

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

**Métodos para resgate, conservação e multiplicação em larga escala de  
matrizes de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage**

**Francisco José Benedini Baccarin**

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

**Piracicaba  
2012**

Francisco José Benedini Baccarin  
Engenheiro Agrônomo

**Métodos para resgate, conservação e multiplicação em larga  
escala de matrizes de *Eucalyptus benthamii* Maiden &  
Cambage**

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

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

**Piracicaba  
2012**

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

Baccarin, Francisco José Benedini

Métodos para resgate, conservação e multiplicação em larga escala de matrizes de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage / Francisco José Benedini Baccarin. - - Piracicaba, 2012.

77 p: il.

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

1. Clonagem 2. Enxertia 3. Estaquia 4. Eucalipto 5. Genótipos 6. Micropropagação vegetal I. Título

CDD 634.9736  
B116m

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

**DEDICO**

Este Trabalho aos meus pais,  
Francisco e Silvia

ao meu irmão  
Pedro

e a minha noiva  
Lívia



## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcilio de Almeida pela orientação, amizade, paciência, disponibilidade e sábios conselhos.

Ao Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves, pelos ensinamentos passados e pelo empréstimo de espaço físico para realização deste trabalho.

A Dr. Cristina Vieira de Almeida, pelos conselhos, amizade, e ensinamentos para a realização deste trabalho.

Aos técnicos Beto e Eveline pela ajuda e apoio na realização dos trabalhos

A Universidade Estadual de São Paulo (USP/ESALQ) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura e Manejo Florestal, pela oportunidade da realização deste trabalho.

A Angico's Mudanças Florestais, In Vitro Palm e ao IPEF pela ajuda financeira, científica e suporte na condução dos trabalhos.

Aos colegas de pós-graduação, Gabi, Germana, Rafaela, Leandro, Gilvano, Katherine Fabi, Marília, Natalia, Priscila e Erika pela ajuda, incentivo e companheirismo.

Em especial a minha noiva Lívia, pela amizade, amor, companheirismo e paciência.

Aos meus pais Francisco e Silvia pelo amor, ensinamentos, paciência e ajuda nos momentos difíceis.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A DEUS pelo olhar atento e cuidadoso em todos os momentos.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	11
LISTA DE FIGURAS .....	13
LISTA DE TABELAS .....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1 Eucalipto e as Geadas .....	19
2.2 <i>Eucalyptus benthamii</i> .....	21
2.3 Seleção de clones.....	24
2.4 Propagação clonal e juvenilidade .....	26
2.4.1 Estaquia .....	29
2.4.2 Micropropagação .....	30
2.4.3 Enxertia.....	33
2.4.4 Brotações epicórmicas .....	34
2.4.5 Anelamento.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Origem e seleção do material .....	37
3.1.1 Brotações dos primeiros galhos da copa .....	38
3.1.2 Brotos do anelamento .....	38
3.1.3 Brotações epicórmicas .....	39
3.1.4 Brotos oriundos da poda dos galhos da copa.....	40
3.2.1 Brotações dos primeiros galhos da copa .....	41
3.2.2 Brotos do anelamento .....	41
3.2.3 Megaestaca .....	41
3.2.4 Brotos oriundos da poda dos galhos da copa.....	42

3.2.5 Microestacas.....	42
3.2.6 Condições de enraizamento .....	42
3.3 Enxertia .....	43
3.4 Micropropagação .....	44
3.4.1 Meio de cultura e condições <i>in vitro</i> .....	44
3.4.2 Introdução <i>in vitro</i> .....	44
3.4.3 Multiplicação .....	45
3.4.4 Alongamento.....	46
3.4.5 Formação de mini e microjardim clonal .....	46
3.4.6 Análises dos dados .....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
4.1 Brotações epicórmicas .....	47
4.2 Estaquia.....	50
4.3 Enxertia .....	58
4.4 <i>In vitro</i> .....	59
4.5 Estabelecimento do mini e mirco jardim clonal.....	65
5 CONCLUSÕES .....	67
REFERÊNCIAS.....	68

## RESUMO

### **Métodos para resgate, conservação e multiplicação em larga escala de matrizes de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage**

O *E. benthamii* apresenta grande aptidão de cultivo no Brasil, principalmente em regiões de clima frio e com geadas frequentes, isso se deve a sua origem a oeste de Sydney na Austrália, onde as temperaturas são muito baixas, com ocorrência de geadas. Levando-se em conta o seu ótimo desempenho silvicultural, genótipos selecionados certamente representam uma excelente alternativa para plantios futuros. A clonagem de genótipos superiores é realizada através da propagação vegetativa de árvores adultas, e requer material fisiologicamente juvenil ou rejuvenescido. Técnicas especiais são necessárias para reverter árvores adultas a juvenilidade e resgatar condições favoráveis para promover o enraizamento e crescimento. Dentre as técnicas de propagação utilizadas para o resgate de plantas adultas destacam-se o corte raso (decepa), anelamento, estaquia, miniestaquia, enxertia e micropropagação. No caso específico dos eucaliptos para obtenção de brotações, o método de resgate mais utilizado pelas empresas florestais é o corte raso da árvore ou anelamento, técnicas que proporcionam uma alta taxa de enraizamento de estacas, devido à eficiente reversão a juvenilidade. Porém, quando existe a necessidade de preservação do indivíduo, justifica-se o uso de técnicas não destrutivas, evitando dessa forma a morte da árvore matriz. O Presente trabalho objetivou após a seleção *in loco* de fenótipos com características silviculturais superiores, resgatar (através de técnicas não destrutivas), conservar e multiplicar matrizes adultas de *E. benthamii*, avaliando-se qual(is) técnica(s) apresenta(m) melhor(es) resultado(s) para a clonagem das mesmas. Para tanto, utilizou-se brotações dos primeiros galhos da copa, brotações epicórmicas (megaestaca), brotações que surgiram provenientes do anelamento e brotações oriundas da poda dos galhos da copa, as quais foram submetidas às técnicas de estaquia, enxertia e micropropagação para cada tipo de broto. Apesar de ter ocorrido variação da porcentagem entre os clones, a megaestaca mostrou ser a melhor alternativa para o estabelecimento *in vitro* de plantas adultas de *E. benthamii*, sendo recomendada sua utilização para o resgate de material genético adulto, estabelecido em condições de campo. Todas as matrizes de *E. benthamii* foram resgatadas com sucesso, e no intuito de formar um banco de germoplasma, um minijardim clonal foi instalado com as mudas que apresentaram melhor qualidade, que poderá ser utilizado para futuros testes e formação de mudas.

Palavras-chave: Clonagem; Micropropagação; Estaquia; Enxertia; Resgate e multiplicação de genótipos superiores; Brotações epicórmicas



## ABSTRACT

### **Methods for rescue, conservation and multiplication of matrices *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambege**

The *E. benthamii* presents a great aptitude for cultivation in Brazil, especially in cold climates and with frequent frosts, this is due to your west of Sydney origin in Australia, where temperatures are very low, with frosts. Taking into account their optimal silvicultural performance, selected genotypes will certainly represent an excellent alternative for future plantings. The cloning of superior genotypes is accomplished by vegetative propagation of mature trees, and requires physiologically juvenile or rejuvenated material. Special techniques are necessary to reverse the juvenile and adult trees recover favorable conditions to promote rooting and growth. Among the propagation techniques used for the rescue of mature plants stand out clear-cutting (coppicing), annealing, cutting, minicutting, grafting and micropropagation. In the specific case of eucalyptus to obtain propagules, the most rescue method used for the forestry companies are clearcutting or annealing, techniques that provide a high rate of rooting, due to efficient reversion to juvenility. However, when there is a need to protect the individual, justifies the use of non-destructive techniques, thus avoiding the death of the tree array. The present study aimed to spot after the selection of phenotypes with characteristics superior silvicultural, rescue (through non-destructive techniques) to retain and multiply matrices adult the *E. benthamii*, evaluating which technique that present the best result for the cloning of the same. So we used to shoot the first cup of twigs, shoots, epicormic shoots that emerged from the annealing and shoots arising from the pruning of the branches of the crown, which were submitted to the techniques of cutting, grafting and micropropagation for each type of bud. Considering the percentage variation between the clones, the epicormic shoots showed to be the best alternative for the in vitro establishment to the *E. benthamii* adult plants, being recommended its utilization to the adult genetic material rescue, All the tested *E. benthamii* plants were rescued with success, and in the aim to stablish germoplasm bank, a clonal mini garden was instaled with the plantlets that present the best quality.

Keywords: Cloning; Micropropagation; Cuttings; Grafting; Rescue and multiplication of superior genotypes; Epicormic shoots



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa de distribuição natural de *Eucalyptus benthamii* na Austrália (BUTCHER; SKINNER; GARDINER, 2005) ..... 23
- Figura 2 – Gradientes de juvenilidade-maturidade que se inicia quase na base da árvore. Esquerda: o gradiente do estado juvenil em  $A > F > E > D > C > B$ . Direita: o gradiente do estado juvenil em  $A > G$ ; B: broto originário de raízes adventícias; C: brotos epicórmicos; D: esferoblastos (adventícias); E - F: brotação de touças, onde B - F: representam brotações juvenis. (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000a) ..... 27
- Figura 3 - Vista da floresta de *E. benthamii*, onde se retirou material para os experimentos (A); Detalhe da etiqueta amarada com arame, para identificação das matrizes (B) ..... 37
- Figura 4 - Brotações dos primeiros galhos da copa de *E. benthamii*, destacados (A); Saco plásticos de 60 L contendo jornal umedecido com água, foi utilizado para o transporte do material coletado ..... 38
- Figura 5 - Detalhe do anelamento realizado, 20 cm de largura (A); Brotações emitidas após 90 da realização do anelamento ..... 39
- Figura 7 – Brotações emitidas no local onde se realizou a coleta das megaestaca ..... 40
- Figura 6 - Disposição das megaestacas em vasos com areia e sob aspersão (A); Início da emissão de brotos da megaestaca (B) ..... 40
- Figura 8 - Casa de vegetação com aspersão intrermitente (A); Mini estufa pronta para estaquia, sendo recoberta por plástico transparente, para manutenção da umidade ..... 43
- Figura 9 - Segmentos nodais da porção mediana da brotação com as folhas removidas, contendo um par de gemas axilares (A); Explante estabelecido, e com as gemas axilares se desenvolvendo (B)..... 45
- Figura 10 - Figura -10 Segmentos nodais obtidos dos brotos dos primeiros galhos da base da copa com contaminação por fungo (A) e início de oxidação (B); Segmento nodal do anelamento oxidação e contaminação por fungo e bactéria (C e D); Segmento nodal da megaestca em início do desenvolvimento das gemas axilares e brotos completamente desenvolvidos respectivamente (E e F respectivamente) ..... 61
- Figura 11 - Contaminação por alga (A); Detalhe da exudação de alga para o meio de cultura(B) Detalhe da alga depois de isolada do meio de cultura e observada em microscópio (C) ..... 64
- Figura 12 – Vista do minijardim clonal formado a partir do resgate das 20 matrizes..... 65



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação do CAP (circunferência a altura do peito, 1,30 m), DAP (diâmetro a altura do peito, 1,30 m) e altura de cada matriz selecionada de <i>Eucalyptus benthamii</i> .....	47
Tabela 2 - Resumo da análise de variância para número de zonas meristemáticas (ZM) por megaestacas e número de brotos por zona meristemática (NBZ) de <i>Eucalyptus benthamii</i> em relação a matriz.....	48
Tabela 3 - Valores médios número de zonas meristemáticas (ZM) por megaestacas e número de brotos por zona meristemática (NBZ) de <i>Eucalyptus benthamii</i> em relação a matriz .....	48
Tabela 4 - Matriz de Correlação de Pearson para o diâmetro de megaestaca (DIA), número de zonas meristemáticas (ZM) por megaestacas e número de brotos por zona meristemática (NBZ) de <i>Eucalyptus benthamii</i> .....	50
Tabela 5 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de sobrevivência (PS) e porcentagem de enraizamento (PE) de propágulos de <i>Eucalyptus benthamii</i> em relação ao clone, origem de broto e ambiente de enraizamento.....	51
Tabela 6 - Valores médios da porcentagem de sobrevivência de propágulos de <i>Eucalyptus benthamii</i> em relação a origem de broto (BC – Brotações dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BAn – brotos do anelamento, BMe – brotos da megaestaca, BIn – brotos alongados <i>in vitro</i> ) e ambiente de enraizamento (CV – casa de vegetação, MI – miniestufa).....	52
Tabela 7 - Valores médios da porcentagem de enraizamento de propágulos de <i>Eucalyptus benthamii</i> em relação à origem de broto (BC – Brotações dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BAn – brotos do anelamento, BMe – brotos da megaestaca, BIn – brotos alongados <i>in vitro</i> ) e ambiente de enraizamento (CV – casa de vegetação, MI – mini estufa).....	53
Tabela 8 - Valores médios da porcentagem de sobrevivência de propágulos de <i>Eucalyptus benthamii</i> em relação ao clone e origem do broto (BC – Brotações dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BAn – brotos do anelamento, BMe – brotos da megaestaca, BIn – brotos alongados <i>in vitro</i> ).....	56
Tabela 9 - Valores médios da porcentagem de enraizamento de propágulos de <i>Eucalyptus benthamii</i> em relação ao clone e origem do broto (BC – Brotações dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BAn – brotos do anelamento, BMe – brotos da megaestaca, BIn – brotos alongados <i>in vitro</i> ).....	57
Tabela 10 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de pegamento (PEG) de enxertos <i>Eucalyptus benthamii</i> em relação ao clone e origem de broto .....	58
Tabela 11 - Valores médios da porcentagem de pegamento de enxertos de <i>Eucalyptus benthamii</i> em relação ao clone e origem do broto (BC – Brotações dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BAn – brotos do anelamento).....	59
Tabela 12 - Resumo da análise de variância para o estabelecimento (EST), contaminação fúngica (FUN), contaminação bacteriana (BAC), contaminação com alga (ALG) e oxidação (OXI) de explantes de <i>Eucalyptus benthamii</i> em relação ao clone e origem do broto .....	60

Tabela 13 - Médias da oxidação de explantes de *Eucalyptus benthamii* em relação a origem do broto 60

Tabela 14 - Médias do estabelecimento (EST) de explantes de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e origem do broto (BC– Brotos dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BMe – broto da megaestaca, BAn – broto do anelamento)..... 61

Tabela 15 - Médias da contaminação fúngica (FUN) de explantes de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e origem do broto (BC– Brotos dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BMe – broto da megaestaca, BAn – broto do anelamento)..... 62

Tabela 16 - Médias da contaminação bacteriana (BAC) de explantes de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e origem do broto (BC– Brotos dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BMe – brotos da megaestaca, BAn – brotos do anelamento) ..... 63

Tabela 17 - Médias da contaminação com alga (ALG) de explantes de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e origem do broto (BC– Brotações dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BMe – brotos da megaestaca, BAn – brotos do anelamento) ... 64

## 1 INTRODUÇÃO

Existem mais de 700 espécies de *Eucalyptus*, a maioria provenientes da Austrália, que foram introduzidos no Brasil em 1904 com o objetivo de suprir as necessidades de lenha, postes e dormentes das estradas de ferro Andrade (1961). Na região sudeste, vem sofrendo os mais diversos processos de adaptação, entretanto, poucas são as espécies que apresentam aptidão para o cultivo em regiões frias e com geadas frequentes. As geadas são um dos principais fatores limitantes aos plantios comerciais do eucalipto, na região sul do Brasil. As geadas registradas em 1972 foram as de maior influência sobre a atividade florestal, causando em alguns locais, perdas totais de talhões de espécies suscetíveis, estabelecidas principalmente no sul do Brasil (HIGA; GARCIA; SANTOS, 1994).

O *E. benthamii* apresenta-se como uma excelente alternativa de plantio para essas regiões por sua resistência a geadas, rápido crescimento e ainda por ser considerada uma espécie de interesse dos melhoristas, pois apresenta vantagens em relações a outros *Eucalyptus* que também possuem resistência a geadas, como *E. dunnii* e o *E. viminalis*.

O *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage, é encontrado em áreas limitadas, ao oeste da cidade de Sydney em planícies ao longo do rio Nepean e seus tributários (PRYOR, 1981), onde ocorrem centenas de geadas por ano, registrando temperaturas que variam de 4 a 26°C, características essas muito similares às encontradas na região sul e sudeste do Brasil, que representa o maior polo de plantio florestal. Tem sua origem na Austrália, derivando da cidade de Camden, perto da qual poucas espécies ainda existem. Em sua região de origem pode atingir 36 m de altura e 50 cm de diâmetros (NISGOSKI, 1998),

Esse fato justifica maiores estudos da espécie no Brasil, pois além das características supra citadas, a espécie ainda apresenta ótimas qualidades silviculturais, sendo que a madeira pode ser destinada para lenha, carvão e dormentes (HIGA; PEREIRA 2003).

As empresas florestais fazem uso da clonagem do *Eucalyptus* para a obtenção de maiores homogeneidades e qualidade de florestas. Esta técnica é de fundamental importância para o aumento do rendimento e qualidade da madeira, podendo ainda obter-se um maior planejamento da colheita pelas empresas.

Para a formação de uma floresta clonal, com alto padrão de produtividade e qualidade, todas as etapas da silvicultura clonal devem ser realizadas de forma criteriosa, as quais

incluem desde a seleção da planta matriz, seguida dos processos de clonagem, até a obtenção da floresta clonal. Entretanto, a seleção dos clones é realizada na maioria das vezes na fase adulta, onde a propagação vegetativa encontra limitações, principalmente, no que se refere à variação de genótipos entre e dentro das espécies florestais, e da redução gradual da capacidade de enraizamento de estacas, que esta associada ao envelhecimento ontogênico (ASSIS, 1997).

A maioria das empresas florestais utiliza a técnica da decepa da árvore, para tentar reverter a juvenilidade, aumentando assim o percentual de enraizamento das estacas. No entanto, esse método não pode ser aplicado em espécies com dificuldade de rebrota e, ou protegidas do corte raso. Dentre as técnicas de propagação vegetativas não destrutivas, as mais conhecidas e aplicadas são: anelamento, enxertia, estaquia, brotações epicormicas de galhos destacados (mega estaca), miniestaquia, e microestaquia.

O presente trabalho visou após a seleção *in loco* de fenótipos com características silviculturais superiores, resgatar (através de técnicas não destrutivas), conservar e multiplicar matrizes adultas de *E. benthamii*, avaliando-se qual (is) técnica(s) apresenta(m) melhor (es) resultado(s) para a clonagem de matriz adultas *E. benthamii*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Eucalipto e as Geadas

Atualmente o Brasil possui 6,5 milhões de hectares de florestas plantadas, dos quais 4,75 milhões plantados com eucaliptos e 1,75 milhões de hectares de pinus (73% de eucalipto e 27 % pinus) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS – ABRAF, 2011).

