

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

**Otimização da multiplicação de brotações de *Eucalyptus globulus*
Labill. *in vitro***

Murilo Vieira Gabriel

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

**Piracicaba
2009**

**Murilo Vieira Gabriel
Engenheiro Florestal**

Otimização da multiplicação de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro*

**Orientador:
Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES**

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

**Piracicaba
2009**

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

Gabriel, Murilo Vieira

Otimização da multiplicação de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro* / Murilo Vieira Gabriel. - - Piracicaba, 2009.
101 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Brotação 2. Crescimento vegetal 3. Eucalipto 4. Fertilização "in vitro" 5.
Micropropagação vegetal 6. Nutrição vegetal I. Título

CDD 634.9734
G118o

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

Aos meus pais Braz Gabriel e Célia Vieira Gabriel pelo APOIO e AMOR, sem os quais não teria forças para a realização deste trabalho;

À minha irmã Ana Clara e ao meu sobrinho João Miguel pelo CARINHO;

Ao meu querido Avô Oswaldo (*in memoriam*), EXEMPLO DE VIDA;

Aos meus amigos de república: Bruno (Babuíno), César (Gubers), Patrick (Roco), Tiago (Porca), Miguel (Cabotxá), Arthur (Kuringa) e Daniel (Da-lua) pela AMIZADE e pelos BONS MOMENTOS compartilhados;

À minha namorada Petra (Forga) pelo AMOR e CARINHO;

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao professor Antônio Natal Gonçalves pela orientação e amizade;

Aos Engenheiros da VCP Celina Ferraz do Valle, César Bonine e Edimar Scarpinati pelo incentivo;

Aos amigos: Beto (técnico do LAFISA), Maria Rita Chang, Lucimara, Cedric (Gerd), Alexandre (Madruga), Aline (Voadeira), Karen (Pastinha) e a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta dissertação de Mestrado;

Ao Rio Paraná (Ilha Solteira) e aos teus magníficos peixes, responsáveis pelos momentos de descontração e divertimento;

Muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 DESENVOLVIMENTO	12
2.1 Revisão bibliográfica	12
2.1.1 <i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	12
2.1.2 Propagação vegetativa e regeneração <i>in vitro</i>	13
2.1.2.1 Multiplicação de gemas	16
2.1.3 Meio de cultura.....	17
2.1.3.1 Nutrientes minerais e crescimento <i>in vitro</i>	19
2.1.3.1.1 Nitrogênio.....	21
2.1.3.1.2 Fósforo.....	22
2.1.3.1.3 Cálcio.....	24
2.1.3.1.4 Magnésio.....	27
2.2 Materiais e métodos	28
2.2.1 Descrição geral dos experimentos	28
2.2.2 Material vegetal	28
2.2.3 Desinfestação dos explantes.....	29
2.2.4 Obtenção das brotações <i>in vitro</i>	30
2.2.5 Estabelecimento das culturas <i>in vitro</i>	31
2.2.6 Definição geral dos tratamentos.....	31
2.2.6.1 Variáveis analisadas	32
2.2.6.2 Análises estatísticas.....	33
2.2.7 Experimentos realizados	33
2.2.7.1 Experimento I	33
2.2.7.1.1 Definição dos tratamentos.....	33
2.2.7.1.2 Delineamento experimental.....	34
2.2.7.1.3 Análises estatísticas do crescimento das brotações em função de períodos de cultivo.....	34
2.2.7.2 Experimento II	35
2.2.7.2.1 Definição dos tratamentos.....	35

