

GILBERT, S.F. Diachronic biology meets evo-devo: C. H. Waddington's approach to evolutionary developmental biology. **American Journal of Zoology**, Oxford, v. 40, p. 729–737, 2000.

GOLFARI, L. **Esquema de zoneamento ecológico florestal para o Brasil.** Belo Horizonte: IBDF, 1974. 12 p.

GOLFARI, L.; CASER, R.L.; MOURA, V.P.G. Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil. Brasília, **PRODEPEF/ PNUD/ FAO/ IBDF/ BRA-45**, Série Técnica, v. 11, p. 66, 1978.

GONÇALVES, A.N. **Reversão a juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla* in vitro.** 1982. 112 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1982.

GONTIJO, T.C.A.; RAMOS, J.D.; MENDONÇA, V.; PIO R.; NETO, S.E.A.; CORREA, F.L.O. Enraizamento de diferentes tipos de estacas de aceroleira utilizando ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 290-292, 2003.

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

GURGEL FILHO, O. do A.; CORSINI, C.A.; VICTOR, M.A.M. O *Eucalyptus citriodora* Hook conduzido sob as características do "CCT Method", **Silvicultura**, São Paulo, SP, v.7, p.85-86, 1970.

HAEHNEL, W. Photosynthetic electron transport in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 35, p. 659-693, 1984.

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

HARDOIM, P.R.; OVERBEEK, L.S. van.; ELSAS, J.D. van. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, p. 463-471, 2008.

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

HICKS, G. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. **The Botanical Review**, New York, v. 46, p. 1-23, 1980.

HICKS, G.S. Shoot induction and organogenesis in vitro: a developmental perspective. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, New York, v. 30, p. 10-15, 1994.

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

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

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

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

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

JOSTEN, P.; KUTSCHERA, U. The micronutrient boron causes the development of adventitious roots in sunflower cuttings. **Annals of Botany Company**, Oxford, v. 84, p. 337-342, 1999.

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

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

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 1 p. 30-33, 1997.

_____. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, CBA, 1999. v. 2, p. 519-530, 1999.

KLEE, H.; ESTELLE, M. Molecular genetic approaches to plant hormone biology. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto CA, v. 42, p. 529-551, 1991.

KRONKA, F.J.N.; NALON, M.A.; MATSUKUMA, C.K. **Inventário florestal das áreas reflorestadas do Estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria de Estado de Meio Ambiente, Instituto Florestal, 2002. 184 p.

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

LERNER, I.M. **The genetic basis of selection**. New York: John Wiley and Sons, 298 p. 1958.

LETHAM, D.S.; PALNI, M.S. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 34, p. 163-197, 1983.

LEYSER, O. Regulation of shoot branching by auxin. **Trends in Plant Science**, Cambridge, MA USA, v. 8, p. 541-545, 2003.

LI, Y.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T.J. Altered morphology in transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins in specific tissues and organs. **Developmental Biology**, New York, v. 153, p. 386-395, 1992.

LIEBSCHER, A. Influence of heulandite (zeolite) as feed additive on growth and carcass quality in sibling test. **Nutrition Abstracts Reviews**, Bodenkultur, v. 62, p. 257, 1992.

LJUNG, K.; BHALERAO, R.P.; SANDBERG, G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 28, p. 465-474, 2001.

LJUNG, K.; HULL, A.K.; CELENZA, J.; YAMADA, M.; ESTELLE, M.; NORMANLY, J.; SANDBERG, G. Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. **Plant Cell**, Waterbury, VT, v. 17, p. 1090-1104, 2005.

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

LOFGREN, A. Notas sobre as plantas exóticas introduzidas no Estado de São Paulo. **Revista Agrícola**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 238, 1906.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. de; TORRES, M.A.V.; BACHER, L.B. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003. 368 p.

MALAVOLTA, E. Nutrição de plantas, fertilidade do solo e adubos e adubação no Brasil passado, presente e perspectivas. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 20., 1992, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBCS, 1992. p. 1-40.