A partir do início do século 20, o cultivo de *eucalipto* teve seu plantio intensificado no Brasil, sendo usado durante algum tempo nas ferrovias, como dormentes e lenha, mais tarde, como poste para eletrificação das linhas. No final dos anos 20, as siderúrgicas mineiras começaram a aproveitar a madeira do eucalipto, transformando-o em carvão vegetal utilizado no processo de fabricação de ferro-gusa. A partir daí, novas aplicações foram desenvolvidas sendo que hoje se encontra muito disseminado, desde o nível do mar até 2.000 metros de altitude, em solos extremamente pobres, em solos ricos, secos e alagados (FORESTBRASIL, 2005).

Plantios comerciais de *Eucalyptus* são encontrados do Rio Grande do Sul (aproximadamente 30° de latitude Sul) até o litoral da Bahia (aproximadamente 14° de latitude Sul), no entanto, a maior parte está situada próximo ao trópico de Capricórnio, que é a melhor região de sua adaptação. Existem espécies que aparentemente se comportam bem em toda essa extensão territorial do Brasil, como o *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus urophylla* e seus híbridos, os quais são cultivados com relativo êxito em todo o território nacional, porém suscetíveis aos efeitos da geada (GOLFARI; CASER; MOJRA, 1978).

Apesar de ser um evento climático ocasional, as geadas são um dos principais fatores limitantes aos plantios comerciais do eucalipto na região sul do Brasil. Segundo Higa, Garcia e Santos (1994), as geadas registradas em 1972 foram as de maior influência sobre a atividade florestal, causando em alguns locais, perdas de até 100%, em talhões de espécies suscetíveis, estabelecidas principalmente no sul do Brasil. Esses autores registram, ainda, que as geadas dos anos de 1974, 1975, 1991 e 1994, também comprometeram o abastecimento da indústria de base florestal.

Os danos nas plantas são decorrentes do congelamento dos líquidos presentes nos espaços intercelulares, havendo ruptura de membranas por compressão e extravasamento irreversível do citoplasma. Normalmente, a formação de gelo nos tecidos, ocorre em temperaturas a partir de - 3 ou - 4°C (HIGA; GARCIA; SANTOS, 1994). De acordo com esses autores, as temperaturas verificadas nos dias anteriores às geadas são decisivas na severidade dos danos. Quanto menos a planta estiver adaptada a baixas temperaturas, mais severos serão os efeitos causados. A seleção de espécies e procedências de *Eucalyptus* resistentes ao frio é o que tem sido procurado pelos programas de melhoramento genético visando minimizar o problema (HIGA et al., 1997).

Resistência a geadas envolve mecanismos de prevenção e tolerância. Em condições de temperaturas inferiores a 0°C, o metabolismo das células é afetado, reduzindo-se ao mínimo as funções fisiológicas mais importantes. A prevenção se dá através de processos que evitam a formação de gelo, quer pela proteção de partes ou órgãos das plantas contra baixas temperaturas, quer pela diminuição do ponto de fusão da água ou síntese de solutos que aumentam a concentração osmótica intracelular, dificultando a saída da água para formação do gelo extracelular (HIGA et al., 2000). Os mecanismos de prevenção são estratégias adequadas de plantas em regiões onde ocorrem geadas leves, durante o período de crescimento e atividade metabólica. A diminuição do ponto de congelamento pode ser induzida, após alguns dias de baixas temperaturas e é suficiente para aumentar a resistência a geadas esporádicas ou aquelas que ocorrem fora do período de inverno (HIGA et al., 2000). Tolerância é a habilidade da planta em sobreviver à formação do gelo extracelular, sem sofrer danos (LARCHER, 1983), sendo considerado o único mecanismo eficiente de sobrevivência, onde as geadas são regulares e severas, típicas de regiões de grandes latitudes (SAKAI; LARCHER, 1987).

A extensão dos danos provocados por geadas depende da intensidade e da duração da temperatura mínima. Porém, um dos fatores influentes é o efeito da época de ocorrência de geadas, isto é, se ocorrem em episódios isolados, ou se ocorrem regularmente. A época de ocorrência de geadas varia consideravelmente de ano para ano e são normalmente mais severas quando ocorrem em episódios isolados, porque embora as temperaturas raramente sejam muito baixas, elas atingem as plantas com pouca ou nenhuma rustificação (LARCHER, 1983). Em contraste, nas geadas periódicas, as plantas podem se “preparar” para a sua ocorrência anual, através de uma gradual aclimação dos seus processos vegetativos e dessa

forma não sofrer danos que comprometeriam seu desenvolvimento (SAKAI; LARCHER, 1987).

Visualmente, as geadas são classificadas de duas formas: a) geada branca, em que se observa a formação de uma crosta de gelo devido à alta umidade relativa; b) a geada negra, em que se verifica a queima das plantas sob condições de baixa umidade relativa e sem a formação de gelo (SANTOS; AUER; GRIGOLETTI Jr., 2001).

Mesmo com o elevado número de espécies do gênero *Eucalyptus* e a grande variação no grau de plasticidade das espécies (HALL; JOHNSTON; CHIPPENDAL, 1970), o desenvolvimento da eucaliptocultura em regiões onde ocorrem geadas tem sido bastante dificultado, face à sensibilidade elevada desse vegetal a essas condições climáticas (FAO, 1956). Neste contexto, o *E. benthamii* se destaca por sua resistência a geadas, possibilitando assim o cultivo em áreas que ocorrem geadas frequentes, e também por ser uma espécie de muito interesse aos melhoristas devido ao seu rápido crescimento. Além disso, apresenta vantagens em relações a outros *Eucalyptus* que apresentam resistência a geadas, como *E. dunnii* e o *E. viminalis*. O *E. viminalis* apresenta baixa taxa de crescimento, e apresenta diversos problemas fisiológicos que acarretam alta mortalidade, embora tenha notória tolerância às geadas. O *E. dunnii* floresce aproximadamente aos quinze anos de idade, e mesmo assim, alternando anos com e sem floração, já o *E. benthamii* floresce aos seis anos de idade e sem acentuadas alternâncias de anos de intensa e baixa floração além rápido crescimento.

## **2.2 *Eucalyptus benthamii***

*Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage foi classificado por PRYOR; JOHNSON (1971) na série Viminales, subsérie Viminalinae. A espécie é botanicamente próxima ao *E. dorrigoensis* e ao *E. kartzoffiana*. Até recentemente, o *E. dorrigoensis* era considerado como subespécie de *E. benthamii*. No entanto, as duas espécies apresentam diferenças acentuadas na estrutura externa do opérculo (BENSON, 1985). Ao considerar o *E. dorrigoensis*, a queda do primeiro opérculo ocorre antes da antese, mostrando uma camada de abscisão bem definida. Essa camada parece ser suprimida em *E. benthamii* causando a estagnação do crescimento do opérculo externo ainda nos estágios iniciais de desenvolvimento dos botões florais. Isso deixa uma série de cicatrizes irregulares que secam e caem antes da antese (JOHNSON; HILL, 1990).

O *Eucalyptus benthamii*, é originário da Austrália, derivando da cidade de Camden, perto da qual, poucas espécies de pequeno diâmetro ainda existem. A árvore é moderadamente alta, atingindo 36 m e diâmetros de 50 cm (NISGOSKI, 1998). O *E. benthamii* é encontrado em áreas limitadas, ao oeste da cidade de Sydney em planícies ao longo do rio Nepean e seus tributários (PRYOR, 1981). Originalmente, a espécie ocorria nas partes planas de sedimentação de rios onde os solos eram férteis, com latitude aproximada de 34°S e altitudes inferiores a 100 m. A temperatura média mínima e máxima nessa região é de 4 a 26°C respectivamente, com ocorrência de geadas leves, e precipitação anual de 1.100 mm com picos moderados no verão e outono (HIGA; PEREIRA, 2003).

A maior parte da população original foi cortada para a formação de pastagens ou foi inundada com a construção da represa de Warragamba. Embora *E. benthamii* faça parte do mesmo grupo botânico de *E. viminalis*, ele apresenta características distintas, como preferência por solos férteis. Essa característica tornou a espécie vulnerável durante a expansão da fronteira agrícola e foi considerada em risco de extinção (PRYOR, 1981).

Levantamentos recentes mostram a ocorrência de uma pequena população e de alguns indivíduos isolados ao longo do Rio Nepean entre as localidades de Wallacia e Camden e de uma população maior em Kedumba Creek (33° 49' LS; 150° 22' LE) cerca de 5 km rio acima da junção com o antigo Rio Cox, atualmente inundado pelo lago Burragarang (BENSON, 1985). De acordo com Skinner (2003) existem, atualmente, apenas dez mil indivíduos em Kedumba, 400 em Bents Basin e 18 em Camden.

A população existente em Bents Basin está localizada dentro da Área de Recreação Estadual de Bents Basin (Bents Basin State Recreation Area), o qual é controlado pelo NPWS (National Parks and Wildlife Service). A maior população de Keduma Valley ocorre nas terras controladas pela Sydney Water (NSW, 2000).

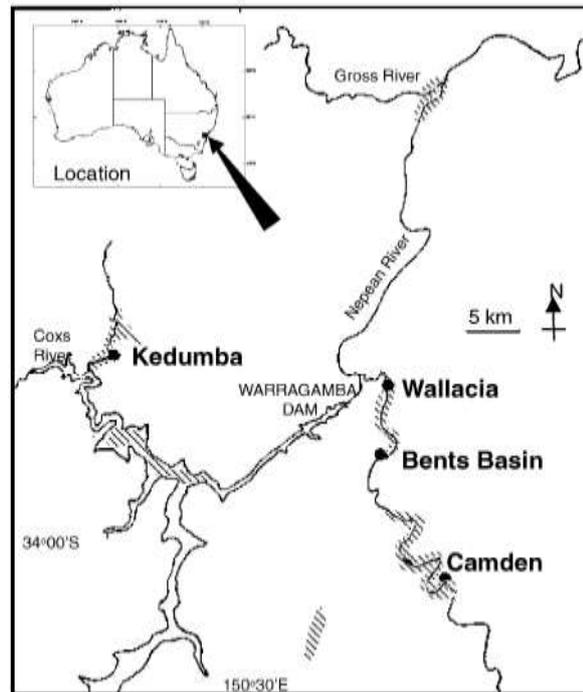


Figura 1 - Mapa de distribuição natural de *Eucalyptus benthamii* na Austrália (BUTCHER; SKINNER; GARDINER, 2005)

A casca do *E. benthamii* é persistente, fina, compacta e tende a formar pequenas tiras longitudinais as quais são aderentes apenas em parte. As Folhas velhas são opostas, sésseis, os primeiros dois a quatro pares elípticos a ovais; glândulas proeminentes espalhadas na folha e conspícuas no pecíolo. As Folhas jovens também são opostas, sésseis, largamente oblongos ovadas a ovadas, subglaucas, textura moderadamente fina. As Folhas intermediárias são opostas a subopostas, sésseis ou com pequena haste, lanceoladas; verdes, textura moderadamente fina. Folhas adultas são alternas, longas hastes, lanceoladas; verdes, algumas com textura fina. Inflorescência axilar, 4-7 flores, pedúnculos com 0,5 cm de comprimento, pedicelos com 0,25 cm. Botão oval a clavado, no sul forma opérculos hemisféricos e subglaucos, no norte apresenta forma cônica e dificilmente glauco. Fruto hemisférico a campanulado, subglauco quando imaturo; disco estreito, levemente convexo ou mais ou menos iguais e com 3-4 valvas (NISGOSKI, 1998).

A espécie é resistente ao frio, ocorrendo em áreas com temperaturas mínimas do mês mais frio variando de -1 a 3°C, sendo tolerante a geadas e a secas (JOVANOVIC; BOOTH, 2002). Segundo PALUDZYSYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, (2006), o *E. benthamii* é indicado para plantios em regiões com temperaturas mínimas absolutas de até -10°C, sob temperaturas abaixo desse limite, pode ocorrer atrasos no desenvolvimento em altura de

plantas, porém são pouco expressivos. Climas esses muito parecidos com os encontrados na região sul e sudeste do Brasil, o que torna o *E. benthamii* uma ótima espécie a ser estudada e cultivada nessas regiões, pois segundo Stape (1996) as regiões Sul e Sudeste formam o maior polo consumidor e exportador de madeira oriunda de plantios florestais.

Segundo Nisgoski, Muñiz e Klock (1998) a madeira de *E. benthamii* apresenta como características gerais cerne e alburno distintos, cerne de cor marrom avermelhada e alburno amarelo rosado, dureza moderada, textura fina a média, grã irregular, cheiro e gosto imperceptíveis, superfície levemente brilhante em luz adequada. Segundo os autores, as características anatômicas do xilema secundário são comuns às espécies da família Myrtaceae, os vasos são visíveis, solitários e arredondados. Apresenta porosidade difusa quanto à disposição em relação aos anéis de crescimento, e arranjo dos poros em diagonal. As células de parênquima axial são distintas somente sob lente, e surgem no lenho de forma paratraqueal vasicêntrico e vasicêntrico confluyente. Os raios são homogêneos, formados apenas por células procumbentes, unisseriados, às vezes localmente bisseriados, e as fibras são libríformes, não septadas, muito curtas a curtas. A densidade básica da madeira e casca de *E. benthamii* encontrada por Higa e Pereira (2003) foram os valores de  $0,477 \pm 0,008$  e  $0,292 \pm 0,006$  g/cm, respectivamente. Esses valores são próximos àqueles relatados para a madeira de *E. saligna* (BRITO et al., 1983).

### 2.3 Seleção de clones

A primeira etapa para produção de mudas clonais envolve a seleção da matriz à idade de corte, isso pode ser feito tanto em plantios seminais heterogêneos, quanto em testes de procedências ou de progênies (ALFENAS; ZAUZA; MAFIA, 2004).

A identificação de indivíduos superiores para a composição das populações de melhoramento requer a definição de critérios eficientes de seleção, de modo a garantir o sucesso do empreendimento (COTTERILL; DEAN, 1990). O processo de seleção das árvores matrizes as quais irão constituir os futuros clones é de vital importância para obtenção de plantios clonais de alta produtividade, resistentes a doenças, pragas e geadas.

A seleção da matriz a campo é baseada em características fenotípicas de interesse para o aumento da produtividade florestal e a melhoria da qualidade da madeira. As árvores matrizes devem agregar os atributos silviculturais desejáveis, portanto, uma planta de padrão superior.

A correta escolha das árvores superiores a serem clonadas deve ser feita de maneira criteriosa, de forma prática e baseando-se em fundamentos científicos, os quais são variáveis em relação à metodologia utilizada para a seleção da espécie, disponibilidade de material genético, tempo, estruturas de apoio e, principalmente, com os objetivos almejados com o processo seletivo (XAVIER, 2003 apud ALMEIDA, 2006).

No processo de seleção em plantios comerciais, implantados com uma mesma espécie, em espaçamento regular e com árvores em uma mesma idade, o processo torna-se mais preciso, principalmente, devido à possibilidade comparativa entre as árvores superiores e da maior frequência das árvores com as características desejadas (XAVIER, 2003 apud ALMEIDA, 2006). Por isso a seleção de árvores superiores nos programas iniciais de clonagem de eucalipto tem sido realizada, principalmente, em plantios seminais comerciais, devido à grande variabilidade genética encontrada, aliado a necessidade de resultados a curto prazo, operacionalidade e eficiência nos processos seletivos.

As matrizes selecionadas e multiplicadas assexuadamente passam a constituir os clones, sendo que esse processo também é conhecido como resgate do material superior. Para tanto, o primeiro passo após seleção da matriz a idade de corte, que é de aproximadamente sete anos para celulose e carvão e, 12 anos para serraria, é a promoção de seu rejuvenescimento para se obter brotos fisiologicamente aptos ao enraizamento (ALFENAS; ZAUZA; MAFIA, 2004). A forma mais simples de reversão à juvenilidade em árvores adultas de eucalipto é a indução de brotos basais (HARTMEY, 1980). De acordo com Hartmann et al. (2011), a maior juvenilidade da região basal deve-se ao fato de que os meristemas basais das plantas formaram-se em épocas mais próximas à germinação da semente que os das regiões terminais.

A possibilidade do uso de testes de progênies para a seleção de árvores superiores, visando à clonagem, tem sido considerada a forma mais adequada e de maior eficiência, principalmente, nas situações em que o programa clonal baseia-se em características de baixa herdabilidade. Os testes de progênies instalados em locais representativos fornecem informações sobre o desempenho e o valor genético das famílias, permitindo selecionar indivíduos dentro das famílias mais produtivas. Porém, a seleção de árvores superiores em testes de progênies e, ou, com controle genético, acarretam maiores investimentos em testes de campo, maior tempo e necessidade de recursos humanos na condução experimental, limitando a sua operacionalidade em grande escala (XAVIER, 2003 apud ALMEIDA, 2006).

Portanto, para formação de uma floresta clonal com alto padrão de produtividade e qualidade, todas as etapas da silvicultura clonal devem ser realizadas de forma criteriosa, as quais incluem desde a seleção da planta matriz, seguida dos processos de clonagem, até a obtenção da floresta clonal. Entretanto, a seleção dos clones é realizada na maioria das vezes na fase adulta, onde a propagação vegetativa encontra limitações, principalmente no que se refere à variação de genótipos entre e dentro das espécies florestais, e da redução gradual da capacidade de enraizamento de estacas, que está associada ao envelhecimento ontogênico (ASSIS, 1997).

## **2.4 Propagação clonal e juvenilidade**

A compreensão da silvicultura clonal visa o entendimento dos princípios específicos da biologia e seus conceitos de multiplicação das plantas. Para as plantas superiores a reprodução pode ser executada de duas formas: sexuada e assexuada. A primeira é caracterizada pela união de gametas (masculino e feminino) onde se obtêm variabilidade genética, enquanto que a segunda utilizam-se propágulos vegetativos como meio de multiplicação, portanto sem variabilidade. Segundo Xavier, Wendling e Silva (2009) as formas de reprodução de plantas podem ter seus elementos de multiplicação conceituados como: semente, elemento de reprodução de plantas que resulta da fecundação e desenvolvimento de óvulo maduro, compreendendo o embrião, as substâncias de reserva e um ou mais tegumentos. Normalmente, é o resultado da recombinação genética entre plantas. Propágulo vegetativo, em geral, é qualquer estrutura que serve para propagação ou multiplicação vegetativa de uma planta, processo esse que representa o elemento de propagação da planta que não envolve recombinação genética, permitindo a reprodução fiel do genótipo da planta.

A propagação vegetativa, pelo processo convencional de estaquia ou pela técnica da micropropagação, facilita a multiplicação de genótipos desejados, esse processo não inclui meiose, portanto, os rametes (brotações originárias da planta matriz) são geneticamente idênticos aos ortetes (planta matriz). Variações fenotípicas entre os rametes dentro de um clone, todavia, existem. As causas das variações são, provavelmente, ambientais e causadas por fatores relacionados ao propágulo, isto é, tamanho da estaca, período que as estacas são coletadas e as condições em viveiro (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000). Portanto, na silvicultura clonal, o termo clone refere-se a um grupo de plantas derivadas assexuadamente de uma mesma planta.