2.2.7.2.2	Delineamento experimental.....	35
2.2.7.2.3	Análises estatísticas do crescimento das brotações em função de períodos de cultivo.....	35
2.2.7.3	Experimento III	36
2.2.7.3.1	Definição dos tratamentos.....	36
2.2.7.3.2	Delineamento experimental.....	36
2.2.7.3.3	Análises estatísticas do crescimento das brotações em função de períodos de cultivo.....	37
2.3	Resultados e Discussão	37
2.3.1	Experimento I	37
2.3.1.1	Crescimento de brotações de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill. cultivados em diferentes tamanhos de explantes <i>in vitro</i> , em função do período de cultivo.....	37
2.3.1.1.1	Observações visuais	37
2.3.1.1.2	Efeito do tamanho do explante inicial.....	39
2.3.1.2	Crescimento de brotações de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill. cultivadas <i>in vitro</i> , em diferentes tamanhos de explantes, aos 28 dias de cultivo.....	44
2.3.2	Experimento II	47
2.3.2.1	Crescimento de brotações de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill. cultivados em diferentes concentrações de macronutrientes <i>in vitro</i> , em função do período de cultivo.....	47
2.3.2.1.1	Observações visuais	47
2.3.2.1.2	Efeito do nitrogênio	51
2.3.2.1.3	Efeito do fósforo	57
2.3.2.1.4	Efeito do cálcio	62
2.3.2.1.5	Efeito do magnésio.....	66
2.3.2.2	Crescimento de brotações de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill. cultivadas <i>in vitro</i> , em diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo.....	71
2.3.3	Experimento III	77
2.3.3.1	Crescimento de brotações de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill. cultivados em diferentes concentrações de macronutrientes <i>in vitro</i> , em função do período de cultivo.....	77
2.3.3.1.1	Observações visuais	77
2.3.3.1.2	Efeito do nitrogênio e do cálcio	80

2.3.3.2	Crescimento de brotações de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill. cultivadas <i>in vitro</i> , em diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo.....	85
3	CONCLUSÕES	91

RESUMO

Otimização da multiplicação de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro*

O objetivo deste estudo foi otimizar a multiplicação de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill., por meio da definição do tamanho de explantes iniciais e de ajustes de nutrientes minerais do meio de cultura. Os meios de cultura utilizados foram o JADS (CORREIA et al., 1995), JADS modificado e o MS. Os tamanhos dos explantes foram definidos por suas massas frescas iniciais e classificados em T₁ (0,1430g), T₂ (0,2685g) e T₃ (0,5180g). Inicialmente, os ajustes dos nutrientes minerais foram realizados de forma individual para cada nutriente e concentração utilizados: nitrogênio (NH₄NO₃), com suplementação de 45,0 (N₁) e 65,0 (N₂) mmol L⁻¹; fósforo (KH₂PO₄), com suplementação de 1,0 (P₁) e 2,0 (P₂) mmol L⁻¹; cálcio (CaCl₂.2H₂O), com suplementação 7,5 (Ca₁) e 10,0 (Ca₂) mmol L⁻¹; e Magnésio (MgSO₄.7H₂O), com suplementação de 1,5 (Mg₁) e 4,5 (Mg₂) mmol L⁻¹. Com base nos resultados iniciais, novos ajustes para nitrogênio e cálcio foram realizados: nitrogênio (NH₄NO₃) e cálcio (CaCl₂.2H₂O), com suplementação de 45,0 e 7,5 mmol L⁻¹ (N₁Ca₁), respectivamente, e suplementação de 60,0 e 7,5 mmol L⁻¹ (N₂Ca₁), respectivamente. Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente aleatorizado (DIA); com 3 tratamentos e 4 repetições (tamanho do explante); 10 tratamentos e 3 repetições (ajuste inicial de nutrientes minerais) e 4 tratamentos e 6 repetições (ajuste final de nutrientes minerais). As características de crescimento, massas fresca e seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo (%) das brotações foram avaliadas semanalmente, durante os 28 dias de cultivo *in vitro*. As características de crescimento das brotações foram pouco afetadas pelo tamanho do explante inicial; no entanto, apresentaram deformações morfológicas em altas concentrações de nitrogênio. Todos os tratamentos apresentaram incrementos de massas seca e fresca. As porcentagens de massa seca foram menores nos tratamentos com maiores concentrações de nitrogênio (MS, N₂ e N₂Ca₁). As maiores taxas de crescimento relativo foram observadas aos 7 dias de cultivo, e decresceram ao longo do período estudado. O meio de cultura JADS, apresentou crescimento das brotações considerado ótimo, porém não máximo. O meio de cultura MS apresentou crescimento das brotações fora dos padrões considerados ótimo e máximo. O meio de cultura JADS modificado, contendo 45,0 (N), 3,0 (P), 7,5 (Ca) e 3,0 (Mg), apresentou crescimento máximo das brotações e próximo ao ótimo.