_____. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 2006. 638 p.

- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319 p.
- MANTELL, S.H.; MATTHEUS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1994. 333 p.
- MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H. **Cultura de tecidos de plantas lenhosas**. Santa Maria: UFSM, CEPEF, FATEC, p.123, 1998.
- MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C. Comportamento de coleta de alimento por *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, Apidae) em cinco espécie de eucalyptus. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, Mayaguez, v. 11, n. 2, p. 75-79, 2003.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1986. 674 p.
- MCCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v. 2, p. 289-302.
- MEDEIROS, C.P.C. **Indução *in vitro* de respostas morfogênicas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.)**. 1999. 79 p. Dissertação (Ciências Agrônômicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.
- MEDFORD J.L.; HORGAN R.; EL-SAWI Z.; KLEE H.J.; Alteration of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. **Plant Cell**, Waterbury, VT, v. 1, p. 403–413, 1989.
- MEINS, F. Jr.; BINNS, A.N. Cell determination in plant development. **BioScience**, Uberlandia, MG, v. 29, n. 22, p. 1-25, 1979.
- MEINS, F. Jr.; LUTZ, J. Tissue-specific variation in the cytokinin habituation of cultured tobacco cells. **Differentiation**, Heidelberg, v. 15, p. 1-6, 1979.
- MOK, M.C. Cytokinins and plant development: an overview. In: MOK, D.W.S.; MOK, M. C. (Ed.). **Cytokinins: chemistry, activity and function**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 155-166.
- MOORE, T.C. **Biochemistry and physiology of plants hormones**. Berlin: Springer-Verlag, 1979. 197 p.
- MORA, A.L.; GARCIA, C.H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, p.112, 2000.
- MORAIS, E.; ZANOTTO, A.C.S.; FREITAS, M.L.M.; MORAES, M.L.T.; SEBBENN, A.M. Variação genética, interação genótipo solo e ganhos na seleção em teste de progênes de *Corymbia citriodora* Hook em Luiz Antonio, São Paulo. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 85, p. 11-18, 2010.

MÜLLER, B.; SHEEN, J. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. **Nature**, London, v. 453, p. 1094-1097, 2008.

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

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

NANDAGOPAL, S.; RANJITHA KUMARI, B.D. Effectiveness of auxin induced in vitro root culture in chicory. **Journal of Central European Agriculture**, Tamil Nadu, India. v. 8, n. 1, p. 73-79, 2007.

NORDSTRÖM, A.; TARKOWSKI, P.; TARKOWSKA, D.; NORBAEK, R.A.; STOT, C.; DOLEZAL, K.; SANDBERG, G. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 101, p. 8039–8044, 2004.

OLIVEIRA, J.A. **Efeito dos substratos artificiais no enraizamento e no desenvolvimento de maracujazeiro-azedo e doce por estaquia**. 2000. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2000.

ONO, E.O.; RODRIQUES, J.D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 83 p.

ONO, E.O.; BARROS, S.A. de.; RODRIGUES, J.D.; PINHO, S.Z. de. Enraizamento de estacas de *Platanus acerifolia*, tratadas com auxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 9, p. 1373-1380, 1994.

PAINEL florestal. Disponível em: <<http://painelflorestal.com.br/noticias/florestas-plantadas/11565/plantio-de-eucalipto-avanca-no-brasil>>. Acesso em: 22 jul. 2010.

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

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiros: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, p. 417-453.

PASQUAL, M. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA; FAEPE, 2001. 165 p.

PENCHEL, R.M.; NEVES, D. C.; CAMPINHOS, C. N.; EVANGELISTA, A. L.; DESCHAMPS, C. Otimização de parâmetros fisiológicos da propagação vegetativa por estaquia de matrizes elite de eucaliptos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 1995, Lavras. **Resumos...** Lavras: SBFV, 1995. 1 CD ROM.

PEREIRA, J.C.D.; STURION, J.A.; HIGA, A.R., HIGA; R.C.V., SHIMIZU, J.Y. **Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 113 p.

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

PORTAL do reflorestamento. Disponível em:

<<http://www.portaldoreflorestamento.com.br/plantio-de-eucalipto-avanca-no-brasil>>. Acesso em: 13 set. 2012.

PRYOR, L.D.; JOHNSTON, L.A.S. **A classification of the Eucalypts**. Canberra: The Australian National University, p.102, 1971.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, JH.; XU, L.H.; LI, W.J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin: Springer-Verlag, v. 89, p. 457–473, 2011.