A propagação vegetativa somente é possível devido à competência que determinadas células apresentam para regenerar tecidos, órgãos e plantas. Com o crescimento da árvore essas células têm sua competência em regenerar tecidos e órgãos diminuída, isso torna o processo de reversão a juvenilidade mais difícil.

Em algumas plantas, especialmente lenhosas, há um gradiente de juvenilidade em direção à base da árvore (ELDRIDGE et al., 1994), sendo este variável entre espécies (HACKETT, 1987a), o que promove aumento da maturação em função da maior proximidade com o meristema apical (GREENWOOD; HUTCHISON, 1993). A maior juvenilidade da região basal das plantas se deve ao fato dos meristemas mais próximos da base, formarem-se em épocas mais próximas à germinação do que os das regiões terminais (HARTMANN et al., 2011).

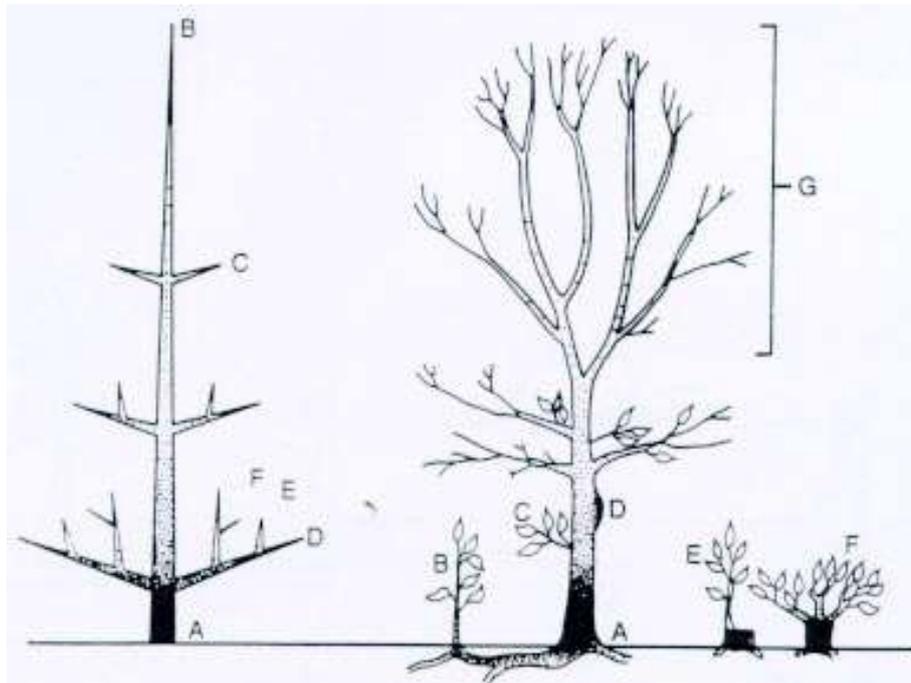


Figura 2 – Gradientes de juvenilidade-maturidade que se inicia quase na base da árvore. Esquerda: o gradiente do estado juvenil em  $A > F > E > D > C > B$ . Direita: o gradiente do estado juvenil em  $A > G$ ; B: broto originário de raízes adventícias; C: brotos epicórmicos; D: esferoblastos (adventícias); E - F: brotação de touças, onde B - F representam brotações juvenis. (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000a)

O ciclo de vida de muitas plantas se relaciona às fases juvenil e adulta, nas quais as características anatômicas, fisiológicas, bioquímicas e morfológicas são distintas, afetando sensivelmente a propagação vegetativa das plantas (BOLIANI, 1986; HARTMANN et al., 1997). Após a germinação, a planta inicia uma fase de crescimento vegetativo vigoroso, durante a qual, a iniciação floral e a floração não podem ser induzidas, mesmo que as condições externas sejam favoráveis (SALISBURY; ROSS, 1978).

Segundo Fouda (1996), folhas de ramos juvenis apresentam forma mais cônica, a epiderme é recoberta por uma fina camada de cutícula e apresenta alta densidade estomática, mesofilo espesso com ductos de resina menores e em menor concentração do que em folhas adultas; ramos juvenis apresentam córtex, floema, zona cambial, medula e raios do xilema e floema mais espessos do que aqueles adultos. O estado juvenil possibilita o maior crescimento vegetativo da planta e a produção de grande superfície foliar, necessária e importante para a captação de energia solar indispensável à fotossíntese, facilitando a absorção de água e íons do solo (BOLIANI, 1986). Segundo Greenwood e Hutchison (1993), o envelhecimento ontogenético proporciona maior resistência foliar à penetração de fungos. Em contrapartida há uma perda da capacidade de enraizamento adventício.

Com o avanço da idade, a planta ou o órgão tende à senescência e morte, o meristema apical maduro de plantas pode ter sua juvenilidade restaurada, ou seja, rejuvenescida. Segundo Hackett e Murray (1993), as características de maturação é função da sua relativa estabilidade e são transmitidas por meio das divisões celulares de uma geração somática para a próxima.

Em programas de estabelecimento de bancos de germoplasma ou de melhoramento genético, a juvenilidade do material vegetal pode ser a chave do sucesso (BREESE, 1989; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000a), principalmente ao considerar as espécies lenhosas, pois a aptidão à propagação vegetativa está associada ao grau de maturação do material utilizado (HARTMANN et al., 2011).

Uma das mais consistentes expressões da maturação em plantas lenhosas tem sido a transição da alta para a baixa capacidade de enraizamento de estacas caulinares e foliares (HACKETT, 1987a). Para algumas espécies lenhosas, (ZOBEL; TALBERT, 1984) verificaram que estacas de mudas juvenis, provenientes de sementes, enraízam facilmente, enquanto outras, provenientes de plantas mais velhas enraízam esporadicamente, ou não enraízam.

Portanto, para o sucesso do processo de propagação clonal, a coleta de propágulos vegetativos provenientes das partes da planta que apresentam características juvenis constitui-se um pré-requisito de extrema importância. Entretanto, na silvicultura clonal, a maioria das árvores não apresenta brotações com as características juvenis, limitando esse procedimento. Como alternativas, técnicas que visam a indução de brotações nas partes que retêm essas características juvenis, constituem-se como o primeiro passo para obtenção de propágulos vegetativos adequados ao processo de propagação clonal (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

A propagação clonal pode ser alcançada tanto pela macropropagação, quanto pela micropropagação. A propagação vegetativa via macropropagação envolve métodos convencionais, como a estaquia e a enxertia, enquanto que a micropropagação é realizada através da técnica da cultura de tecidos (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000a).

#### **2.4.1 Estaquia**

A estaquia é uma técnica que consiste em promover o enraizamento de partes da planta, podendo ser de ramos, raízes, folhas e até mesmo fascículos, como em *Pinus* spp. (PAIVA; GOMES, 1995). O enraizamento de estacas envolve a regeneração de meristemas radiculares diretamente a partir dos tecidos associados com o tecido vascular, ou a partir do tecido caloso formado na base da estaca, sendo a indução da regeneração radicular função da espécie, do genótipo e do nível de maturação da planta doadora (MALAVASI, 1994).

As brotações para a estaquia podem ser colhidas no campo, no caso de árvores selecionadas em plantios comerciais, ou no jardim clonal, que representa a segunda etapa do processo. As estacas permanecem na casa de vegetação por um período de 20 a 45 dias, dependendo da região, da época do ano e da espécie envolvida. Quando estiverem enraizadas, estas serão aclimatadas em casa de sombra e, em seguida, transferidas para um local de pleno sol, onde completarão seu desenvolvimento e receberão os tratamentos finais antes de serem levadas ao campo. Normalmente, as mudas produzidas por enraizamento de estacas estão aptas a serem plantadas dos 90 aos 120 dias de desenvolvimento (WENDLING, 1999; TITON, 2001).

Um dos maiores problemas relacionados à estaquia, consiste na obtenção de brotos que apresentam competência à rizogênese. Essas características estão diretamente relacionada com, a origem genética da planta-mãe e ao grau de juvenilidade em que se encontram as

brotações que serão utilizadas para a estaquia. Quanto mais adulto o material, menor será seu grau de juvenildade e, conseqüentemente, menor sua competência rizogênica.

Como o genótipo a ser reproduzido provém, via de regra, de indivíduos maduros, o desafio inicial do processo é estabelecer a obtenção de um grau de juvenildade das estacas que favoreça o enraizamento e o posterior desenvolvimento. Devido a essas dificuldades de propagação vegetativa encontradas em algumas espécies, principalmente no que envolve material adulto e variação entre genótipos (ASSIS, 1997), houve a necessidade de serem desenvolvidas outras técnicas como a miniestaquia, micropropagação, enxertia e estaquia seriadas no intuito de melhorar o grau de juvenildade, aumentando os índices de enraizamento e melhorando o desenvolvimento das mudas em campo.

O efeito da estaquia seriada em *Eucalyptus* spp. foi observada por (ELDRIDGE et al., 1994), que ao confeccionarem estacas de brotações a partir de estacas enraizadas, notaram efeitos positivos sobre o enraizamento, consequência do rejuvenescimento. O reaparecimento de características morfológicas juvenis e melhoria no enraizamento de estacas pelo uso da estaquia seriada também foram mencionados por Bonga e Aderkas (1993).

#### **2.4.2 Micropropagação**

O rejuvenescimento pela micropropagação vegetal consiste, basicamente, no cultivo *in vitro*, sob condições assépticas e controladas, de propágulos vegetativos denominados de explantes, os quais na presença de reguladores de crescimento e meio nutritivo adequado, são induzidos a produzirem novas gemas que serão então multiplicadas nestas mesmas condições, a cada novo ciclo de cultivo (HARTMANN et al., 2011). Na micropropagação, a alta taxa de multiplicação acelera os programas de propagação clonal e possibilita a clonagem de híbridos de *Eucalyptus* de alto valor e difícil enraizamento (BRONDANI et al., 2009).

Estudos indicam que as características relacionadas a maturação podem ser modificadas por meio da cultura *in vitro* (BONGA; VON ADERKAS, 1992; HACKETT; MURRAY, 1993). Para *Eucalyptus* spp., a literatura tem mostrado que o potencial de enraizamento e vigor dos propágulos de árvores maduras aumentam com os sucessivos subcultivos *in vitro* (HACKETT, 1987a; XAVIER; COMÉRIO, 1996). Segundo Bonga e Aderkas (1993), a técnica da micropropagação é eficiente no rejuvenescimento de propágulos maduros após cinco a seis subcultivos. Entretanto, (ASSIS, 1996) menciona que a técnica produz melhores efeitos somente após o décimo subcultivo. Essas diferenças com relação ao subcultivo, provavelmente ocorrem em decorrência de serem espécies diferentes e com diferentes idades.

Francllet et al. (1987) ressaltam, no entanto, que o principal fator de rejuvenescimento pela micropropagação é o tempo de exposição dos explantes a citocinina BAP (benzilaminopurina). Assim, menores períodos entre um subcultivo e outro podem aumentar o rejuvenescimento, dessa forma, podemos inferir que mais importante que a quantidade de subcultivo, é a habituação dos explantes ao meio de cultura.

Um dos fatores mais críticos dessa técnica refere-se à fase de introdução e estabelecimento *in vitro* de explantes em razão dos altos níveis de contaminação dos tecidos, inclusive por bactérias endógenas, as quais são difíceis de serem eliminadas (NIEDZ; BAUSHER, 2002; WATT et al., 2003). Grattapaglia e Machado (1998) destacaram que a maior dificuldade dessa etapa reside em se obter tecido descontaminado, sem conduzi-lo à morte quando isolado, em que os pré-tratamentos aplicados à planta-matriz são determinantes para o sucesso do empreendimento. Ainda segundo esses autores, várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes, destacando-se o etanol e os compostos à base de cloro. De acordo com George (1993) a concentração e o tempo de exposição aos desinfetantes dependem do material vegetal e diferentes partes da planta, apresentando respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos.

Outro problema que ocorre durante a fase de introdução é a oxidação dos explantes. Segundo George, Hall e De Klerk (2008) isso se deve ao fato que algumas plantas, particularmente espécies tropicais, contêm altas concentrações de substâncias fenólicas que são oxidadas quando as células são injuriadas ou senescentes, o tecido isolado torna-se marrom ou preto e não cresce. A oxidação leva ao aumento na formação de radicais livres que segundo BENSON (2000), são responsáveis por danos irreparáveis ao DNA, proteínas e enzimas, causando disfunção celular, levando a morte do explante.

Portanto, a seleção de uma planta-matriz e de um explante é condição fundamental para orientar os padrões de morfogênese (THORPE, 1980). Murashige (1974) relatou vários fatores que devem ser considerados nesta seleção, tais como o órgão da planta a ser utilizado como fonte de explante, a idade fisiológica, a época do ano em que é feita a coleta e as condições gerais da planta doadora.

Após o estabelecimento dos explantes, as brotações passam para meio de multiplicação na presença de citocininas, as quais são indispensáveis para a quebra de dominância apical e indução e proliferação de gemas axilares, considerando que o tipo de citocinina e

concentrações caracterizam os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro* (BRONDANI et al., 2009).

Para finalidades de micropropagação clonal, a formação de calos é indesejável uma vez que a constituição cromossômica deste material é, em geral, instável, podendo originar variantes genéticas, por meio do processo denominado variação somaclonal (LARKIN; SCOWCROFT, 1981). Neste caso, o período de crescimento desorganizado deve ser o menor possível, ou preferencialmente eliminado (STREET, 1975; MURASHIGE, 1977).

Segundo Assis (1996) e Xavier e Comério (1996) a microestaquia é uma técnica de propagação vegetativa na qual são utilizados propágulos (microestacas) rejuvenescidos em laboratório de micropropagação para serem posteriormente enraizados, visando à obtenção de mudas. É baseada no máximo aproveitamento da juvenilidade dos propágulos vegetativos.

Como qualquer outra técnica de propagação de plantas, a microestaquia também apresenta vantagens e desvantagens quando comparada à técnica da estaquia convencional de *Eucalyptus* spp. Entre as principais vantagens podem-se destacar maiores índices de enraizamento (IANNELLI et al., 1997; ASSIS, 1997), a supressão de gastos com jardins clonais (COMÉRIO; XAVIER; IANNELLI; 1996; ASSIS, 1996), a melhoria da qualidade do sistema radicular (GOMES, 1987) em termos de vigor, uniformidade, volume, aspecto e formato (IANNELLI et al., 1997); a maior taxa de crescimento e sobrevivência das mudas no campo (COMÉRIO; XAVIER; IANNELLI; 1996; XAVIER et al., 1996b); a não necessidade da aplicação de reguladores de crescimento para enraizamento (ASSIS, 1996, 1997; XAVIER; COMÉRIO; 1996), a maior homogeneidade dos plantios comerciais e, conseqüentemente, a maior produtividade e qualidade florestal (COMÉRIO; XAVIER; IANNELLI, 1996). Entre as desvantagens, destaca-se a maior sensibilidade das microestacas às condições ambientais (ASSIS, 1996b, 1997), havendo ainda uma carência de estudos nesta área. Outra limitação da técnica de microestaquia, segundo Assis (1996, 1997), Comério et al. (1996) é a necessidade de mudas rejuvenescidas pela micropropagação, que é dependente, portanto, da existência de laboratório de cultura de tecidos, o que pode onerar a produção de mudas, além de sua limitação no caso de genótipos recalcitrantes ou com dificuldade de descontaminação.

### 2.4.3 Enxertia

Essa técnica de propagação consiste na união de partes de uma planta em outra que lhe sirva de suporte e estabelecimento de comunicação com o sistema radicular, de forma que as duas partes de plantas diferentes passem a constituir apenas uma única, entretanto, que o nível genotípico de cada uma delas mantenha sua individualidade, sendo a técnica utilizada principalmente em espécies de difícil enraizamento (KALIL FILHO et al., 2001).

A enxertia é constituída pelo enxerto, o qual é sempre representado por uma parte da planta que se pretende multiplicar, ao passo que o porta-enxerto é aquele que recebe o enxerto e, geralmente, é uma planta jovem, com adequada taxa de crescimento, proveniente de sementes ou de estacas, bastante rústica e resistente a pragas e doenças. Esse conjunto, através da regeneração de tecidos, passa a formar uma única e nova planta (WENDLING et al., 2005).

O sucesso de enxertia é fundamentalmente composto por três eventos básicos: adesão entre as partes (enxerto e porta-enxerto); proliferação de calo entre as partes; e diferenciação vascular, unindo as duas partes enxertadas (HARTMANN et al., 2011). Dessa forma, após o preparo do porta-enxerto e do enxerto, estes são unidos, visando manter o contato entre as zonas cambiais. Kramer e Kozlowski (1971) destacam a necessidade da coincidência da região cambial entre o enxerto e porta-enxerto em pelo menos um dos lados.

Os porta-enxertos podem ser originados de sementes ou estacas enraizadas, os quais influenciam o desenvolvimento e crescimento da planta enxertada. O porta-enxerto de origem seminal possui vantagens como a simplicidade e economia na produção, baixo risco de transmissão de vírus para o enxerto, apresenta sistema radicular pivotante o que possibilita melhor fixação no solo da planta enxertada, além das características juvenis estarem presente no porta-enxerto, o que permite maior êxito na enxertia. Como desvantagem, destaca-se a existência da variabilidade genética entre os porta-enxertos, o que pode levar a uma variabilidade de respostas no crescimento e desempenho das plantas enxertadas (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

A enxertia não induz ao rejuvenescimento e, dessa maneira, mantém as mudas produzidas com a mesma idade fisiológica da planta matriz, inclusive com o estímulo para o florescimento (ALFENAS et al., 2004). No entanto, quando se utiliza a técnica de forma seriada, ou seja, repetindo o processo de enxertia de uma única planta repetida vezes, se torna para, Huang et al. (1990), o mais consistente e extensivo método aplicado para

rejuvenescimento de plantas ou partes maduras destas. Entretanto, não se tem um número exato para que ocorra o rejuvenescimento, pesquisas têm apontado para uma variação de duas a seis re-enxertias na dependência da espécie (ASSIS, 1996; ELDRIDGE et al., 1994).

São apontadas como desvantagens o alto grau de rejeição, a dificuldade de pegamento de algumas espécies, a possibilidade de transmissão de doenças e a diminuição do tempo de vida das plantas (WENDLING et al., 2005). Segundo Eldridge et al. (1994) o método de rejuvenescimento pela enxertia é considerado caro, pois demanda muito tempo, além de apresentar problemas de incompatibilidade.

Segundo Hartmann et al. (2011), os sintomas de incompatibilidade podem ser: falha no pegamento dos enxertos, morte prematura da planta (de um a dois anos após enxertia), crescimento anormal da planta, crescimento diferenciado entre enxerto e porta-enxerto, diferenças na iniciação do crescimento vegetativo sazonal e crescimento exagerado acima ou abaixo da união do enxerto com o porta enxerto.