Palavras-chave: Ajustes nutricionais; *Eucalyptus globulus*; Cultivo *in vitro*; Multiplicação de brotações; Crescimento máximo e ótimo

ABSTRACT

Optimization of *Eucalyptus globulus* Labill. shoot multiplication *in vitro*

The aim of this work was to optimize *Eucalyptus globulus* Labill. shoot multiplication *in vitro* through the definition of the initial explant size and the adjustment of mineral nutrients in the culture media. The culture media utilized were JADS (CORREIA et al., 1995), modified JADS and MS. The explants fresh weight were 0.1430 g (T₁); 0.2685 g (T₂) and 0.5180 g (T₃). Initially, the mineral nutrient and concentrations utilized were: nitrogen (NH₄NO₃) with 45.0 (N₁) and 60.0 (N₂) mmol L⁻¹; phosphate (KH₂PO₄) with 1.0 (P₁) and 2.0 (P₂) mmol L⁻¹; calcium (CaCl₂.2H₂O) with 7.5 (Ca₁) and 10.0 (Ca₂) mmol L⁻¹ and magnesium (MgSO₄.7H₂O) with 1.5 (Mg₁) and 4.5 (Mg₂) mmol L⁻¹. Based on the initials results, new adjustments were made for nitrogen and calcium, and the concentrations utilized were (NH₄NO₃) and (CaCl₂.2H₂O) with 45.0 and 7.5 mmol L⁻¹ (N1Ca1) and 60.0 and 7.5 mmol L⁻¹ respectively. All the tests were carried out in a completely randomized design; with 3 treatments and 4 replicates (explant size); 10 treatments and 3 replicates (initial adjustment of mineral nutrients) and 4 treatments and 6 replicates (final mineral nutrient adjustment). The shoot growth characteristics, fresh and oven dry weight, oven dry weight percentage and relative growth rate were evaluated weekly for 28 day culture period. The explant initial size had little effect on the shoot growth characteristics. All the treatments with mineral nutrient adjustments showed fresh and oven dry weight increase. The oven dry weight percentage were lower in the treatments with high nitrogen concentrations (MS, N₂ and N₂Ca₁). The highest relative growth rates were observed at the 7th day evaluation and lowered along the culture period. The JADS culture medium showed shoot growths considered optimum but not maximum. The MS culture medium showed shoot growths not considered optimum or maximum. The adjusted culture media with 45.0 (N), 3.0 (P), 7.5 (Ca) and 3.0 (Mg) showed shoot growth considered maximum and almost optimum.

Keywords: Mineral nutrient adjustments; *Eucalyptus globulus* Labill.; Culture *in vitro*; Shoot multiplication; Optimum and maximum growth

1 INTRODUÇÃO

A micropropagação de espécies florestais destaca-se entre as técnicas utilizadas na propagação de mudas, estando intimamente associada aos conhecimentos provenientes das áreas de fisiologia e bioquímica. Sua aplicação possibilita o estabelecimento de um programa de clonagem e multiplicação *in vitro*, destacando-se por inúmeras vantagens, como: multiplicação em rápida e larga escala de genótipos superiores, obtenção de grandes e rápidos ganhos genéticos, produção em massa de plantas superiores e rejuvenescimento (SHARMA; RAMAMURTHY, 2000; SOBROSA; CORDER, 2003; WATT et al., 2003; CORREIA, 2006; SOLETO; MONZA, 2007).

Além dos hormônios, um dos fatores que mais influencia e determina o rendimento da produtividade *in vitro* é o equilíbrio nutricional do meio de cultura e a sua interação com o material genético ou explante (CORREIA, 2006). Sob circunstâncias *in vitro*, o crescimento da planta depende dos elementos minerais e dos componentes orgânicos do meio, devido à baixa taxa de fotossíntese e à pequena área foliar das plantas. Assim, a escolha destes componentes minerais e orgânicos é muito importante (LUMSDEN; PRICE; LEIFERT, 1990).

Os meios de cultura utilizados na propagação *in vitro* são em grande parte baseados em modificações empíricas de formulações básicas (RAMAGE; WILLIAMS, 2002b; KANASHIRO, 2005; KANASHIRO et al., 2007). Ademais, em muitos estudos, apenas uma formulação é utilizada durante a cultura, embora esta decisão possa não ser a ideal para as diferentes fases de crescimento e desenvolvimento das brotações (RAMAGE; WILLIAMS, 2002a; KANASHIRO, 2005).

A determinação das variações na composição de nutrientes do meio de cultura para o crescimento dos explantes possibilita obter informações importantes que podem ser aplicadas à melhoria do meio nutritivo, objetivando o crescimento máximo e ótimo das brotações (INGESTAD; ÅGREN, 1995).