RAGHOTHAMA, K.; KARTHIKEYAN, A. Phosphate acquisition. **Plant Ecophysiology**, Oxford, v. 4, p.37-49, 2005.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Gaithersburg, MD, v. 38, p. 116-124, 2002.

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

RAVEN, J.A.; SMITH F.A. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. **New Phytologist**, London, v. 76, p. 415-431, 1976.

RIEFLER, M.; NOVAK, O.; STRNAD, M.; SCHMÜLLING, T. Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. **Plant Cell**, Waterbury, VT, v. 18, p. 40–54, 2006.

RODRIGUES, M.A.; KERBAUY, G.K. Meristemas: fontes de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **Hoehnea**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 525-549, 2009.

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

SANTOS, R.C. dos; CARNEIRO, A.C.O.; MENDES, P.F.T.L.M.; CARVALHO, L.M.M.A. Análise termogravimétrica em clones de eucalipto como subsídio para a produção de carvão vegetal. **Cerne**, Lavras, v. 18, n. 1, p. 143-151, 2012.

SATO, A.Y.; DIAS, H.C.T.; ANDRADE, L.A. de; SOUZA, V.C. de. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, Lavras, v. 7, n. 4, p. 117-123, 2001.

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

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* minicuttings 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.

SCHMÜLLING, T. Cytokinin. In: LENNARZ, W.; LANE, M.D. (Ed.). **Encyclopedia of biological chemistry**. Berlin: Academic Press; Elsevier Science, p. 7, 2004.

SHIMIZU-SATO, S.; MORI, H.; Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. **Plant Physiology**, Waterbury, VT, v. 127, p. 1405–1413, 2001.

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, P.H.M. da; POGGIANI, F.; STAPE, J.L.; BRITO, J.O.; MOREIRA, M.R. Produção de óleo essencial e balanço nutricional em corymbia citriodora adubado com lodo de esgoto em diferentes espaçamentos. **Cerne**, Lavras, v. 15, n. 3, p. 346-354, 2009.

SIQUEIRA, E.R.; RIBEIRO, F.E.; CARVALHO, P.E.R.; DRUMOND, M.A. Comportamento inicial de espécies florestais exóticas na região da mata atlântica de Sergipe. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 1, p. 13-17, 2002.

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

SLATER, A.; SCOTT, N.W.; FOWLER, M.R. Plant tissue culture. In: **Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants**. New York: Oxford University Press, 2003. p. 35-53.

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

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

STAPE, J.L.; ALVES, J.M.; TAKAHASHI, E.N.; FRANCISCATE, W.; JACOB, W.S. Assessing nutritional and climate limitations to the productivity of *Eucalyptus* plantations at larger spatial and temporal scales using a simple paried-plot design coupled to traditional inventory network. In: Borralho, N. M. G., Pereira, J. S., Marques, C., Coutinho, J., Madeira, M., Tomé, M. (eds). **Eucalyptus in a changing world**. Aveiro: IUFRO, 2004. p. 68-69.

SUN, L.; QIU, F.; ZHANG, X.; DAI, X.; DONG, X.; SONG, W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16s rdna sequence analysis. **Microbial Ecology**, New York, v. 55, p. 415-424, 2008.

SVOBODA, P.; FLEMR, M. The role of miRNAs and endogenous siRNAs in maternal-to-zygotic reprogramming and the establishment of pluripotency. **EMBO Reports**, Praha, Czech Republic, v. 11, n. 8, p. 590-597, Aug. 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

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

TANAKA, M.; TAKEI, K.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H.; MORI, H. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. **The Plant Journal**, Oxford, v. 45, p. 1028-1036, 2006.

TEIXEIRA, D. Estado de la información sobre madera para energia. In: FAO. **Estado de la información forestal em Brasil**. Santiago: FAO, 2002. p. 76-79.

THOMPSON, D.S. Space and time in the plant cell wall: relationships between cell type, cell wall rheology and cell function. **Annals of Botany**, London, v. 101, p. 203-211, 2008.