Para que a enxertia tenha sucesso alguns requisitos são essenciais, como a afinidade entre as plantas (devem ter o maior grau de parentesco possível), semelhanças em relação à fisiologia, anatomia, consistência do tecido porte e vigor, plantas vigorosas, condições ambientais durante a enxertia (época do ano, temperatura, umidade e vento), contaminação por pragas e doenças, amarrão e habilidade do enxertador (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

#### **2.4.4 Brotações epicórmicas**

O uso do corte raso das árvores selecionadas para emissão de brotações juvenis é o método mais adotado em escala comercial para o resgate de árvores adultas em *Eucalyptus* spp. Esse método, porém, não pode ser aplicado em espécies com dificuldade de rebrota e, ou protegidas do corte raso. Neste caso o uso das brotações epicórmicas é uma alternativa potencial para o resgate de material adulto, onde é realizada a coleta de galhos ou ramos, os quais são colocados em condições ambientais adequadas para a emissão das brotações e, ao atingirem tamanho adequado, são estaqueadas e, ou, enxertadas para a formação de mudas. (XAVIER; SANTOS, 2002; ROSA et al., 2003). A técnica de resgate vegetativo de material adulto por brotações epicórmicas está sendo estudada desde os anos 70. Segundo Chaperon e Quillet (1977) é possível favorecer o desenvolvimento e crescimento das brotações epicórmicas, resgatando assim as características juvenis do material adulto, o que permite a propagação sem a necessidade de se efetuar o corte raso das plantas-matrizes.

A eficiência de obtenção de brotações epicórmicas a partir de ramos de árvores adultas para o resgate vegetativo foi avaliada por Rosa, Wendling e Souza Júnior (2003) e Almeida (2004) para *Ilex paraguariensis*, e *Eucalyptus cloeziana*, respectivamente, os quais concluíram que a técnica se mostrou viável.

O princípio fisiológico do método é baseado na alteração do equilíbrio entre reguladores de crescimento (auxina/citocinina) em favorecimento da emissão de brotações epicórmicas. É importante ressaltar que os ramos coletados das porções mais baixas da planta tendem a originar brotações mais juvenis, com maior capacidade rizogênica em virtude do maior grau de juvenilidade (ALFENAS; ZAUZA; MAFIA, 2004).

Na maioria das árvores angiospermas, as gemas epicórmicas dormentes estão presentes na casca externa, onde poderiam ser mortos pelo fogo. Em contrapartida, em eucaliptos essas gemas estão localizadas no nível do câmbio vascular, que é protegido pela espessura da casca. Isto pode explicar a capacidade pronunciada de eucaliptos para a produção de brotos epicórmicos após fogo intenso. As gemas têm origem a partir de tecido meristemático (BURROWS, 2002).

#### **2.4.5 Anelamento**

A técnica do anelamento começou a ser estudada na silvicultura com a finalidade de aumentar o tempo de produção de sementes e, na fruticultura, para melhorar a cor e aumentar ou induzir a precocidade de frutos (POWELL; HOWELL, 1981), consistindo basicamente na retirada de um anel de casca do caule ou galhos (COHEN, 1981). Esta prática foi testada por alguns pesquisadores, como Alonso et al. (2002) em *Pinus pinaster*, e Ribeiro et al. (1992) em *Eucalyptus grandis* para obtenção de estacas juvenis.

De acordo com Alfenas et al. (2004), esta técnica é de fácil execução e, na maioria dos casos, resulta em bons resultados. Em plantas de eucalipto no campo, faz-se a incisão de cerca de 1-2 cm de espessura em torno da circunferência do caule, na base da árvore a cerca de 10-15 cm de altura em relação ao solo. O anelamento é feito a uma profundidade suficiente, para que não danifique o lenho, e, após aproximadamente 20 dias, é possível observar brotações sendo emitidas na região inferior da incisão, e aos 45-50 dias é possível coletar estas brotações para a extração das estacas.

O princípio fisiológico do método de anelamento consiste na alteração dos níveis endógenos dos componentes químicos envolvidos, dentre outros processos, no enraizamento

adventício, sendo eles, principalmente, os reguladores de crescimento (auxina/citocinina). As auxinas que são sintetizadas em regiões de crescimento ativo como primórdios foliares e folhas jovens, além das sementes em desenvolvimento (FACHINELLO et al., 1995; RAVEN et al., 1996), apresentam um movimento basípeto até o coleto da planta e acrópeto do coleto até o ápice das raízes. Por sua vez, as citocininas, que são biossintetizadas, principalmente nas raízes, apresentam um movimento basípeto até o coleto e acrópeto até o ápice dos ramos (TAIZ et al., 2006). Assim, o anelamento aumenta a concentração de substâncias promotoras de brotações como as citocininas, imediatamente, após o anel de casca retirado, acompanhado pela redução da concentração de auxina neste ponto, uma vez que seu transporte via floema é interrompido pela retirada do anel de casca, causando um desbalanço auxina/citocinina favorável à emissão de brotações (ZIMMERMANN; BROWN, 1974). Segundo estes mesmos autores, a mudança abrupta de concentração de auxina e citocinina levam a uma atividade do meristema apical causando o alongamento das gemas dormentes abaixo do anelamento.

A prática do anelamento na planta previamente a retirada da estaca é uma forma de condicionamento que pode trazer aumentos significativos na percentagem de estacas enraizadas, pois o anelamento promove um bloqueio do movimento descendente de carboidratos e os demais cofatores envolvidos no processo de enraizamento (FACHINELLO, 1986). A técnica se mostra uma ferramenta importante na clonagem de árvores adultas, pois possibilita a obtenção de material fisiologicamente juvenil (gemas epicórmicas basais) ou com rejuvenescimento da habilidade de formar raízes em material adulto (HARTNEY, 1980).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Origem e seleção do material

Vinte árvores de *E. benthamii* de um plantio seminal com 13 anos de idade, localizado no município de Sengés-PR (latitude 24°06'46" sul e a uma longitude 49°27'50" oeste e altitude de 623 metros), pertencente à empresa Valor Florestal, foram selecionadas. As melhores qualidades silviculturais, como altura, diâmetro a altura do peito (DAP), retidão do caule (menor fator de forma) e sanidade, foram usadas como parâmetro de seleção. As matrizes foram marcadas com tinta para facilitar a visualização dentro do talhão e identificadas com numeração de 1 a 20 em etiquetas, as quais foram amarradas com arame (figura 3).



Figura 3 - Vista da floresta de *E. benthamii*, onde se retirou material para os experimentos (A); Detalhe da etiqueta amarrada com arame, para identificação das matrizes (B)

Para obtenção de diferentes tipos de brotos, realizaram-se duas coletas. A primeira foi realizada entre o final do verão e início do outono de 2011, onde brotações do topo das árvores, e galhos (mega estaca) foram coletados. A segunda foi feita no inverno de 2011, e coletaram-se as brotações provenientes do anelamento realizado na primeira coleta, e também das brotações que surgiram no local da retirada dos galhos (brotações do ano).

### 3.1.1 Brotações dos primeiros galhos da copa

Foram coletados galhos das matrizes selecionadas, que continham 100 ramos com aproximadamente três estacas. Os ramos foram armazenados em sacos plásticos de 60 L contendo jornal umedecido com água autoclavada, a fim de se reduzir o estresse hídrico provocado pela evapotranspiração e manter a turgescência dos tecidos, durante o transporte até o laboratório de Fisiologia de Árvores - LAFISA, USP/ESALQ em Piracicaba-SP (figura 4).



Figura 4 - Brotações dos primeiros galhos da copa de *E. benthamii*, destacados (A); Saco plásticos de 60 L contendo jornal umedecido com água, foi utilizado para o transporte do material coletado

### 3.1.2 Brotos do anelamento

Realizaram-se duas secções transversais no tronco de todas as matrizes com o auxílio de uma serra de poda manual, o primeiro corte a 20 cm e o segundo a 40 cm do nível do solo. Posteriormente, com o auxílio de um formão, removeu-se um anel de 20 cm de largura entre as linhas seccionadas, tomando cuidado para não danificar o lenho. Transcorrido 90 dias após o anelamento, as brotações foram coletadas, sendo acondicionadas em caixas de polietileno contendo água e jornal para o transporte até LAFISA - USP/ESALQ em Piracicaba-SP (figura 5).



Figura 5 - Detalhe do anelamento realizado, 20 cm de largura (A); Brotações emitidas após 90 da realização do anelamento

### 3.1.3 Brotações epicórmicas

A coleta da megaestaca foi realizada através da poda dos galhos mais baixos da copa das árvores, para minimizar os efeitos da idade ontogenética. Após serem cortados foram acondicionados em sacos de polietileno para evitar perda água durante o transporte até o LAFISA - USP/ESALQ em Piracicaba-SP. Logo após sua chegada foram imediatamente acondicionados em casa de vegetação com temperatura variando entre 22 a 28°C e umidade relativa do ar acima de 80% controlada por nebulização intermitente. Os ramos foram serrados em segmentos (megaestacas) de 50 cm de comprimento (diâmetro variando de 12 a 18,5 cm) e em seguida foram dispostos verticalmente em vasos contendo areia. Semanalmente aplicou-se fungicida a base de Tiofanto Metílico (1.000 mg L<sup>-1</sup>), a fim de evitar infestações por fungos, obtendo-se assim, maior controle fitossanitário das brotações para as demais etapas de propagação. Transcorrido 60 dias foi observada a emissão das primeiras brotações epicórmicas (zonas meristemáticas), as quais foram contadas, assim como o número de gemas por zona meristemática, correlacionando-as com o diâmetro da megaestaca, para se verificar um possível efeito do diâmetro em relação ao número de brotos emitidos. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, contendo cinco repetições (megaestaca) por clone, totalizando 100 megaestacas (figura 6).



Figura 6 - Disposição das megaestacas em vasos com areia e sob aspersão (A); Início da emissão de brotos da megaestaca (B)

### 3.1.4 Brotos oriundos da poda dos galhos da copa

As brotações emitidas na região onde se realizou o corte do galho para coleta das megaestacas, foram seccionadas e armazenadas em sacos plásticos de 60 L contendo jornal umedecido com água autoclavada, a fim de se reduzir o estresse hídrico provocado pela evapotranspiração e manter a turgescência dos tecidos das estacas até o local de preparo, no LAFISA – USP/ESALQ (figura 7).



Figura 7 – Brotações emitidas no local onde se realizou a coleta das megaestaca

## 3.2 Estaquia

Utilizaram-se para a estaquia cinco tipos de brotos (do topo, do anelamento, do ano, da megaestaca e brotações alongadas *in vitro*), e dois ambientes de enraizamento (miniestufa e casa de vegetação tradicional), com o objetivo de se avaliar o melhor ambiente de enraizamento para cada tipo de broto e clones.

### 3.2.1 Brotações dos primeiros galhos da copa

Estacas provenientes das brotações do topo com  $12\pm 2$  cm de comprimento foram selecionadas. Apenas um par de folhas foi mantido, com redução de 50% da sua área total descartando as ponteiros, com a realização de um corte em bisel em sua região basal. Para assepsia das estacas utilizou-se um balde contendo água onde foram lavadas, e logo em seguida mergulhadas durante 5 minutos em hipoclorito de sódio (20% em água) e Tween 20 (0,05% v/v). Foram novamente lavadas em outro balde contendo apenas água. Posteriormente a base das estacas foi submetida ao tratamento com fungicida (*Benomyl* 500 mg L<sup>-1</sup>) por 15 minutos, tendo por fim a região basal imersa por 10 segundos, em solução hidroalcoólica (água: álcool, 1:1, v/v) contendo 8.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, conforme Brondani (2008). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas no tempo, testando-se vinte clones, com dez repetições e vinte estacas para a composição de cada repetição.

### 3.2.2 Brotos do anelamento

As estacas provenientes do anelamento com  $12\pm 2$  cm de comprimento foram selecionadas, tiveram as folhas reduzidas a 50% de sua área total, sendo realizado um corte em bisel na porção inferior, e em seguida a região basal foi imersa por 10 segundos em solução hidroalcoólica (água: álcool, 1:1, v/v) contendo 8.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB, conforme Brondani (2008). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas no tempo, testando-se vinte clones, com dez repetições e três estacas para a composição de cada repetição.

### 3.2.3 Megaestaca

Brotos provenientes das megaestacas com  $4\pm 2$  cm de comprimento foram coletados para a confecção das estacas. Realizou-se um corte em bisel na porção inferior, e em seguida a região basal foi imersa por 10 segundos em solução hidroalcoólica (água: álcool, 1:1, v/v) contendo 2.000 mg L<sup>-1</sup> de AIB. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente

casualizado com parcelas subdivididas no tempo, testando-se vinte clones, com dez repetições e três estacas para a composição de cada repetição.

### **3.2.4 Brotos oriundos da poda dos galhos da copa**

As estacas provenientes de brotos da poda de galhos da copa com comprimento de  $8\pm 2$  cm, contendo um par de folhas reduzidas a 50% da sua área total, sendo realizado um corte em bisel na porção inferior, desprezando a ponteira. Para assepsia das estacas utilizou-se um balde contendo água onde foram lavadas, e logo em seguida mergulhadas durante 5 minutos em hipoclorito de sódio (20% em água) e Tween 20 (0,05% v/v), e novamente lavadas em outro balde contendo água. Posteriormente a base das estacas foi submetida ao tratamento com fungicida (*Benomyl* 500 mg. L<sup>-1</sup>) por 15 minutos, tendo por fim a região basal imersa por 10 segundos, em solução hidroalcoólica (água: álcool, 1:1, v/v) contendo 8.000 mg. L<sup>-1</sup> de AIB, conforme Brondani (2008). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas no tempo, testando-se vinte clones, com dez repetições e vinte estacas para a composição de cada repetição.

### **3.2.5 Microestacas**

Brotações alongadas *in vitro* de cada clone com tamanho de aproximadamente 1 cm, foram coletadas em câmara de fluxo laminar com auxílio de tesoura e transferidas para placas de petri contendo água autoclavada. Posteriormente, realizou-se a inserção no substrato de cultivo e acondicionadas em mini-estufa, sem adição de regulador de crescimento. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas no tempo, testando-se vinte clones, com dez repetições e três estacas para a composição de cada repetição.

### **3.2.6 Condições de enraizamento**

As estacas foram dispostas para o enraizamento em dois ambientes distintos. O primeiro em casa de vegetação (com umidade relativa do ar maior que 80% a partir de nebulização intermitente, e temperatura do ar de  $33\pm 5^{\circ}\text{C}$ ), utilizou-se tubetes plásticos de forma cônica de 55 cm<sup>3</sup>, contendo substrato comercial a base de casca de pínus e vermiculita média (2:1). Após 45 dias, as estacas foram transferidas para casa de vegetação com sombrite 50% para aclimação (casa de sombra), onde permaneceram por 15 dias, sendo a irrigação feita por microaspersores com pressão de água da rede (2 kg cm<sup>-2</sup>) e controlado por timer em intervalos pré-estabelecidos. Após o processo de aclimação, transferiram-se as estacas para uma área de pleno sol, visando a rustificação e crescimento. O segundo local foi constituído

de uma bandeja (com 11 x 5 cm) com o mesmo tipo de substrato, sobre uma base (prato de vaso), uma armação de arame e um saco plástico transparente fechado (mantendo-se a umidade próxima a 100%). A mini-estufa foi acondicionada em local com sombra, e protegido com sombrite 80%, evitando-se elevadas temperaturas. Semanalmente, aplicou-se fungicida à base de Tiofanto Metílico (1.000 mg L<sup>-1</sup>), a fim de evitar-se a contaminação fúngica. Após 30 dias, iniciou-se o processo de aclimatização, com a abertura do saco plástico, aos 45 dias as estacas enraizadas foram retiradas do sistema de mini-estufa e repicadas para tubetes, foram transferidas para casa de vegetação com sombrite 50% para aclimatação (casa de sombra), onde permaneceram por 30 dias, sendo a irrigação realizada por microaspersores com pressão de água da rede (2 kg cm<sup>-2</sup>) e controlado por timer em intervalos pré-estabelecidos. Após o esse processo, transferiram-se as estacas para uma área de pleno sol, visando a rustificação e crescimento. A porcentagem de enraizamento e sobrevivência foi avaliada aos 45 dias após estaqueamento. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas no tempo, testando-se vinte clones, cinco tipos de estacas, e dois locais de enraizamento (figura 8).

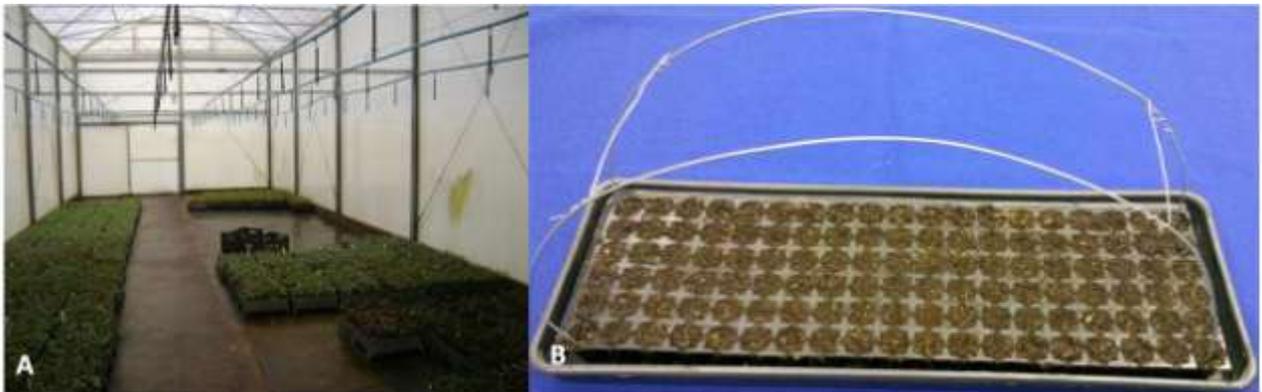


Figura 8 - Casa de vegetação com aspersão intrermitente (A); Mini estufa pronta para estaquia, sendo recoberta por plástico transparente, para manutenção da umidade

### 3.3 Enxertia

Utilizaram-se como enxertos as brotações do topo, do ano e do anelamento, objetivando-se avaliar o melhor broto para o pegamento dos enxertos. O porta-enxerto utilizado foi composto por mudas de *E. benthamii*, as quais foram produzidas por semente, possuindo assim, melhor qualidade do sistema radicular e potencial para a cicatrização dos

tecidos. A técnica de enxertia utilizada foi a garfagem, que consiste em um corte longitudinal central na extremidade superior do porta-enxerto (cavalo) e um corte em forma de cunha na porção terminal inferior do enxerto (cavaleiro) os cortes foram executados com o auxílio de canivetes bem afiados e deixando sempre úmidas as extremidades dos tecidos vegetativos (WENDLING et al., 2005). Os tecidos foram unidos com o uso de um fitilho biodegradável, justapondo o enxerto com o porta-enxerto. Logo após foram envolvidos por um saco plástico transparente (para manter a umidade elevada) e por fim por um saco de papel opaco (evitar a passagem de luz, evitando-se possível oxidação dos tecidos). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas no tempo, testando-se vinte clones, três tipos de brotos, com dez repetições sendo dois enxertos para a composição de cada repetição, avaliou-se o pegamento dos enxertos.