Assim, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar a otimização e a eficiência da multiplicação de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill., mediante a utilização de explantes de diferentes tamanhos e de diferentes concentrações de

nitrogênio, fósforo, cálcio e magnésio no meio de cultura. Como objetivo específico, buscou determinar o melhor meio de cultura, em vista das concentrações testadas, para a multiplicação de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro*.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 *Eucalyptus globulus* Labill.

O *Eucalyptus globulus* Labill. é de ampla distribuição, chegando a constituir quase a totalidade dos plantios de eucalipto no Chile e em Portugal, onde são explorados de forma intensiva em virtude dos excelentes atributos tecnológicos de sua madeira para obtenção de celulose (DEL PONTE et al., 2001). Tem sido largamente cultivado em regiões de inverno chuvoso e temperaturas relativamente baixas, ocupando cerca de 22% da área total de *Eucalyptus* no mundo (XAVIER et al., 2007). Esta espécie destaca-se por possuir características como alta densidade, baixo teor de lignina e baixo consumo específico, o que promove maior rendimento e economia no processo industrial (PEREIRA et al., 1995). Espanha, Marrocos, China, Uruguai, Argentina e Austrália também se destacam como os principais produtores de madeira de *Eucalyptus globulus* Labill. para fins industriais (DEL PONTE et al., 2001).

No Brasil, desde as primeiras introduções de *Eucalyptus globulus* Labill. no Estado do Rio Grande do Sul, observou-se bom crescimento, graças às condições climáticas mais favoráveis ao seu cultivo, as quais não são encontradas nas regiões de clima quente (SHIMIZU, 1986). Nesta região, tem sido crescente o plantio desta espécie em grande escala para fins industriais, bem como sua utilização em programas de melhoramento genético, via hibridação com espécies mais produtivas, para incorporação de características de qualidade de matéria-prima para celulose (DEL PONTE et al., 2001).

Xavier et al. (2007), estudando a resistência de *Eucalyptus globulus* Labill. à ferrugem (*Puccinia psidii*), relata que, no Brasil, esta espécie tem sido hibridizada com outras climaticamente mais adaptadas, visando também aumentar o rendimento de celulose e reduzir o teor de lignina.

Quanto à produção de mudas, a técnica de propagação assexuada mais simples e de baixo custo para a formação de florestas clonais tem sido o enraizamento de estacas. Entretanto, várias espécies apresentam baixa herdabilidade de enraizamento, com índices inferiores aos desejados em programas de propagação vegetativa (HARTNEY, 1980). De acordo com Sasse (1995), os índices de enraizamento de estacas de *Eucalyptus globulus* Labill. variam de 5 a 90%, com média de 47% de enraizamento, em virtude da variabilidade genética dos diferentes clones, os quais apresentam diferentes aptidões ao enraizamento. Nesse contexto, há muito se tem estudado técnicas alternativas de propagação, e a micropropagação, via proliferação de gemas axilares, tem-se mostrado uma ferramenta de grande utilidade para a produção de mudas comerciais ou matrizes doadoras de estacas ou miniestacas (DEL PONTE et al., 2001).

2.1.2 Propagação vegetativa e regeneração *in vitro*

Devido à crescente demanda de produtos florestais, há necessidade de desenvolvimento de técnicas visando o aumento de produtividade das florestas (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000). Dentre os métodos de propagação vegetativa, a estaquia constitui uma das técnicas cujos princípios já estão bem conhecidos para espécies do gênero *Eucalyptus*, tendo, portanto, ampla adoção na clonagem de árvores destas espécies, o que permitiu o desenvolvimento da silvicultura clonal de forma intensiva em diversas partes do mundo (XAVIER, 2002). Além disso, a estaquia constitui técnica sobre a qual se tem, atualmente, o maior domínio e conhecimento científicos, representando um dos maiores avanços tecnológicos na área florestal (ALMEIDA; XAVIER; DIAS, 2007).

De acordo com Santos et al. (2005), os avanços da tecnologia de propagação vegetativa de *Eucalyptus*, decorrentes do atual desenvolvimento da silvicultura clonal obtido nos últimos anos, despertaram interesses concernentes à avaliação da eficiência das técnicas de produção de mudas, bem como ao desenvolvimento destas no campo. Segundo estes autores, a propagação clonal de *Eucalyptus*, pelas técnicas de miniestaquia e microestaquia, é uma realidade em várias empresas florestais,

constituindo estratégia eficaz por aliar a qualidade da muda à redução dos custos de produção.