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

TORRES, A.C.; FERREIRA, A.T.; SÁ, F.G.; BUSO, J.A.; CALDAS, L.S.; NASCIMENTO, A.S.; BRÍGIDO, M.M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

TRAN, L.S.; NAKASHIMA, K.; SAKUMA, Y.; OSAKABE, Y.; QIN, F.; SIMPSON, S.D.; MARUYAMA, K.; FUJITA, Y.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 49, p. 46-63, 2007.

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

VERDEIL, J.L.; ALEMANNI, L.; NIEMENAK, N.; TRAMBARGER, T.J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, Cambridge, MA USA, v. 12, n. 6, pp. 245-252, 2007.

VIEIRA, G.H.C. **Análise faunística de abelhas (Hymenoptera: Apoidea) e tipifi cação dos méis produzidos por *Apis mellifera* L., em área de cerrado no município de Cassilândia/MS**. 2005. p.97 Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

- VIEIRA, I.G. **Estudo de caracteres silviculturais e de produção de óleo essencial de progênies de *Corymbia citriodora* (Hook) K. D. Hill & L. A. S. Johnson procedente de Anhembi SP.** 2004. 80 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- VITTI, A.M.S. **Avaliação do crescimento e do rendimento e qualidade do óleo essencial de procedências de *Eucalyptus citriodora*.** 1999. 83 p. Dissertação (Mestrado Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.
- VITTI, A.M.S.; BRITO, J.O. Avaliação do rendimento e do teor de citronelal do óleo essencial de procedências e raças locais de *Eucalyptus citriodora*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 56, p. 145-154, 1999.
- WERNER, T.; MOTYKA, V.; STRNAD, M.; SCHMÜLLING, T. Regulation of plant growth by cytokinin. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 98, p. 10487–10492, 2001.
- WHITE, P.R. Plant tissue cultures. **Annula Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 11, p. 615-628, 1942.
- WOODWARD, A.W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, London, v. 95, p. 707–735, 2005.
- XAVIER, A. **Variabilidade genética de óleo essencial e de crescimento em progênies de meio-irmãos de *Eucalyptus citriodora* Hook.** 1993. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993.
- XAVIER, A.; WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus*.** Viçosa: SIF, 1998. 10 p. (SIF. Informativo Técnico, 11).
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas.** Viçosa: **Editora da UFV**, 2009. 272 p.
- YE, Z.-H. Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 53, p. 183–202, 2002.
- ZHURAVLEV, Y.N.; OMELKO, A.M. Plant morphogenesis *in vitro*. **Russian Journal of Plant Physiology**, Soviet Union, v. 55, n. 5, p. 579–596, 2008.

APÊNDICES

Tabela 5 - Resumo da análise de variância para o índice de multiplicação (IM) de microcepas de *Eucalyptus citriodora* em relação aos tratamentos avaliados ao longo de 90 dias de cultivo

Causas da variação	GL	Quadrados Médios
		IM (microcepas.tratamentos ⁻¹)
F1 – Subcultivo	2	27,11139**
Resíduo-F1	28	0,51254ns
Parcela	30	-
F2 – Meio	2	1,54457ns
F3 – Clone	2	4,54531**
F1xF2	4	5,87005**
F1xF3	4	0,76742ns
F2xF3	4	2,67324**
F1xF2xF3	8	0,88610ns
Resíduo	118	0,54869
Subparcela	172	-
Média	-	3,98
CVexp.(%)	-	18,6

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 $n^{0,5}$, onde n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CVexp. = coeficiente de variação experimental.

Tabela 6 - Média do índice de multiplicação por microcepas de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura e aos subcultivos

Meios de Cultura	Subcultivo		
	2°	3°	4°
WPM	10,00 Ba	11,80 Ba	10,26 Ca
MS	18,75 Ab	25,84 Aa	24,73 Aa
JADS	22,35 Aa	12,10 Bc	18,44 Bb

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

Tabela 7 - Média do índice de multiplicação por microcepas de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura e clone

Meios de Cultura	Clone		
	I93	I92	I91
WPM	14,22 Bb	18,82 Aa	21,53 Aa
MS	17,28 ABa	13,05 Bb	13,69 Bab
JADS	18,75 Aa	14,38 Bb	20,38 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.