### **3.4 Micropropagação**

#### **3.4.1 Meio de cultura e condições *in vitro***

Os meio de culturas utilizados foram MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) para o estabelecimento da cultura e WPM para sub cultivos posteriores, adicionou-se as auxinas ANA e AIB e a citocinina BAP, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, e sacarose 20 e 30 g L<sup>-1</sup> (dependendo do estágio de desenvolvimento). O valor do pH foi ajustando para 5,8 com HCl (0,1M) ou KOH (0,1M) previamente a adição do ágar ao meio nutritivo, e posteriormente autoclavado a temperatura de 121°C ( $\approx 1,0 \text{ kgf cm}^{-2}$ ) durante 20 minutos. Os explantes foram cultivados em sala de crescimento com temperatura mantida a 25°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , fornecidas por duas lâmpadas fluorescentes, branca fria, com 110 w cada localizada a 30 cm de nível em cada prateleira.

#### **3.4.2 Introdução *in vitro***

A introdução *in vitro* dos segmentos nodais foi realizada por meio de quatro tipos diferentes de explantes: (i) a partir de brotações do topo da árvore, (ii) brotações emitidas na região de abscisão dos galhos (brotações do ano), (iii) das brotações basais provenientes do anelamento das matrizes e (iv) brotações epicórmicas das megaestacas. Em todos os casos os explantes consistiram de segmentos nodais da porção mediana das brotações com as folhas removidas, contendo um par de gemas axilares, e tamanho médio de 1,5 cm.



Figura 9 - Segmentos nodais da porção mediana da brotação com as folhas removidas, contendo um par de gemas axilares (A); Explante estabelecido, e com as gemas axilares se desenvolvendo (B)

A assepsia dos explantes se deu primeiramente por imersão em solução de álcool a 70% (v/v) por 10 segundos, sendo enxaguados com água deionizada e autoclavada. Em seguida foram submetidos à solução com fungicida Tiofanato de Metílico ( $1.000 \text{ mg L}^{-1}$ ) por 15 minutos, enxaguados com água deionizada e autoclavada e finalmente imersos em solução com de 1,0% (v/v) de cloro ativo ( $\text{NaOCl}$ ) acrescida de duas gotas de Tween 20 (0,05% v/v) durante 5 minutos. Ao final do tratamento, foram enxaguados por três vezes com água deionizada e autoclavada no interior da câmara de fluxo laminar e inoculados verticalmente em recipientes de vidro com  $7 \times 3 \text{ cm}$ , contendo  $7 \text{ mL}$  do meio de cultura MS. Especificamente para os explantes provenientes das brotações (iv) epicórmicas das megaestacas, a assepsia foi mais branda, o tempo de exposição ao fungicida Tiofanato de Metílico foi de 5 minutos apenas, devido ao tecido ser mais tenro e porque as condições de cultivo permitir um controle fitossanitário mais eficiente dos tecidos.

Aos 30 dias após a inoculação consideraram-se estabelecidos os explantes que não apresentarem contaminação e nem oxidação, além de ter as gemas axilares desenvolvidas.

### 3.4.3 Multiplicação

Após 30 dias da inoculação dos explantes, realizou-se o primeiro subcultivo das brotações desenvolvidas *in vitro* oriundas das gemas axilares dos segmentos nodais. As brotações foram transferidas para frasco (transparente  $9 \times 6 \text{ cm}$ ) contendo  $40 \text{ mL}$  do meio de cultura WPM (BRONDANI, 2012) suplementado com  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $0,50 \text{ mg L}^{-1}$  de

benzilaminopurina (BAP) e 0,050 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA). Sendo renovado o meio de cultura a cada 28 dias.

#### **3.4.4 Alongamento**

Após o período de multiplicação, microcepas contendo 10 gemas foram transferidas para meio de cultura WPM, suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB. As gemas foram consideradas alongadas após o segundo sub cultivo nesse meio (aproximadamente 56 dias), essas foram então coletadas semanalmente em camara de fluxo laminar com o auxilio de tesoura e estaqueadas *ex vitro* em substrato de cultivo e acondicionadas em miniestufa (como descrito no item 2.2.2.6), sem adição de regulador de crescimento. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas no tempo, testando-se vinte clones, com dez repetições e três estacas para a composição de cada repetição.

#### **3.4.5 Formação de mini e microjardim clonal**

O estabelecimento de um mini e micro jardim clonal foi realizado com as mudas de melhor qualidade provenientes de cada resgate, com a finalidade de formar um banco de germoplasma. O jardim clonal foi instalado em condições de estufa recoberta por polietileno transparente.

#### **3.4.6 Análises dos dados**

Os dados mensurados de todos os experimentos foram submetidos ao teste de Lilliefors ( $P < 0,05$ ) e de Bartlett ( $P < 0,05$ ) e transformados quando necessário. Em seguida, foi realizada análise de variância (ANOVA,  $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ ). Os dados dos fatores qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) e Scott-Knott, e os dados dos fatores quantitativos foram submetidos à análise de regressão polinomial ( $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão relacionados os dados mensurados das características das matrizes em relação altura e DAP. Apesar de selecionarem-se as árvores com melhores qualidades silviculturais, pode-se perceber a grande variabilidade genética presente no povoamento de *Eucalyptus benthamii*, em consequência de sua origem seminal.

Essa variabilidade é evidenciada quando se observa as características da matriz identificada com numeração 13 que apresentou o menor DAP (32,16 cm) e maior altura (33m), enquanto a matriz 10 apresentou a menor altura (27 m) com seis metros a menos, e o maior DAP (56,36 cm) com vinte e quatro centímetros a mais, ambas no entanto, apresentam boa retidão do caule.

Tabela 1 - Relação do CAP (circunferência a altura do peito, 1,30 m), DAP (diâmetro a altura do peito, 1,30 m) e altura de cada matriz selecionada de *Eucalyptus benthamii*

Matriz	CAP (cm)	DAP (cm)	Altura (m)
01	169	53,82	31,5
02	137	43,63	33,0
03	125	39,81	32,0
04	130	41,40	29,0
05	113	35,99	28,0
06	150	47,77	31,5
07	159	50,634	28,0
08	144	45,86	27,5
09	140	44,58	32,0
10	177	56,37	27,0
11	148	47,13	28,0
12	155	49,36	31,0
13	101	32,16	33,0
14	156	49,68	31,5
15	134	42,67	31,0
16	147	46,81	28,5
17	157	50,00	32,0
18	124	39,49	31,5
19	120	38,21	32,0
20	114	36,31	33,0

### 4.1 Brotações epicórmicas

Os resultados da análise de variância para as características número de zonas meristemáticas por megaestaca e número de brotos por zona meristemática, mostrou efeito significativos pelo teste F ( $P < 0,01$ ) em relação os clones (Tabela 2).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para número de zonas meristemáticas (ZM) por megaestacas e número de brotos por zona meristemática (NBZ) de *Eucalyptus benthamii* em relação a matriz

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios	
		ZM <sup>(1)</sup> (megaestaca <sup>-1</sup> )	NBZ <sup>(1)</sup> (gema <sup>-1</sup> )
Clone (F1)	19	0,9132**	1,8461**
Resíduo	80	0,2661	0,1542
Média	-	7,90	10,17
CVexp.(%)	-	19,59	15,68

\*\* valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste F. <sup>(1)</sup> dados transformados por  $\log[(n+0,5)/100]$  pelo teste de Hartley ao nível de 5% de probabilidade de erro.  $n$  = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CVexp. = coeficiente de variação experimental.

Tais resultados podem ser atribuídos às diferenças genéticas, que geram condições fisiológicas diferentes para cada matriz (como relações hormonais internas, reservas, relação C/N, entre outras). As brotações epicórmicas são resultados da alteração do equilíbrio entre reguladores de crescimento, auxina/citocinina (ALFENAS; ZAUZA; MAFIA, 2004), o que confere uma produção endógena de hormônios distintos de acordo com o material genético amostrado (tabela 3).

Tabela 3 - Valores médios número de zonas meristemáticas (ZM) por megaestacas e número de brotos por zona meristemática (NBZ) de *Eucalyptus benthamii* em relação a matriz

CLONE	ZM (megaestaca <sup>-1</sup> )	NBZ (zona meristemática <sup>-1</sup> )
01	3,80 AB	9,80 BCD
02	6,80 AB	6,60 CD
03	9,80 AB	13,20 BCD
04	12,00 A	17,00 B
05	10,80 AB	4,40 D
06	9,80 AB	16,00 BC
07	7,00 AB	30,40 A
08	10,20 AB	5,60 D
09	7,40 AB	5,00 D
10	7,80 AB	6,60 CD
11	5,60 AB	9,80 BCD
12	3,80 AB	4,40 D
13	9,80 AB	6,60 CD
14	9,00 AB	11,00 BCD
15	6,40 AB	4,00 D
16	9,40 AB	32,60 A
17	9,80 AB	4,00 D
18	2,40 B	5,80 D
19	6,80 AB	4,00 D
20	9,60 AB	6,60 CD

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

Nota-se na Tabela 3 que todos os clones emitiram brotações e que o número de zonas meristemáticas (ZM) por clone praticamente não diferiu significativamente pelo teste Scott-Knott ( $P < 0,05$ ), com exceção do clone 4 que apresentou a maior quantidade de ZM e do clone

18, que apresentou a menor. Esses dados comprovam que, embora em quantidade diferente, o *E. benthamii* apresenta boa competência em emitir brotações em quantidade satisfatória para serem utilizadas para as técnicas de propagação. Esses dados estão em acordo com os apresentados por Souza Júnior, Wendling, e Rosa (2003) que compararam as brotações de *E. benthamii* com as do *E. dunii*, concluindo que o *E. benthamii* apresenta melhores respostas para emissão de brotações epicórmicas. Considerando-se que as vinte árvores estão sob condições edafoclimáticas e experimentais semelhantes (mesmo sítio), pode-se supor que as variações do número de zonas meristemáticas advenham de diferenças genéticas entre as matrizes ou alterações que sofreram durante o crescimento e desenvolvimento da matriz. As diferenças genéticas têm sido apontadas por diversos autores (HIGA, 1982; PRAT KRICUM et al., 1986; SAND, 1989; TAVARES; PICHET; MASCHIO, 1992; STURION; RESENDE, 2000) como principal responsável por discrepância em relação à sobrevivência e índices de enraizamento de estacas.

Em relação ao número de brotos por zona meristemática (NBZ), percebe-se que dezesseis das vinte matrizes estudadas apresentam a mesma média com relação ao NBZ de acordo com o teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). Esse resultado mostra a competência das zonas meristemáticas de *E. benthamii* em formar brotos, existindo, no entanto variações dependentes do material genético.

Com base nestes resultados concluiu-se que a utilização de megaestaca de *E. benthamii* é uma técnica eficiente quando se visa a obtenção de brotos para serem utilizados na estaquia e micropropagação, além de apresentar a vantagem de poder percorrer longas distância do local de plantio (coleta) até o local de manejo do material vegetal, sem comprometer o vigor. Adicionalmente, pode-se obter maior controle nutricional e fitossanitário das brotações, o que favorece a qualidade do propágulo emitido e sua sobrevivência.

Na Tabela 4, pode-se observar a Correlação de Pearson para o diâmetro da megaestaca (DIA), número de zonas meristemáticas por megaestaca (ZM) e número de brotos por zona meristemática (NBZ) de *E. benthamii*.

Tabela 4 - Matriz de Correlação de Pearson para o diâmetro de megaestaca (DIA), número de zonas meristemáticas (ZM) por megaestacas e número de brotos por zona meristemática (NBZ) de *Eucalyptus benthamii*

Variável	DIA	ZM	NBZ
DIA	1		
ZM	0,044 <sup>ns</sup>	1	
NBZ	0,109 <sup>ns</sup>	0,211 <sup>*</sup>	1

<sup>ns</sup> valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. <sup>\*</sup> valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

As correlações entre o diâmetro e zonas meristemáticas e, entre o diâmetro e número de brotos por zona meristemática não foram significativos pelo teste F ( $P < 0,05$ ). Esse efeito, provavelmente se deve ao fato das zonas meristemáticas terem sido formadas, com início da formação dos galhos, o crescimento em diâmetro do galho, não afetou a quantidade de zonas meristemáticas formadas. Apesar de não mensurado, observações preliminares indicam que o diâmetro teve influência no tamanho e sobrevivência das brotações, indicando existir uma correlação com a quantidade de reservas acumuladas nos tecidos dos ramos podados (megaestacas).

No entanto, observa-se correlação positiva entre ZM e NBZ pelo teste F ( $P < 0,05$ ). Nesse contexto, pode-se inferir que quanto maior foi o número de zonas meristemáticas, maior foi o número de brotos por zona meristemática. Essa tendência pode estar relacionada à competência desses tecidos em se desdiferenciar e se diferenciar novamente, acredita-se que se no galho que foi coletado (megaestaca) existem tecidos com maiores competência em formar zonas meristemáticas, esses mesmos apresentaram competência em formar brotos, devido ao seu menor grau de determinação. Segundo Dhaliwal et al. (2003) o processo de morfogênese, quanto à formação de novas estruturas celulares, está intimamente relacionado à competência da célula em responder a sinalização de fatores extrínsecos e intrínsecos, que se inicia pela quebra da determinação celular e com as primeiras divisões celulares que originarão os centros meristemáticos ou meristemóides. 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).

## 4.2 Estaquia

Em relação à estaquia, o resumo da análise de variância para a porcentagem de sobrevivência (PS) e porcentagem de enraizamento (PE) de propágulos de *E. benthamii* quanto ao clone, origem de broto e ambiente de enraizamento encontra-se na Tabela 5.

Observa-se que houve efeito significativo pelo teste F ( $P < 0,05$ ) da interação entre origem do broto, clone e ambiente de enraizamento ( $P < 0,01$ ) em relação à porcentagem de sobrevivência e porcentagem de enraizamento, evidenciado-se assim a importância genética do material (clone), condições de enraizamento (ambiente) e qualidade e juvenilidade do broto (origem).

Tabela 5 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de sobrevivência (PS) e porcentagem de enraizamento (PE) de propágulos de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone, origem de broto e ambiente de enraizamento

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios	
		PS <sup>(1)</sup> (%)	PE <sup>(1)</sup> (%)
Clone (F1)	19	17,637**	13,416**
Origem (F2)	4	841,803**	580,191**
Ambiente (F3)	1	2,300 <sup>ns</sup>	1,723 <sup>ns</sup>
F1*F2	76	10,982**	8,267**
F1*F3	19	0,683 <sup>ns</sup>	0,598 <sup>ns</sup>
F2*F3	4	5,144*	3,622*
F1*F2*F3	38	0,632 <sup>ns</sup>	0,569 <sup>ns</sup>
Resíduo	1438	1,745	1,349
Média	-	17,52	8,02
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	32,06	27,11

<sup>ns</sup> 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. <sup>(1)</sup> dados transformados por  $\log[(n+0,5)/100]$  pelo teste de Hartley ao nível de 5% de probabilidade de erro, onde  $n$  = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental.

Observa-se que ocorreu sobrevivência (tabela 6) e enraizamento (tabela 7) dos brotos de procedência de megaestaca e de brotos alongados *in vitro* somente na miniestufa, nota-se que estes brotos possuem boa competência em enraizar, no entanto, apresentam-se com tecidos muito tenros, sem praticamente nenhuma lignificação dos tecidos de proteção, sendo portanto, mais susceptíveis ao ataque de patógenos. Paul e Clark (1989) salientam que no solo ou no substrato de crescimento de plantas, existe normalmente um grande número de microrganismo, incluindo, fungos, actinomicetos, protozoários e algas. Durante a produção de mudas por estaquia, é comum a ocorrência de desequilíbrios bióticos e abióticos que podem interferir negativamente no crescimento e desenvolvimento das mudas. Entre estes, a incidência de fungos apodrecedores de estacas destaca-se como um dos fatores mais negativos ao percentual de enraizamento, chegando a comprometer o planejamento de produção de mudas e, conseqüentemente, plantio a campo (FERREIRA, 1989).

As condições ambientais requeridas para um adequado enraizamento, elevada umidade (geralmente acima de 80%) e temperatura (geralmente de 25 a 35°C) favorecem a ocorrência de fitopatógenos (ALFENAS et al., 1987, 1988). Em escala comercial, o enraizamento de

estacas tem sido praticado dentro de casas de vegetação, nas quais são mantidas à altas temperaturas e alta umidade por nebulização intermitente (FERREIRA, 1989). Essas condições se tornam mais críticas ao ataque de fitopatógenos, visto que é, aparentemente, um material fisiologicamente pouco ativo, muito vulnerável à ação de agentes microbianos (ALFENAS et al., 1987, 1988).

Na miniestufa foi possível obter maior controle fitossanitário. Esse controle se deve principalmente ao tamanho reduzido da miniestufa, podendo-se assim individualizar os materiais, não ocorrendo assim disseminação de possíveis fitopatógenos presentes. Outro fator favorável ao controle de fitopatógenos é a aplicação semanal de fungicidas, sem o risco de ser lavado pela aspersão, obtendo-se assim maior absorção pela estaca favorecendo seu desenvolvimento sadio. Ao passo que na estufa as estacas de diferentes clones ficam dispostas uma ao lado da outra, o que permitiu a disseminação de fungos e bactérias presentes, além disso, a constante entrada e saída de pessoas que trabalham no viveiro dentro da estufa pode acarretar no transporte involuntário desses agentes. Esses fatos indicam que somente a competência rizogênica não é suficiente para formação de mudas, mecanismos de resistência inicial das estacas em defender de ataques de patógenos, é de fundamental importância para o sucesso no enraizamento.

Tabela 6 - Valores médios da porcentagem de sobrevivência de propágulos de *Eucalyptus benthamii* em relação a origem do broto (BC – Brotações dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BAn – brotos do anelamento, BMe – brotos da megaestaca, BIn – brotos alongados *in vitro*) e ambiente de enraizamento (CV – casa de vegetação, MI – miniestufa)

Origem do Broto	CV (%)	MI (%)
BC	0,00 Ba	0,00 Da
BPC	0,00 Ba	0,00 Da
BAn	18,66 Aa	14,33 Ca
BMe	0,00 Bb	32,32 Ba
BIn	0,00 Bb	75,37 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.

Os brotos advindos do anelamento apresentaram índices semelhantes de sobrevivência (Tabela 6) e enraizamento (Tabela 7) em ambos os ambientes avaliados. Segundo (HACKETT, 1987) algumas características, que estão associadas com a juvenilidade, são mantidas nas porções basais de plantas maduras de muitas espécies. Hartmann et al. (2011) observaram que a maior juvenilidade da região basal das plantas se deve ao fato dos meristemas mais próximos da base formarem-se em épocas mais próximas à germinação do que os das regiões terminais. Pode-se, portanto supor, que além dessas características

observadas por Hackett (1987) e Hartmann et al. (2011) as estacas apresentaram boa resistência inicial ao ataque de patógenos, não tendo assim, interferência do ambiente no enraizamento e sobrevivência.