Segundo Almeida, Xavier e Dias (2007), a estaquia constituiu um marco na evolução da produção de mudas de espécies florestais, principalmente para o gênero *Eucalyptus*, a qual permitiu o crescimento da silvicultura clonal de forma intensiva em diversas partes do mundo. Devido ao impacto no setor florestal, essa técnica assumiu posição de destaque, despertando o interesse de empresas e pesquisadores, com consequente busca de aprimoramentos e inovações tecnológicas (TITON et al., 2003). Entretanto, alguns materiais vegetativos apresentam dificuldades de propagação via técnica de estaquia, principalmente relacionadas ao enraizamento de árvores adultas, ao baixo índice de enraizamento em certos clones e à baixa qualidade do sistema radicial, sendo necessária a execução de outros métodos de propagação vegetativa a fim de contornar esses problemas (BRONDANI, 2008).

Dentre as várias técnicas, a micropropagação vem obtendo grande destaque na cultura de tecidos com aplicação no setor florestal (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000) e tem se apresentado como uma ferramenta de grande utilidade para a produção de mudas comerciais ou matrizes doadoras de estacas ou miniestacas (DEL PONTE et al., 2001). Tal importância está relacionada à possibilidade de propagar genótipos desejáveis sem a perda da árvore matriz, obtendo-se alta taxa de multiplicação com o uso da reversão à juvenilidade, reduzindo-se o tempo para obtenção deste genótipo e estabelecendo-se alternativas à estratégia de melhoramento genético (GONÇALVES, 1982).

Além disso, a miniestaca, obtida de mudas micropropagadas, aclimatadas em casa de vegetação, apresenta, para alguns clones, maior capacidade de enraizamento do que as estacas convencionais. Este método tem sido integrado ao processo produtivo de mudas clonais de materiais selecionados, com vários estudos sendo conduzidos para a otimização desta técnica e consequente superação de algumas limitações (XAVIER; COMÉRIO; IANNELLI, 1997).

A utilização comercial da micropropagação é uma realidade em diversos países do mundo, com destaque para a Europa Ocidental e os Estados Unidos (KANASHIRO

et al., 2007). A bibliografia existente sobre esta técnica em *Eucalyptus* tem abordado principalmente a busca de combinações hormonais e meios nutritivos adequados para cada etapa do processo (inoculação do explante, multiplicação de gemas, alongamento e enraizamento) e para cada espécie em particular. Segundo Larson et al. (2006), os primeiros relatórios de micropropagação de *Eucalyptus* foram realizados por Fossar, em 1974, na Austrália, e Franclet e Boulay, em 1982, na França. Esses trabalhos iniciaram-se em 1973, na empresa AFOCEL, França, com produção massiva de clones de *Eucalyptus* resistentes ao frio.

A regeneração via cultura de tecidos vegetais é basicamente influenciada pelo genótipo, meios de cultura, tipos de explantes e condições de cultura. O tipo de explante, bem como a definição de seu estágio de desenvolvimento é um dos fatores que determinam a capacidade de resposta *in vitro* (BRAVO, 2005).

Grande parte dos estudos *in vitro* em *Eucalyptus* tem sido direcionada para a otimização da clonagem de explantes oriundos de árvores adultas, o que normalmente é mais complicado, devido às dificuldades de descontaminação, adaptação e menor juvenilidade de tecidos maduros. Como alternativa, pode-se utilizar material juvenil, oriundo de sementes germinadas *in vitro*, em virtude da melhor assepsia e da rápida resposta das brotações a estas condições (HARTNEY, 1980).

Nos dias de hoje, a micropropagação de eucalipto tem sido utilizada no rejuvenescimento de clones, visando à formação e manutenção de microjardins clonais, os quais constituem a base para a produção de mudas pelo método da microestaquia (XAVIER; COMÉRIO, 1996). De acordo com Higashi, Silveira e Gonçalves (2000), as técnicas para manter ou reverter a juvenilidade são a “chave” para o sucesso de todo programa de melhoramento.