Tabela 8 - Comparação entre os meios de cultura WPM, MS e JADS quanto à disponibilidade de nutrientes

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

Tabela 9 - 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 citriodora*, em relação aos tratamentos avaliados ao longo de 180 dias de cultivo

Causas da variação	GL	Quadrados Médios					
		N(1) (g kg ⁻¹)	P (g kg ⁻¹)	K (g kg ⁻¹)	Ca(2) (g kg ⁻¹)	Mg(1) (g kg ⁻¹)	S(2) (g kg ⁻¹)
Meios de Cultura (F1)	2	0,0062**	3,2916**	74,10666**	1,27355**	0,21714**	0,44857**
Clones (F2)	2	0,0003**	0,62166*	28,18666**	0,06206**	0,00519**	0,05828**
F1xF2	4	0,0001**	0,06583ns	17,57333**	0,01481**	0,01210**	0,02193**
Resíduo	9	0,00001	0,09222	136.000,00	0,0017	0,00061	0,0023
Média	-	0,17	2,4	29,8	0,76	0,69	0,52
CVexp.(%)	-	2,29	12,65	3,91	5,37	3,56	9,12

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 (2) Dados transformados por $1/n0,5$ e $n/10$, onde n = dado amostrado.. GL = graus de liberdade, CVexp. = coeficiente de variação experimental.

Tabela 10 - Média dos acúmulos de nitrogênio por explante de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura e clone

Meios de Cultura	Clone		
	I93	I92	I91
WPM	25,80 Ba	21,40 Ba	29,95 Ba
MS	51,45 Aa	47,45 Aa	55,95 Aa
JADS	27,90 Ba	27,00 Ba	27,20 Ba

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

Tabela 11 - Média dos acúmulos de fósforo por explante de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura

Meios de Cultura	Fósforo
WPM	2,15 B
MS	1,81 B
JADS	3,23 A

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 12 - Média dos acúmulos de fósforo por explante de *Eucalyptus citriodora* em relação ao clone

Clone	Fósforo
I93	2,46 AB
I92	2,05 B
I91	2,68 A

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 13 - Média dos acúmulos de potássio por explante de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura e clone

Meios de Cultura	Clone		
	I93	I92	I91
WPM	29,80 Ab	35,60 Aa	35,40 Aa
MS	30,60 Aa	32,00 ABa	24,80 Bb
JADS	24,20 Bb	29,20 Ba	26,60 Bab

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

Tabela 14 - Média dos acúmulos de cálcio por explante de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura e clone

Meios de Cultura	Clone		
	I93	I92	I91
WPM	5,35 Ba	6,10 Ba	5,65 Ba
MS	4,40 Bab	5,30 Ba	3,50 Cb
JADS	11,90 Ab	15,15 Aa	11,80 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.

Tabela 15 - Média dos acúmulos de magnésio por explante de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura e clone

Meios de Cultura	Clone		
	I93	I92	I91
WPM	1,75 Ba	1,10 Cb	1,75 Ba
MS	1,60 Ba	1,80 Ba	1,50 Ba
JADS	4,50 Aa	4,30 Aa	4,45 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.

Tabela 16 - Média dos acúmulos de enxofre por explante de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura e clone

Meios de Cultura	Clone		
	I93	I92	I91
WPM	6,10 Ac	10,35 Aa	8,45 Ab
MS	2,70 Ba	3,20 Ca	3,10 Ba
JADS	4,15 Ba	5,30 Ba	4,00 Ba

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

Tabela 17 - 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 citriodora* em relação aos tratamentos avaliados ao longo de 180 dias de cultivo

Causas da variação	GL	Quadrados Médios				
		B	Cu(1)	Fe	Mn(1)	Zn ⁽²⁾
		(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)
Meios de Cultura (F1)	2	504,50000**	0,98059**	11.193,14055**	0,00066**	150,96500**
Clones (F2)	2	12,16666ns	0,08117*	12776,04388**	0,00001ns	0,88666*
F1xF2	4	5,41666ns	0,09557*	1667,16888ns	0,00001ns	0,25416ns
Resíduo	9	944,444	0,01635	54.218,28	0,00001	0,17555
Média	-	41,6	0,52	408,79	0,08	11,03
CVexp.(%)	-	7,37	24,13	5,69	4,37	3,79

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 (2) Dados transformados por $1/n0,5$ e $n/10$, onde n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CVexp. = coeficiente de variação experimental.