Tabela 7 - Valores médios da porcentagem de enraizamento de propágulos de *Eucalyptus benthamii* em relação à origem de broto (BC – Brotações dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BAn – brotos do anelamento, BMe – brotos da megaestaca, BIn – brotos alongados *in vitro*) e ambiente de enraizamento (CV – casa de vegetação, MI – mini estufa)

Origem do Broto	CV (%)	MI (%)
BC	0,00 Ba	0,00 Da
BPC	0,00 Ba	0,00 Da
BAn	11,16 Aa	9,00 Cb
BMe	0,00 Bb	16,24 Ba
BIn	0,00 Bb	69,68 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.

Os brotos alongados *in vitro*, foram os que apresentaram o maior percentual de sobrevivência (Tabela 6) e enraizamento (Tabela 7), devido ao maior grau de reversão a juvenilidade proporcionado pela cultura de tecidos e pelos subcultivos (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008; NEHRA et al., 2005). Durante o cultivo *in vitro*, o desenvolvimento e o crescimento dos explantes são influenciados diretamente pela composição nutritiva do meio de cultura, o qual é composto por combinações de macro e micronutrientes, bem como, vitaminas, aminoácidos, carboidratos e reguladores de crescimento (NEUMANN; KUMAR; IMANI, 2009). A composição do meio de cultura pode induzir a células a estádios menos diferenciados (multipotentes, pluripotentes e totipotentes), com menor determinação e aquisição de competências para novas rotas morfogênicas específicas, acarretam na redução do grau de metilação do DNA, na perda da memória e na reprogramação celular (VALLEDOR et al., 2007), que conseqüentemente, viabilizam o rejuvenescimento dos tecidos para que ocorra a regeneração de plantas e clonagem.

O rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus* através da micropropagação, atualmente, tem sido muito utilizado, visando à formação de jardim microclonal para produção de microestacas (TITON, 2001). Segundo Xavier, Otoni e Penchel (2007) a técnica pode melhorar os índices de enraizamento e acelerar os programas de melhoramento biotecnológicos de genótipos difíceis de enraizar.

A competência para o enraizamento observado nas microestacas está relacionada com a reversão da juvenilidade. Porém, o sucesso na reversão está diretamente associado ao número

de subcultivos durante a fase de multiplicação. Os maiores índices de enraizamento dos brotos alongados *in vitro* ocorreram com as microcepas que foram subcultivas por 10 meses, ou seja, 15 subcultivos (1 a cada 20 dias de cultivo), para somente então serem transferidas ao meio de alongamento onde se obteve brotações aptas para o enraizamento. Esse resultado está de acordo com Xavier et al. (2009) onde é recomendado, no mínimo, a realização de 12 subcultivos na fase de multiplicação para se atingir o rejuvenescimento de clones selecionados na idade adulta de *Eucalyptus*, para se obter adequados índices de enraizamento.

A grande vantagem dessa técnica está na conservação de germoplasma *in vitro*, o que favorece os programas de melhoramento florestal por meio da multiplicação de clones superiores, visando à produção de mudas (PENCHEL et al., 2007; XAVIER et al., 2009). Esses mesmos autores citam ainda como vantagem do rejuvenescimento de clones adultos, a obtenção de culturas livres de microrganismos patogênicos e a transformação genética de clones já selecionados.

No entanto, segundo Xavier et al. (2007) existem algumas desvantagens e dificuldades neste processo, como o maior tempo para produção de mudas, fato este que corrobora os resultados, onde as mudas obtidas a partir da cultura de tecidos de *E. benthamii* necessitaram de 12 meses de cultivo, enquanto por exemplo pela técnica da estaquia de brotos do anelamento foi necessário somente 3 meses. Apresenta ainda com desvantagem o elevado investimento, necessidade de desenvolvimento de protocolos diferenciados para diferentes espécies ou grupos de clones, a recalcitrância das culturas à propagação *in vitro* de espécies lenhosas e os riscos da contaminação acidental das culturas por microrganismos (XAVIER et al., 2007).

Para os brotos oriundos dos primeiros galhos da copa e da poda dos galhos da copa, a porcentagem de enraizamento (Tabela 6) e sobrevivência (Tabela 7) foi de 0 % (zero) nos dois ambientes, isso foi devido principalmente ao alto grau de maturação dessas estacas. Segundo Boliani (1986) e Hartmann et al. (1997) o ciclo de vida de muitas plantas se relaciona às fases juvenil e adulta, nas quais as características anatômicas, fisiológicas, bioquímicas e morfológicas são distintas, afetando sensivelmente a propagação vegetativa das plantas. Em plantas lenhosas, há um gradiente de juvenilidade em direção à base da árvore (ELDRIDGE et al., 1994), o que promove aumento da maturação em função da maior proximidade com o meristema apical (GREENWOOD; HUTCHISON, 1993). Quando se compara o percentual de enraizamento de estacas dos primeiros galhos da copa e da poda dos

galhos da copa, com os das estacas advindas do anelamento, evidencia-se a importância da juvenilidade. Segundo Hartmann et al. (2011) a maior juvenilidade da região basal das plantas se deve ao fato dos meristemas mais próximos da base formarem-se em épocas mais próximas à germinação do que os das regiões terminais.

Observou-se também que além da posição dos meristemas nas árvores, outros fatores atuam no enraizamento, pois quando se compara as estacas que tiveram origem em meristemas de um mesmo galho e, portanto, com idade ontogética similar, obteve-se índices de sobrevivência e enraizamento bem diferentes. Isso fica evidente quando se compara a sobrevivência (Tabela 6) e enraizamento (Tabela 7) das estacas oriundas da megaestaca com as estacas que tiveram origem no local onde se cortou a megaestaca (ou seja, os brotos oriundos da poda dos galhos da copa), das estacas oriundas da megaestaca apresentaram índices de sobrevivência (Tabela 6) e enraizamento (Tabela 7), superiores as estacas oriundas da poda dos galhos da copa. Huang et. al. (1990) salientam que as brotações laterais mais distantes do ramo ou caule central apresentam menores graus de juvenilidade do que aqueles mais próximos, fato esse não confirmado neste experimento, muito provavelmente em função do galho (megaestaca) ter sido destacado da árvore, tendo assim seu balanço hormonal alterado. Essa alteração estaria no balanço das relações entre citocina/auxina. Segundo Alfenas et al. (2004) o princípio fisiológico para indução de brotações epicórmicas está baseado na alteração do equilíbrio entre os reguladores de crescimento (auxina/citocinina), favorecendo assim a emissão de brotos. Essas alterações além de influenciar a emissão de brotos, provavelmente também favoreceram seu rejuvenescimento, o que não ocorreu com as brotações que surgiram no local da retirada dos galhos (megaestaca) esses tiveram uma pequena alteração hormonal, porém não efetiva a ponto de rejuvenescer os brotos.

Na literatura existem diversos relatos a respeito das diferenças entre o enraizamento adventício de material juvenil e adulto (HIGASHI et al., 2000b; PALANISAMY; SUBRAMANIAN, 2001; WENDLING et al., 2006), os quais apresentam dependência da condição fisiológica da planta-mãe (doadora de propágulos) e da idade cronológica (HAAPALA, 2004).

Ainda em relação às espécies de *Eucalyptus* determinou-se que a concentração dos inibidores ao enraizamento, aumentam com a idade das folhas, e esse aumento está correlacionado com o decréscimo da capacidade de enraizamento (HACKETT, 1988). Esses

mesmos inibidores poderiam estar presentes nas brotações do ano, enquanto que nas brotações da megaestaca não.

Com base nas Tabelas 8 e 9, pode-se observar que não houve sobrevivência e enraizamento dos brotos dos primeiros galhos da copa, e dos brotos oriundos da poda dos galhos da copa para nenhum material genético (clone). Montewis (1988) cita que a maturação dos tecidos é um fenômeno que geralmente afeta espécies lenhosas de acordo com o seu desenvolvimento ontogenético. Uma das mais importantes consequências do envelhecimento ontogenético para a clonagem é a redução, ou até mesmo, a perda da capacidade de enraizamento que se verifica em plantas lenhosas adultas, este fato tem elevada importância pois segundo ASSIS (1997) a seleção dos clones é realizada na maioria das vezes na fase adulta, onde a propagação vegetativa encontra limitações, principalmente, no que se refere à variação de genótipos entre e dentro das espécies florestais, e da redução gradual da capacidade de enraizamento de estacas, que esta associada ao envelhecimento ontogênico.

Tabela 8 - Valores médios da porcentagem de sobrevivência de propágulos de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e origem do broto (BC – Brotações dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BAn – brotos do anelamento, BMe – brotos da megaestaca, BIn – brotos alongados *in vitro*)

CLONE	ORIGEM DO BROTO				
	BC	BPC	BAn	BMe	BIn
01	0,00 Ad	0,00 Ad	11,66 BCc	25,92 FGHb	85,18 CDa
02	0,00 Ac	0,00 Ac	1,66 Cc	12,12 Ib	60,60 GHa
03	0,00 Ac	0,00 Ac	3,33 Cc	20,00 GHb	73,33 DEFa
04	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Cc	16,66 Hb	100,00 Aa
05	0,00 Ac	0,00 Ac	3,33 Cc	16,66 Hb	70,00 EGfA
06	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Cc	13,33 Ib	86,66 BCa
07	0,00 Ad	0,00 Ad	25,00 Bc	36,66 EFb	86,66 BCa
08	0,00 Ad	0,00 Ad	5,00 Cc	26,66 FGHb	96,66 ABa
09	0,00 Ad	0,00 Ad	50,00 Ac	26,66 FGHb	60,00 GHa
10	0,00 Ac	0,00 Ac	1,66 Cc	30,00 EFGb	63,33 FGHa
11	0,00 Ac	0,00 Ac	55,00 Ab	90,00 Aa	53,33 Hb
12	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Cc	46,66 CDb	60,00 GHa
13	0,00 Ad	0,00 Ad	40,00 Ab	33,33 EFc	66,66 EFGa
14	0,00 Ac	0,00 Ac	1,66 Cc	26,66 FGHb	76,66 CDEa
15	0,00 Ad	0,00 Ad	41,66 Ab	20,00 GHc	76,66 CDEa
16	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Cc	16,66 Hb	73,33 DEFa
17	0,00 Ad	0,00 Ad	20,00 BCb	16,66 Hc	73,33 DEFa
18	0,00 Ad	0,00 Ad	16,66 BCc	50,00 Cb	76,66 CDEa
19	0,00 Ad	0,00 Ad	50,00 Ac	80,00 Bb	86,66 BCa
20	0,00 Ac	0,00 Ac	3,33 Cc	40,00 DEb	76,66 CDEa

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

Com base nessas informações e como não houve sobrevivência e enraizamento dos brotos dos primeiros galhos da copa, e nem dos brotos oriundos da poda dos galhos da copa

para nenhum material genético (clone), esta técnica não é recomendada para o resgate de árvores adultas de *E. benthamii* com idade superior ou igual a 13 anos.

Em espécies de difícil enraizamento, como por exemplo, o *E. benthamii*, é fundamental garantir a juvenilidade dos propágulos. Assim, quanto mais juvenil for o material vegetativo, maior será o sucesso do enraizamento, quer expresso em percentagem, na rapidez de formação de raízes, na qualidade do sistema radicular e na capacidade de crescimento da nova planta (Gomes, 1987).

Tabela 9 - Valores médios da percentagem de enraizamento de propágulos de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e origem do broto (BC – Brotações dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BAn – brotos do anelamento, BMe – brotos da megaestaca, BIn – brotos alongados *in vitro*)

CLONE	ORIGEM DO BROTO				
	BC	BPC	BAn	BMe	BIn
01	0,00 Ad	0,00 Ad	11,66 Bc	14,81 CDEb	74,05ABa
02	0,00 Ac	0,00 Ac	1,66 Cc	9,09 FGb	53,21 CDa
03	0,00 Ad	0,00 Ad	3,33 Cc	16,66 CDb	66,66 BCa
04	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Cc	10,00 EFGb	83,33 Aa
05	0,00 Ad	0,00 Ad	3,33 Cc	6,66 Gb	66,66 BCDA
06	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Cc	6,66 Gb	75,00 ABa
07	0,00 Ad	0,00 Ad	16,66 Bc	23,33 Bb	83,33 Aa
08	0,00 Ad	0,00 Ad	3,33 Cc	16,66 CDb	83,33 Aa
09	0,00 Ad	0,00 Ad	28,33 Aa	13,33 DEFc	50,00 Db
10	0,00 Ac	0,00 Ac	1,66 Cc	13,33 DEFb	58,33 CDa
11	0,00 Ad	0,00 Ad	25,00 Ab	33,33 Aa	58,33 CDc
12	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Cc	20,00 BCb	75,00 ABa
13	0,00 Ad	0,00 Ad	25,00 Ab	20,00 BCc	75,00 ABa
14	0,00 Ac	0,00 Ac	1,66 Cc	16,66 CDb	66,66 BCDA
15	0,00 Ad	0,00 Ad	23,33 Ab	16,66 CDc	66,66 BCDA
16	0,00 Ac	0,00 Ac	0,00 Cc	10,00 EFGb	26,66 BCDA
17	0,00 Ad	0,00 Ad	15,00 Bb	6,66 Gc	66,66 BCDA
18	0,00 Ad	0,00 Ad	11,66 Bc	23,33 Bb	66,66 BCDA
19	0,00 Ad	0,00 Ad	26,66 Ac	30,00 Ab	83,33 Aa
20	0,00 Ad	0,00 Ad	3,33 Cc	16,66 CDb	75,00 ABa

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

Pode-se perceber que embora haja uma variação na percentagem de sobrevivência (Tabela 8) e enraizamento (Tabela 9) dos 20 clones em relação aos brotos de anelamento, todos os clones emitiram brotos, essa emissão ocorreu devido ao aumento da concentração de substâncias promotoras de brotações como as citocininas juntamente com a redução da concentração de auxina, neste ponto imediatamente, após o anel da casca retirado. Isso ocorre devido ao interrompimento do transporte via floema pela retirada do anel de casca, causando um desbalanço auxina/citocinina favorável à emissão de brotações (ZIMMERMANN; BROWN, 1974). No entanto, apesar de todos os clones terem respondido a técnica, com a emissão de brotos, esses evidenciaram comportamentos diferentes quanto à sobrevivência e

enraizamento, esse fato deve-se principalmente a variabilidade genética. Para o gênero *Eucalyptus* e também entre clones de uma mesma espécie, podem ser observadas várias mudanças, quanto ao percentual de enraizamento, podendo este variar de 0 a 100%, conforme resultados observado por (HIGASHI et al., 2000a). Assis e Teixeira (1998) ressaltaram a importância das características genéticas de espécies e clones de *Eucalyptus* quanto à capacidade de enraizamento em relação ao balanço entre os reguladores de crescimento, que de modo geral, apresenta variabilidade inter e intra-específica.

### 4.3 Enxertia

Na tabela 10 nota-se efeito significativo pelo teste F ( $P < 0,05$ ), da interação entre clone e origem do broto em relação à porcentagem de pegamento (PEG). Observa-se também que o coeficiente de variação experimental ( $CV_{exp}$ ) foi de 5,95%, indicando que a precisão experimental foi adequada em relação às características mensuradas.

Tabela 10 - Resumo da análise de variância para a porcentagem de pegamento (PEG) de enxertos *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e origem de broto

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios
		PEG <sup>(1)</sup> (%)
Clone (F1)	19	0,170*
Origem (F2)	2	0,319*
F1*F2	38	0,170*
Resíduo	540	0,098
Média	-	0,25
$CV_{exp.}(\%)$	-	5,95

\* valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. <sup>(1)</sup> dados transformados por  $\log[(n+0,5)/100]$  pelo teste de Hartley ao nível de 5% de probabilidade de erro, onde  $n$  = dado amostrado. GL = graus de liberdade,  $CV_{exp.}$  = coeficiente de variação experimental.

Ao analisar a Tabela 11 pode-se observar que apenas dois (07 e 10) dos vinte clones testados apresentaram pegamento do enxerto, enfatizando a dificuldade de cicatrização e pegamento do *E. benthamii*, como também a interferência do genótipo na cicatrização e pegamento do enxerto.

O único tipo de tipo broto que apresentou resposta favorável ao pegamento do enxerto foi o broto advindo do anelamento (AN), o que permite inferir que esse tipo de broto apresenta maior grau de juvenilidade em relação aos brotos provenientes do topo (BT) e do ano (BA). Corroborando com o relato de Hartmann et al. (20011), em que a maior juvenilidade da região basal das plantas, manifesta-se nos meristemas dos brotos de anelamento devido a sua maior proximidade com a base, que apresentou formação em épocas mais próximas à germinação do que os das regiões terminais.

Tabela 11 - Valores médios da porcentagem de pegamento de enxertos de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e origem do broto (BC – Brotações dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BAn – brotos do anelamento)

CLONE	ORIGEM DO BROTO		
	BC	BPC	BAn
01	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
02	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
03	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
04	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
05	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
06	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
07	0,00 Ab	0,00 Ab	10,00 Aa
08	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
09	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
10	0,00 Ab	0,00 Ab	5,00 ABa
11	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
12	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
13	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
14	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
15	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
16	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
17	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
18	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
19	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba
20	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ba

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

A técnica de enxertia para a espécie *E. benthamii* não se mostrou adequada para ser conduzida em escala de resgate de material vegetal adulto, principalmente, devido aos baixos índices de pegamento dos enxertos. Ferrari et al. (2004) ressalta que algumas espécies apresentam problemas de rejeição, os quais podem ser caracterizados imediatamente após a realização do enxerto ou mais tardiamente, o que pode prejudicar a produção de um pomar de sementes florestais, passando a ser a estaquia uma estratégia mais viável.

#### 4.4 *In vitro*

Os resultados da análise de variância (Tabela 12) apresentaram interação entre os fatores clone e origem do broto de *E. benthamii* em relação ao estabelecimento ( $P<0,01$ ), contaminação fúngica ( $P<0,05$ ), contaminação bacteriana ( $P<0,05$ ) e contaminação com alga ( $P<0,01$ ). Porém, não houve efeito significativo para a oxidação. Contudo, houve interação entre a origem do broto e a oxidação ( $P<0,01$ ).

Tabela 12 - Resumo da análise de variância para o estabelecimento (EST), contaminação fúngica (FUN), contaminação bacteriana (BAC), contaminação com alga (ALG) e oxidação (OXI) de explantes de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e origem do broto

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios				
		EST <sup>(1)</sup> (%)	FUN <sup>(1)</sup> (%)	BAC <sup>(1)</sup> (%)	ALG <sup>(1)</sup> (%)	OXI <sup>(1)</sup> (%)
Clone (F1)	19	0,0091*	0,8610*	2,52*	1,129**	2,423 <sup>ns</sup>
Origem (F2)	3	640,25**	72,17**	220,27**	13,568**	170,035**
F1*F2	57	0,0091**	0,6636*	2,03*	1,129**	2,178 <sup>ns</sup>
Resíduo	320	0,0046	0,4279	1,40	0,340	1,743
Média	-	19,80	60,10	11,22	0,80	9,15
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	27,48	21,12	36,87	11,41	37,55

\* valor 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. <sup>ns</sup> valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F. <sup>(1)</sup> dados transformados por  $\log[(n+0,5)/100]$  pelo teste de Hartley ao nível de 5% de probabilidade de erro, onde  $n$  = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental.

A maior porcentagem de oxidação foi verificada nos brotos do topo (18,1%), seguido de anelamento, broto do ano e da megaestaca, a qual não apresentou oxidação de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% (Tabela 13).

Tabela 13 - Médias da oxidação de explantes de *Eucalyptus benthamii* em relação a origem do broto

Origem do broto	Oxidação (%)
Broto dos primeiros galhos da copa	18,10 A
Brotos oriundos da poda dos galhos da copa	7,30 C
Broto da Megaestaca	0,00 D
Broto do Anelamento	11,20 B

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

Particularmente espécies tropicais, frequentemente apresentam elevadas concentrações de substâncias fenólicas que são oxidadas quando as células são feridas ou senescentes, sendo que o tecido isolado torna-se marrom ou preto e não cresce (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Além disso, várias enzimas cobre-dependentes estão envolvidas na oxidação e hidroxilação de compostos fenólicos (LERCH, 1981). A hidroxilação de monofenóis por enzimas que contém cobre, induzem a construção de importantes componentes polímeros nas plantas, tais como a lignina. Essas mesmas enzimas podem levar ao escurecimento de explantes recém isolados (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Atribui-se a elevada porcentagem de oxidação dos segmentos nodais advindos de broto dos primeiros galhos da copa, a maiores deposição de ligninas presentes destes tecidos quando comparado aos brotos de anelamento, brotos oriundos da poda dos galhos da copa e de megaestaca (0% de oxidação). Um dos fatores que influenciou para o não estabelecimento (Tabela 14) de explantes *in vitro* foi a sua oxidação, segundo Benson (2000), a oxidação leva ao aumento na formação de radicais livres que são responsáveis por danos irreparáveis ao DNA, proteínas e enzimas, causando disfunção celular, levando a morte do explante (figura 10).

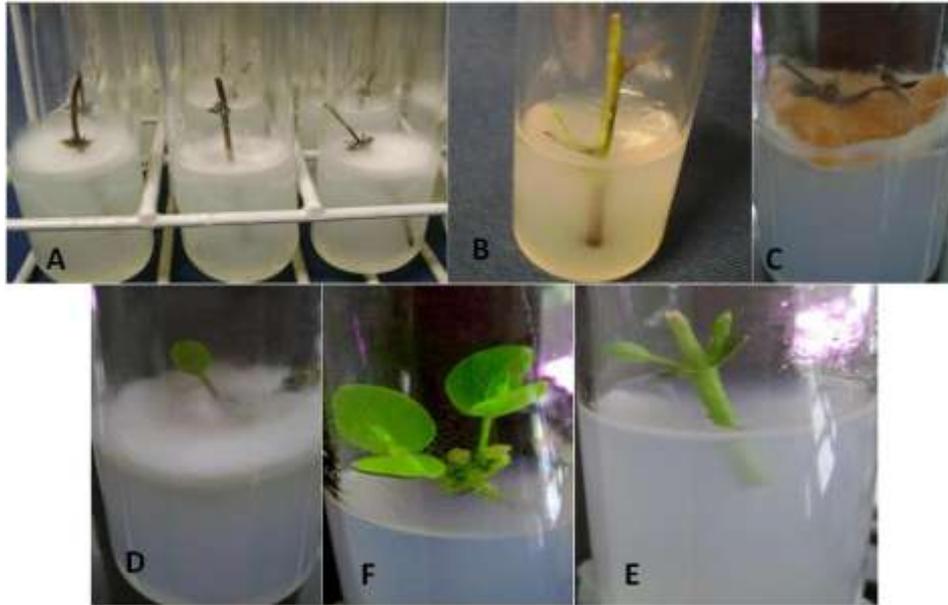


Figura 10 - Figura -10 Segmentos nodais obtidos dos brotos dos primeiros galhos da base da copa com contaminação por fungo (A) e início de oxidação (B); Segmento nodal do anelamento oxidação e contaminação por fungo e bactéria (C e D); Segmento nodal da megaestaca em início do desenvolvimento das gemas axilares e brotos completamente desenvolvidos respectivamente (E e F respectivamente)

Tabela 14 - Médias do estabelecimento (EST) de explantes de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e origem do broto (BC– Brotos dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BMe – broto da megaestaca, BAn –broto do anelamento)

Clone	Origem do broto			
	BC (%)	BPC (%)	BMe (%)	BAn (%)
01	0,00 Ab	0,00 Ab	74,00 Da	0,00 Ab
02	0,00 Ab	0,00 Ab	86,00 ABCa	0,00 Ab
03	0,00 Ab	0,00 Ab	78,00 BCDa	0,00 Ab
04	0,00 Ab	0,00 Ab	78,00 BCDa	0,00 Ab
05	0,00 Ab	0,00 Ab	86,00 ABCa	0,00 Ab
06	0,00 Ab	0,00 Ab	76,00 CDa	0,00 Ab
07	0,00 Ab	0,00 Ab	76,00 CDa	0,00 Ab
08	0,00 Ab	0,00 Ab	78,00 BCDa	0,00 Ab
09	0,00 Ab	0,00 Ab	80,00 ABCa	0,00 Ab
10	0,00 Ab	0,00 Ab	78,00 BCDa	0,00 Ab
11	0,00 Ab	0,00 Ab	78,00 BCDa	0,00 Ab
12	0,00 Ab	0,00 Ab	86,00 ABCa	0,00 Ab
13	0,00 Ab	0,00 Ab	78,00 BCDa	0,00 Ab
14	0,00 Ab	0,00 Ab	80,00 ABCa	0,00 Ab
15	0,00 Ab	0,00 Ab	88,00 ABa	0,00 Ab
16	0,00 Ab	0,00 Ab	62,00 Ea	0,00 Ab
17	0,00 Ab	0,00 Ab	72,00 Da	0,00 Ab
18	0,00 Ab	0,00 Ab	74,00 Da	0,00 Ab
19	0,00 Ab	0,00 Ab	86,00 ABCa	0,00 Ab
20	0,00 Ab	0,00 Ab	90,00 Aa	0,00 Ab

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

Nas Tabelas 15 e 16 estão apresentadas as médias de contaminação fúngica e bacteriana as quais resultaram no não estabelecimento *in vitro* dos explantes de segmentos nodais advindos de brotos dos primeiros galhos da copa, brotos oriundos da poda dos galhos

da copa e de anelamento. Observa-se que os percentuais de contaminação fúngica e bacteriana desses três tipos de broto foram elevados, devido a sua origem direta do campo, em que estão expostos a todos os tipos de patógenos, ao contrário dos segmentos nodais advindos da megaestaca, que permaneceram em casa de vegetação até o surgimento das brotações, assegurando maior controle fitossanitário e mais efetivo (figura 9), corroborando com as afirmações de GRATTAPAGLIA E MACHADO (1998), onde destacam que o estado fisiológico da planta matriz de onde são coletados os explantes, apresenta grande influência no posterior comportamento das culturas *in vitro*.

Tabela 15 - Médias da contaminação fúngica (FUN) de explantes de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e origem do broto (BC – Brotos dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BMe – broto da megaestaca, BAn – broto do anelamento)

Clone	Origem do broto			
	BC (%)	BPC (%)	BMe (%)	BAn (%)
01	84,00 Aa	64,00 Ab	22,00 Ac	66,00 ABb
02	76,00 Aa	68,00 Aa	12,00 Ab	66,00 Aba
03	88,00 Aa	66,00 Ab	22,00 Ac	76,00 ABab
04	38,00 Bb	64,00 Aa	22,00 Ac	74,00 Aba
05	80,00 Aa	66,00 Aa	14,00 Ab	72,00 Aba
06	76,00 Aa	64,00 Aab	24,00 Ac	52,00 Bb
07	64,00 Aa	74,00 Aa	24,00 Ab	78,00 Aba
08	64,00 Aa	66,00 Aa	20,00 Ab	74,00 Aba
09	72,00 Aa	86,00 Aa	18,00 Ab	72,00 Aba
10	86,00 Aa	80,00 Aa	20,00 Ab	76,00 Aba
11	84,00 Aa	82,00 Aa	22,00 Ab	84,00 Aa
12	76,00 Aa	68,00 Aa	16,00 Ab	80,00 Aba
13	82,00 Aa	88,00 Aa	22,00 Ab	76,00 Aba
14	80,00 Aa	72,00 Aa	18,00 Ab	68,00 Aba
15	76,00 Aa	76,00 Aa	12,00 Ab	72,00 Aba
16	76,00 Aa	82,00 Aa	32,00 Ab	76,00 Aba
17	82,00 Aa	84,00 Aa	28,00 Ab	70,00 Aba
18	82,00 Aa	66,00 Aa	26,00 Ab	70,00 Aba
19	76,00 Aa	66,00 Aa	14,00 Ab	76,00 Aba
20	70,00 Aa	76,00 Aa	10,00 Ab	62,00 Aba

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

Mesmo com o estabelecimento de um protocolo de assepsia menos rigoroso na pré introdução dos brotos de origem do anelamento, em relação ao protocolo estabelecido aos brotos dos primeiros galhos da copa, brotos oriundos da poda dos galhos da copa e de anelamento, estes apresentaram índices de contaminação maiores. Esse efeito demonstra a importância do controle fitossanitário do material vegetal fornecedor de explantes, desde seu aparecimento até o momento da introdução e não somente momentos antes da introdução. Esses resultados estão de acordo com Grattapaglia e Machado (1998) que citam que quando se utiliza material vegetativo diretamente do campo, os tratamentos para assepsia devem ser mais criteriosos, em virtude dos explantes apresentarem maiores níveis de contaminação, e

geralmente as concentrações e tempos de exposições aos agentes desinfetantes são maiores, em comparação com os explantes provenientes de ambientes protegidos. De acordo com Brondani et al. (2009) os índices de estabelecimento *in vitro* de explantes (no caso de segmentos nodais) geralmente são elevados quando as brotações são originadas de minicepas (planta fornecedora de brotações) cultivadas em minijardim clonal protegido, devido ao maior controle ambiental e nutricional, em comparação aos explantes originados de árvores adultas coletados diretamente no campo, condições essas parecidas com as brotações da megaestaca.

Tabela 16 - Médias da contaminação bacteriana (BAC) de explantes de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e origem do broto (BC – Brotos dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BMe – brotos da megaestaca, BAn – brotos do anelamento)

Clone	Origem do broto			
	BC (%)	BPC (%)	BMe (%)	BAn (%)
01	0,00 Ab	30,00 ABa	4,00 Ab	20,00 Aba
02	14,00 Aa	26,00 ABCDa	2,00 Ab	22,00 Aba
03	0,00 Ab	28,00 ABCa	0,00 Ab	18,00 Aba
04	10,00 Ab	32,00 Aa	0,00 Ab	8,00 Bb
05	10,00 Abc	30,00 ABa	2,00 Ac	16,00 ABb
06	14,00 Ab	32,00 Aa	0,00 Ac	30,00 Aa
07	12,00 Aa	20,00 ABCDa	0,00 Ab	16,00 Aba
08	10,00 Abc	24,00 ABCDa	2,00 Ac	20,00 ABab
09	4,00 Ab	10,00 CDab	2,00 Ab	20,00 Aba
10	2,00 Aa	16,00 ABCDa	2,00 Aa	10,00 Ba
11	2,00 Ab	18,00 ABCDa	0,00 Ab	14,00 Aba
12	2,00 Ab	20,00 ABCDa	0,00 Ab	16,00 Aba
13	0,00 Ab	8,00 Dab	2,00 Ab	16,00 Aba
14	10,00 Ab	24,00 ABCDa	2,00 Ab	12,00 ABb
15	4,00 Aa	12,00 BCDa	0,00 Aa	12,00 Aba
16	8,00 Aa	16,00 ABCDa	6,00 Aa	16,00 Aba
17	4,00 Ab	8,00 Dab	0,00 Ab	18,00 Aba
18	4,00 Ab	26,00 ABCDa	0,00 Ab	16,00 Aba
19	8,00 Aab	18,00 ABCDa	0,00 Ab	18,00 Aba
20	8,00 Aab	16,00 ABCDa	0,00 Ab	16,00 Aba

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

Apesar de os segmentos nodais advindo de brotos da megaestaca apresentar menores índices de contaminação por bactérias e fungos, foram os únicos que apresentaram contaminação com algas (tabela 17). A alga não interferiu no desenvolvimento inicial dos explantes, no entanto, após 3 sub cultivos começou a haver uma competição com o explante. Para diminuir a competição entre os explantes e a alga, estes foram lavados dentro do fluxo laminar com água destilada e autoclavada. Para o controle total das mesmas adicionou-se uma gota de algicida ao meio de cultura após a autoclavagem e solidificação, o protocolo mostrou-se eficiente no controle da manifestação da alga (figura 11).

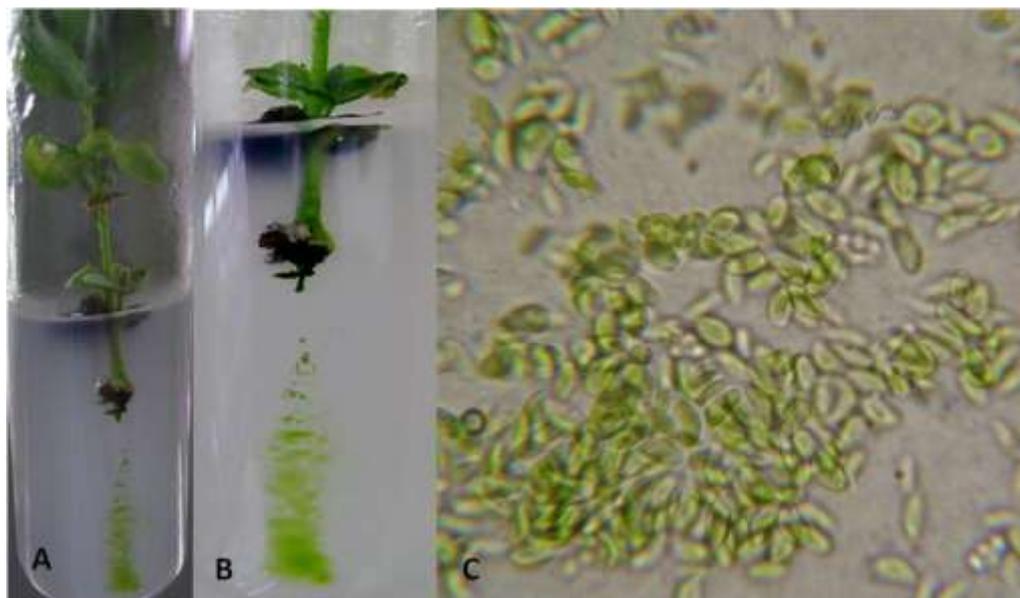


Figura 11 - Contaminação por alga (A); Detalhe da exudação de alga para o meio de cultura(B)  
 Detalhe da alga depois de isolada do meio de cultura e observada em microscópio (C)

Tabela 17 - Médias da contaminação com alga (ALG) de explantes de *Eucalyptus benthamii* em relação ao clone e origem do broto (BC– Brotações dos primeiros galhos da copa, BPC – Brotos oriundos da poda dos galhos da copa, BMe – brotos da megaestaca, BAn – brotos do anelamento)

Clone	Origem do broto			
	BC (%)	BPC (%)	BMe (%)	BAn (%)
01	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ca	0,00 Aa
02	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ca	0,00 Aa
03	0,00 Ab	0,00 Ab	6,00 BCa	0,00 Ab
04	0,00 Ab	0,00 Ab	10,00 ABa	0,00 Ab
05	0,00 Ab	0,00 Ab	6,00 BCa	0,00 Ab
06	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ca	0,00 Aa
07	0,00 Aa	0,00 Aa	2,00 Ca	0,00 Aa
08	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ca	0,00 Aa
09	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ca	0,00 Aa
10	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ca	0,00 Aa
11	0,00 Ab	0,00 Ab	12,00 Aa	0,00 Ab
12	0,00 Aa	0,00 Aa	4,00 Ca	0,00 Aa
13	0,00 Ab	0,00 Ab	10,00 ABa	0,00 Ab
14	0,00 Aa	0,00 Aa	4,00 Ca	0,00 Aa
15	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ca	0,00 Aa
16	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ca	0,00 Aa
17	0,00 Ab	0,00 Ab	6,00 BCa	0,00 Ab
18	0,00 Aa	0,00 Aa	4,00 Ca	0,00 Aa
19	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ca	0,00 Aa
20	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Ca	0,00 Aa

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

O melhor explante para a introdução *in vitro* foi caracterizado pelo uso dos segmentos nodais advindos da megaestaca, onde se obteve o estabelecimento *in vitro* para todos os clones (Tabela 14). Porém, devido à variabilidade genética presente nas matrizes, houve variação no percentual de estabelecimento *in vitro* dos clones 16 (62%) e 20 (90%). Apesar de ter ocorrido variação da porcentagem entre os clones, a megaestaca mostrou ser a melhor alternativa para o estabelecimento *in vitro* de plantas adultas de *E. benthamii*, sendo recomendada sua utilização para o resgate de material genético adulto, estabelecido em condições de campo.

#### 4.5 Estabelecimento do mini e mirco jardim clonal

Todas as matrizes de *E. benthamii* foram resgatadas com sucesso, e no intuito de formar um banco de germoplasma composto dos genótipos resgatados, estabeleceu-se um minijardim clonal instalado em condições de estufa recoberta por polietileno transparente (figura 12), com as mudas que apresentaram melhor qualidade, que poderá ser utilizado para futuros testes e formação de mudas. Portanto, obteve-se assim um banco de germoplasma ativo que permitem a manutenção das características da planta-mãe (matriz), possibilitando segundo Xavier (2002) a multiplicação em maior escala desses materiais.



Figura 12 – Vista do minijardim clonal formado a partir do resgate das 20 matrizes



## 5 CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que a utilização da megaestaca como doadora de explantes para o cultivo *in vitro*, mostrou ser o método mais eficiente para o resgate de matrizes adultas de *E. benthamii*, uma vez que as microestacas apresentaram elevado índice de enraizamento. O uso de brotos do anelamento para estaquia embora em menor porcentagem mostrou-se satisfatório para o enraizamento. Já os brotos dos primeiros galhos da copa e os oriundos da poda dos galhos da copa, da mesma forma que a técnica da enxertia, não apresentaram resultados satisfatórios para o resgate de matrizes de *E. benthamii*, para nenhum dos tipos de materiais vegetais avaliados.



## REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C.; DEMUNER, N.L.; SILVA, A.R. Resistência de *Cylindrocladium scoparium*, agente etiológico de podridão de estacas de *Eucalyptus* a benomyl. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, v. 12, n.2, p. 234, 1987.
- \_\_\_\_\_. Benomyl resistant strain of *Cylindrocladium scoparium* causal agent of cutting rot of *Eucalyptus grandis* in Brazil. ISPP. **Chemical Control Newsletter**, Califórnia, v. 10, p. 23-25, 1988.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.
- ALMEIDA, F.D. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. por estaquia e miniestaquia**. 2006. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- ALONSO, M.; ROZADOS, M.J.; VEGA, J.A.; ÉREZGOROSTIAGA, P.; CUIÑAS, P.; FONTÚRBEL, M.T.; FERNÁNDEZ, C. Biochemical responses of *Pinus pinaster* trees to fire-induced trunk girdling and crown scorch: secondary metabolites and pigments as needle chemical indicators. **Journal of Chemical Ecology**, Pontevedra, v. 28, n. 4, p. 687-700, 2002.
- ANDRADE, E.N. de. **O eucalipto**. 2. ed. São Paulo: FAO, 1961. 118 p.
- ASSIS, T.F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 185, p. 32-51, 1996.
- \_\_\_\_\_. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OS EUCALYPTS, 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 transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. 1, p. 261-296.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF: ano base 2010**. Brasília, 2011. 130 p.
- BENSON, DH. Aspects of the ecology of a rare tree species, *Eucalyptus benthamii*, at Bents Basin. **Cuninghamia**, Wallacia, v. 1, n. 3, p. 371-383, 1985.
- BENSON, E.E. Special symposium: in vitro plant recalcitrance. Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? **In Vitro Cell Developmental Biology Plant**, Dundee, v. 36, p. 163–170, 2000.
- BOLIANI, A.C. **Efeitos do estiolamento basal, da juvenilidade e do uso de um regulador vegetal no enraizamento de estacas de raízes e de ramos herbáceos de algumas espécies frutíferas**. 1986. 121 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1986.

BONGA, J.M.; ADERKAS, P. von. **In vitro culture of trees**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1992. 236 p. (Forestry Science, 38).

\_\_\_\_\_. Rejuvenation of tissues from mature conifers and its implications for propagation *in vitro*. In: AHUJA, M.R.; LIBBY, W.J. **Clonal forestry: genetics and biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p. 182-199.

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

BREESE, E.L. **Regeneration and multiplication of germoplasm resources in seed genebanks: the scientific background**. Rome: IBPGR, 1989. 69 p.

BRITO, J.O.; BARRICHELO, L.E.G.; MIGLIORINI, A.J.; SEIXAS, F.; MURAMOTO, M.C. Análise da produção energética e de carvão vegetal de nove espécies de eucalipto. In: CONGRESSO FLORESTAL RASILEIRO, 4., 1982, Belo Horizonte. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1983. p. 742-744.

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

BRONDANI, G.E. ; BACCARIN, F.J.B.; ONDAS, H.W.W.; STAPE, J.L.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Low temperature, IBA concentrations and optimal time for adventitious rooting of Eucalyptus benthamii mini-cuttings. **Journal of Forestry Research**, 2012. In press.

BUTCHER, P.A.; SKINNER, A.K.; GARDINER, C.A. Increased inbreeding and inter-species gene flow in remnant populations of the rare Eucalyptus benthamii. **Conservation Genetics**, Kingstown, v. 6, n. 2, p. 213-226, 2005.

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

COHEN, A. Recent developments in girdling of citrus tree. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Washington, v. 1, p. 196-199, 1981.

COMÉRIO, J.; XAVIER, A.; IANNELLI, C.M. Microestaquia: um novo sistema de produção de mudas de Eucalyptus na Champion. In: ENCONTRO TÉCNICO FLORESTAL, 7., 1996, Belo Horizonte. **Anais...** Piracicaba: ABRACAVE, 1996. p.

COTTERILL, P.P.; DEAN, C.A. **Successful tree breeding with index selection**. Melbourne: CSIRO, Division of Forestry and Forest Products, 1990. 80 p.

CRESSWELL, R.J.; FOSSARD, R.A. DE. Organ culture of Eucaliptos grandis. **Australian Forestry**, Armidale, v. 37, n. 1, p. 54-69, 1974.

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, p. 611–621, 2003.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARDWIID, C.; Van WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1994. 312 p.

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).

FACHINELLO, J.C. **Efeito morfofisiológicos do anelamento no enraizamento de estacas lenhosas de macieira cultivar malling-merton**. 1986. 93 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1986.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E. & FORTES, G.R.L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: Editora UFPEL, 1995. 179 p.

FAO. **El eucalipto en la repoblacion forestal**. Roma, 1956. 431 p.

FERRARI, M.P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 22 p. (Documentos, 94).

FERREIRA, F.A. **Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil**. Viçosa: UFV; SIF, 1989. 570 p.

FORESTBRASIL. **Viveiro florestal**. 2005. Disponível em: <<http://www.forestbrazil.com.br.html>>. Acesso em: 05 abr. 2012.

FOUDA, R.A. Anatomical characteristics of juvenile and adult shoots associated with rooting ability of *Cupressocyparis leylandii* cuttings. **Horticultural Science**, Budapest, v. 28, p. 107-111, 1996.

FRANCKET, A.; BOULAY, M.; BEKKAOUI, F.; FOURET, Y.; VERSCHOORE-MARTOUZET, B.; WALKER, N. Rejuvenation. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1987. v. 1, p. 232-248.

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

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G.J. **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, 501 p.

GOLFARI, L.; CASER, R.L.; MOJRA, V.P.G. Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil. **Série Técnica PRODEPEF**, Brasília, v. 11, p. 1-66, 1978.

GOMES, A.L. **Propagação clonal: princípios e particularidades**. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1987. 69 p. (Série Didáctica, Ciências Aplicadas, 1).

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

GREENWOOD, M.S.; HUTCHISON, K.W. Maturation as an developmental process. In: AHUJA, M.R.; LIBBYW. J. **Clonal forestry: genetics and biotechnology**. Budapest: Springer-Verlag, 1993. p. 14-33.

HAAPALA, T. **Establishment and use of juvenility for plant propagation in sterile and non-sterile conditions**. 2004. 53 p. Thesis (Academic Dissertation) - University of Helsinki, Helsinki, 2004.

HACKETT, W.P. Donor plant maturation and adventitious root formation. In: DAVIES, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1987a. p. 11-28. (Advances in Plant Sciences Series, 2).

\_\_\_\_\_. Juvenility and maturity. In: \_\_\_\_\_. **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1987b. p. 216-231.

\_\_\_\_\_. Donor plant maturation and adventitious root formation. In: DAVIES, T.D.; HAISSIG, B.E.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, 1988. v. 2, p. 11-28.

HACKETT, W.P.; MURRAY, J.R. Maturation and rejuvenation in woody species. In: AHUJA, M.R. **Micropropagation of woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. p. 93-105.

HALL, N.; JOHNSTON, R.D.; CHIPPENDALE, G.M. **Forest trees of Australia**. Canberra: Department of National Development, Forestry and Timber Bureau, Australian Government Publishing Service, 1970. 768 p.

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

HARTNEY, V.J. Vegetative propagation of the Eucalyptus. **Australian Forest Research**, Melbourne, v. 10, n. 3, p. 191-211, 1980.

HIGA, A.R.; CARVALHO, P.E.R. de. Sobrevivência e crescimento de doze espécies de eucalipto em Dois Vizinhos, Paraná. **Silvicultura**, São Paulo, n. 42, p. 459-461, 1990. Apresentado no CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. Anais...

HIGA, A.R.; GARCIA, C.H.; SANTOS, E.T. Geadas, prejuízos à atividade florestal. **Silvicultura**, São Paulo, v. 15, n. 58, p. 40-43, nov./dez. 1994.

HIGA, R.C.V. Estaquia de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire): resultados preliminares. **Silvicultura em São Paulo**, São Paulo, v. 8, n. 28, p. 304-305, 1982. Apresentado no CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 4., 1982, Belo Horizonte.

\_\_\_\_\_. Aspectos ecológicos e silviculturais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 38, p. 121-123, jan./jun. 1999.

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

HIGA, R.C.V.; HIGA, A.R.; TREVISAN, R.; SOUZA, M.V.R. de. Comportamento de vinte espécies de *Eucalyptus* em área de ocorrência de geadas na região sul do Brasil. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPT, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, 1997. p. 106-110.

\_\_\_\_\_. Resistência e resiliência a geadas em *Eucalyptus dunnii* Maiden plantados em Campo do Tenente, PR. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 40, p. 67-76, jan./jun. 2000.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.A.; GONÇALVES, A.N. Evolução do jardim clonal de eucalipto para a produção de mudas. **IPEF Notícias**, Piracicaba, v. 24, n. 148, p. 4-6, 2000a.

\_\_\_\_\_. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e sua evolução no Brasil. **Circular Técnica IPEF**, Piracicaba, n. 192, p. 2-14, 2000b.

IANNELLI, C.M.; CARDOSO, N.Z.; ORTIZ, M.R.A. Sistema radicular de mudas de eucalipto produzidas por macroestaca e microestaca. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, 1997. v. 4, p. 178-182.

HUANG, L.; CHIU, D.; MURASHIGE, T.; GUNDY R. van; MAHDI, E.F.; NAGAI, K.; PLIEGO ALFARO, F. Rejuvenation of trees and other perennials for restoration of plant regeneration competence. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA, CNPH, 1990. p. 252-264.

JOHNSON, L.A.S.; HILL, K.D. New taxa and combinations in *Eucalyptus* and *Angophora* (Myrtaceae). **Telopea**, Kingston, v. 4, n. 1, p. 37-108, 1990.

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

KIKUTI, P.; MONTEIRO, R.F.R. Seleção de árvores matrizes para trabalhos de melhoramento de *Eucalyptus* spp. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL: MÉTODOS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE SEMENTES E MUDAS FLORESTAIS, 1984, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FUPEF, 1984. p. 227-243.

LARCHER, W. **Physiological plant ecology**. Insbruck: Springer-Verlag, 1983. 533 p.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 60, p. 197-214, 1981.

LERCH, K. Copper monooxygenases: tyrosine and dopamine b-monooxygenase. In: SIGEL, H. (Ed.). **Metal ions in biological systems**. New York; Basel, Marcel Dekker, 1981. p. 143-186.

MALAVASI, U.C. Macropropagação vegetativa de coníferas: perspectivas biológicas e operacionais. **Floresta e Ambiente**, Itaguaí, v. 1, n. 1, p. 131-135, 1994.

MENDOZA, L. Notes on Eucalyptus benthamii in Argentina. In: COLLOQUES INTERNATIONAL SUR LES EUCALYPTUS RESISTANTS AU FROID, 1983, Bordeaux. **Annales...** Bordeaux: IUFRO, 1983. p. 480.

MONTEWIS, O. Maturation concept and possible rejuvenation of arborescent species. Limits and promises of shoot apical meristems to ensure successful clonung. In: POPULATION STRUCTURE AND GENETIC IMPROVEMENT STRATEGIES IN CLONAL AND SEEDLING FORESTRY. IUFRO BREEDING TROPICAL TREE, 1988, Pattaya. **Proceedings...** Pattaya: Pattaya, 1988. p. 106-118.

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

\_\_\_\_\_. Clonal crops through tissue culture. In: BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENCK, M.H. (Ed.). **Plant tissue culture and its biotechnological application**. New York: Springer-Verlag, 1997. p. 392-406.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiology**, Wisconsin, v. 15, p. 473-479, 1962.

NATIONAL PARKS & WILDLIFE SERVICE. **Threatened species information: Eucalyptus benthamii Maiden and Cambage**. Hurstville: National Parks & Wildlife Service, 2000. 3 p.

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

NEUMANN, K.H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant cell and tissue culture: a tool in biotechnology**. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. 342 p.

NIEDZ, R.P.; BAUSHER, M.G. Control of in vitro contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 38, n. 5, p. 468-471, 2002.

NISGOSKI, S.; MUÑIZ, G.I.B. de; KLOCK, U. Caracterização anatômica da madeira de Eucalyptus benthamii Maiden et Cambage. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 8, n. 1, p. 67-76, 1998.

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

PALANISAMY, K.; SUBRAMANIAN, K. Vegetative propagation of mature teak trees (*Tectona grandis* L.). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 50, n. 5/6, p. 188-191, 2001.

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

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1989. 552 p.

PEREIRA, J.C.D.; SCHAITZA, E.G.; SHIMIZU, J. **Características físicas, químicas e rendimento da destilação seca da madeira de *Eucalyptus benthamii***. Colombo: EMBRAPA, 1997. 2 p. (Boletim, 35).

POWELL, A.A.; HOWELL, C. Using girdling, scoring and a growth regulator to increase yields and fruit size in peaches. **HortScience**, Virginia, v. 16, p. 440-441, 1981.

PRAT KRIKUN, S.D.; BELINGHERI, L.D.; PICCOLO, G.A.; FLORES, S.E.R.; FONTANA, H.P. **Yerba mate**; informe sobre investigaciones realizadas. Período 1984-85. Cerro Azul: E.E.A. Misiones, 1986. 32 p. (Publicación Miscelânea no 15).

PRYOR, L.D. **Australian endangered species: Eucalyptus**. Canberra: Commonwealth of Australia, 1981. 139 p.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 728 p.

RIBEIRO, F.A.; COUTO, L.; GOMES, J.M.; BORGES, R.C.G. Influência da anelagem e reguladores de crescimento na indução de brotação de cepas de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 16, n. 3, p. 247-254, 1992.

ROSA, L.L.; WENDLING, I.; SOUZA JÚNIOR, L. Brotações epicórmicas no resgate vegetativo de indivíduos adultos de *Ilex paraguariensis* St. Hill. In: 3 CONGRESSO SUL AMERICANO DE ERVA MATE. SECÇÃO, 3.; FEIRA DE AGRONEGÓCIO DA ERVA-MATE, 1., 2003, Chapeco, 2003. **Anais...**

SAKAI, A.; LARCHER, W. **Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress**. Berlin: Springer-Verlag, 1987. 321 p.

SALISBURY, F.B.; ROSS, F.B. **Plant physiology**. 2<sup>nd</sup> ed. Berkeley: Wadsworth Publ., 1978. 422 p.

SAND, H.A. Propagación agamica de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA, ESTACION EXPERIMENTAL AGROPECUARIA MISIONES, 1989, Fray Bentos, 1989. Fray Bentos, 1989. p. 11. (Nota Técnica, 40).

SANTOS, A.F. do; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil**: identificação e controle. Colombo: Embrapa Florestas, CNPF, 2001. 20 p. (Circular Técnica, 45).

SKINNER, A. **The effects of tree isolation on the genetic diversity and seed production of Camden White Gum (*Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage)**. Centre for Plant Biodiversity Research, 10 mar. 2003. Disponível em: < <http://www.anbg.gov.au/cpbr/summer-scholarship/2002-projects/skinner-alison-report.html> > Acesso em: 25 out. 2011.

SOUZA JÚNIOR, L.; WENDLING, I.; ROSA, L.S. da. Brotações epicórmicas no resgate vegetativo de indivíduos adultos de *Eucalyptus* spp. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL, 9., Nova Prata. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2003. p. 68-76.

STAPE, J.L. Manejo de *Eucalyptus* spp. para desdobro frente aos avanços silviculturais de produção. In: SEMINÁRIO SOBRE PROCESSAMENTO E UTILIZAÇÃO DE MADEIRAS DE REFLORESTAMENTO 4., 1996, Curitiba. **Anais...** Curitiba: ABPM; SBS, 1996. v. 1, p. 17-28.

STREET, H.E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. Oxford: Blackwell Scientific, 1977. 507 p.

STURION, J.A.; RESENDE, M.D. Programa de melhoramento genético da erva-mate no Centro Nacional de Pesquisa de Florestas da Embrapa. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1.; REUNIÃO TÉCNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 2000, Curitiba. **Anais...** Colombo: Embrapa, CNPF, 1997. p. 285-297. (Embrapa. CNPF. Documentos, 33).

SWAIN, T. An overview of the status of cold tolerant eucalypt trials in South Africa. In: CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTUS, 1997, Salvador. **Anais...** Colombo: IUFRO, 1997. p. 69-76.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 2<sup>nd</sup> ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 719 p.

TAVARES, F.R.; PICHET, J.A.; MASCHIO, L.M.A. Alguns fatores relacionados com a estaquia da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL – Florestas: Desenvolvimento e Conservação, 7., 1992, Nova Prata. **Anais...** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1992. v. 2, p. 626-640.

THORPE, T.A. Organogenesis in vitro: structural, physiological, and biochemical aspects. In: VASIL, I.K. (Ed.). **Perspectives in plant cell and tissue culture**. New York: Academic Press, 1980. p. 71-111.

TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia**. 2001. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

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.

VALLEDOR, L.; HASBÚN, R.; MEIJÓN, M.; RODRÍGUEZ, J.L.; SANTAMARÍA, E.; VIEJO, M.; BERDASCO, M.; FEITO, I.; FRAGA, M.F.; CAÑAL, M.J.; RODRÍGUEZ, R. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 91, p. 75-86, 2007.

WATT, M. P.; BERJAK, P.; MAKHATHINI, A.; BLAKEWAY, F. In vitro field collection techniques for Eucalyptus micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 233-240, 2003.

WENDLING, I. **Propagação clonal de híbridos de Eucalyptus spp. por miniestaquia**. 1999. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1990.

WENDLING, I.; PAIVA, H.N. de; GONÇALVES, W. **Técnicas de produção de mudas de plantas ornamentais**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2005. 223 p. (Coleção Jardinagem e Paisagismo, Série Produção de Mudas Ornamentais, 3).

WENDLING, I.; FERRIANI, A.P. ; BIASSIO, A. ; HEBERLE, M. Miniestacas de origem juvenil e adulta e concentrações de ácido indolbutírico na miniestaquia de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, REUNIÓN TÉCNICA DE LA YERBA MATE, 4.; EXPOSICIÓN DE AGRONEGOCIOS DE LA YERBA MATE, 2., 2006, Misiones. **Anais...** Posadas: Instituto Nacional de la Yerba Mate, 2006. v. 1, p. 189-193.

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

XAVIER, A.; SANTOS, G.A. Clonagem em espécies florestais nativas. In: ROCHA, M.G.B. **Melhoramento de espécies arbóreas nativas**. Belo Horizonte: IEF, 2002. p. 29-40.

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

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

YONQI, Z.; HUORAN, W.; RONGGUI, Z.; QINGSHENG, M. Trials of Eucalyptus smithii and other eucalypt species in Yunnan province, China. In: BROWN, A.G. (Ed.). **Australian tree species research in China**. Canberra: ACIAR, 1994. p. 116-122. (ACIAR. Proceedings, 48).

ZIMMERMANN, M.; BROWN, C.L. **Trees structure and function**. New York: Spring Verlag, 1974. 336 p.

ZOBEL, B., TALBERT, J. **Applied forest tree improvement**. New York: North Carolina State University, 1984. 505 p.