Tabela 18 - Média dos acúmulos de boro por explante de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura

Meios de Cultura	Boro
WPM	48,83 A
MS	44,83 A
JADS	31,33 B

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 19 - Média dos acúmulos de cobre por explante de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura

Meios de Cultura	Cobre
WPM	7,36 B
MS	1,53 C
JADS	18,90 A

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 20 - Média dos acúmulos de cobre por explante de *Eucalyptus citriodora* em relação ao clone

Clone	Cobre
I93	9,41 A
I92	9,33 AB
I91	9,05 B

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 21 - Média dos acúmulos de ferro por explante de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura

Meios de Cultura	Ferro
WPM	458,45 A
MS	379,93 B
JADS	388,00 B

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 22 - Média dos acúmulos de ferro por explante de *Eucalyptus citriodora* em relação ao clone

Clone	Ferro
I93	425,30 A
I92	356,66 B
I91	444,41 A

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 23 - Média dos acúmulos de manganês por explante de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura

Meios de Cultura	Manganês
WPM	104,50 B
MS	121,83 B
JADS	167,83 A

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 24 - Média dos acúmulos de zinco por explante de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura

Meios de Cultura	Zinco
WPM	136,50 A
MS	142,00 A
JADS	52,50 B

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 25 - Média dos acúmulos de zinco por explante de *Eucalyptus citriodora* em relação ao clone

Clone	Zinco
I93	113,33 A
I92	106,00 B
I91	111,66 AB

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 26 - Resumo da análise de variância para o número de brotos (NB), peso da matéria fresca (PF), peso da matéria seca (PS), conteúdo relativo de água (CRA), de microcepas de *Eucalyptus citriodora* em relação aos tratamentos avaliados ao longo de 180 dias de cultivo

Causas da variação	GL	Quadrados Médios			
		NB(1) (NB.microcepa ⁻¹)	PF(1) (g.microcepa ⁻¹)	PS(1) (g.microcepa ⁻¹)	CRA(1) (%)
Meio de Cultura (F1)	2	10,04556**	6,10550**	5,76527**	0,00074ns
Clone (F2)	2	4,81427**	3,11226**	1,54966**	0,00697**
F1xF2	4	1,77894**	0,46344**	0,69393**	0,00049ns
Resíduo	170	0,42902	0,11544	0,08822	0,00033
Média	-	2,4	3,89	1,7	4,48
CVexp.(%)	-	27,18	8,72	17,4	0,41

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 log(n), onde n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CVexp. = coeficiente de variação experimental.

Tabela 27 - Média do número de brotos por microcepas de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura e clone

Meios de Cultura	Clone		
	I93	I92	I91
WPM	23,10 Aa	19,50 ABa	21,90 Aa
MS	11,65 Aa	8,85 Ba	4,84 Ba
JADS	11,60 Ab	29,90 Aa	9,95 Bb

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

Tabela 28 - Média do peso da matéria fresca por microcepas de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura e clone

Meios de Cultura	Clone		
	I93	I92	I91
WPM	53,52 Ab	77,42 Aa	45,06 Bb
MS	53,90 Ab	81,29 Aa	71,91 Aa
JADS	36,75 Aab	46,38 Ba	28,38 Cb

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.

Tabela 29 - Média do peso da matéria seca por microcepas de *Eucalyptus citriodora* em relação ao meio de cultura e clone

Meios de Cultura	Clone		
	I93	I92	I91
WPM	5,82 Ab	7,77 Aa	5,21 Bb
MS	5,67 Ab	8,33 Aa	9,05 Aa
JADS	4,26 Aab	4,76 Ba	3,45 Cb

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.

Tabela 30 - Média do coeficiente relativo de água por microcepas de *Eucalyptus citriodora* em relação ao clone

Clone	Coeficiente Relativo de Água
I93	88,64 B
I92	89,59 A
I91	87,68 C

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.