Diversos autores citam inúmeras vantagens da micropropagação em relação a outras formas de propagação de tecidos vegetais. Dentre as vantagens desta técnica destacam-se a manutenção do genótipo e do fenótipo, conhecimento sobre mutações ou variedades genéticas selecionadas, excelente estado fitossanitário das plantas obtidas (GIACOMETTI, 1990), rápida propagação clonal (CORREIA; GRAÇA, 1995; XAVIER; COMÉRIO, 1996), produção em massa geneticamente idêntica e

fisiologicamente uniforme (KOZAY; KUBOTA; JEONG, 1997), melhor desempenho de enraizamento, melhor qualidade do sistema radicular e maior velocidade de emissão das raízes (XAVIER; COMÉRIO, 1996; SANTOS et al., 2005; TITON; XAVIER; OTONI, 2006).

Titon (2001), avaliando a sobrevivência das mudas, aos 50 dias de idade, na saída da casa de vegetação, e o enraizamento, na saída da casa de sombra, em clones de *Eucalyptus*, observou resultados superiores com a microestaquia em relação à miniestaquia. Essa diferença mostrou-se mais pronunciada em clones com maior dificuldade de enraizamento, indicando, nesses casos, possível efeito de rejuvenescimento dos clones com o uso da microestaquia.

Watt et al. (1995), em estudos realizados com sete clones híbridos de *Eucalyptus*, propagados por estaquia e micropropagação, concluíram que, aos 36 meses de idade, para seis dos sete clones avaliados, as plantas produzidas pela micropropagação eram superiores às produzidas pela estaquia, com relação às características de sobrevivência, diâmetro (DAP), altura, incremento médio anual e uniformidade do plantio.

Xavier, Comério e Iannelli (1997), em estudo similar utilizando dez clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, avaliados aos 72 meses de idade, concluíram que sete dos dez clones testados apresentaram melhor desempenho silvicultural de material proveniente da micropropagação em relação à estaquia, para as características altura e diâmetro (DAP).

2.1.2.1 Multiplicação de gemas

A multiplicação de gemas constitui uma das etapas da micropropagação, sendo seu objetivo principal a obtenção de um maior número de brotações por meio de subcultivos sucessivos (DEBERGH; READ, 1990).

Segundo Bennett, McDavid e McComb (2003), existem alguns fatores importantes que contribuem para o sucesso da micropropagação de *Eucalyptus sp*, como estabilização da cultura *in vitro* por subcultivos sucessivos, composição do meio (mineral e hormonal) e um protocolo de cultura ajustado à espécie a ser estudada. Este

mesmo autor cita que, enquanto a multiplicação de brotações é bem sucedida na maioria das espécies, ocorrem frequentemente problemas quanto à produção de raízes, principalmente quando explantes provenientes de material adulto são utilizados.

De acordo com Correia et al. (1995), as taxas de multiplicação estão diretamente relacionadas ao potencial genético do material vegetal, às condições ambientais e microbianas para seu crescimento e ao valor nutricional do meio de cultura, bem como à sua capacidade de difusão.

No que diz respeito aos reguladores de crescimento para a estimulação e proliferação de gemas axilares, o BAP tem sido o mais utilizado em meio de cultura para as espécies de *Eucalyptus* (SANKARA-HAO; VENKATESWARA, 1985; TRINDADE et al., 1990; NICCOL; REGAN; DE FILLIPIS, 1994). Em culturas já estabelecidas *in vitro*, alguns fatores como tipo e tamanho do explante, frequência de subculturas e cuidados no procedimento de repicagem influenciam na multiplicação de gemas *in vitro* (CORREIA et al., 1995).

As vantagens que oferece o cultivo *in vitro* das espécies florestais são múltiplas. Tal técnica possibilita realizar uma multiplicação clonal massiva de plantas em um curto espaço de tempo e em qualquer época do ano (AQUINO, 1994). Segundo Hartney e Barker (1983), a multiplicação do *Eucalyptus globulus* Labill. é moderadamente fácil; no entanto, é de difícil enraizamento *in vitro*, mesmo quando os explantes utilizados são provenientes de mudas.

2.1.3 Meio de cultura

Os meios de cultura utilizados para o cultivo *in vitro* de plantas são compostos geralmente por íons minerais, sacarose, reguladores de crescimento e vários compostos orgânicos, contendo ou não agente geleificante (CORREIA, 2006). Segundo este autor, os meios de cultura diferem entre si pelas concentrações, fontes fornecedoras e essencialidade dos nutrientes minerais, basicamente.

De acordo com Amaral (2003), muitas das pesquisas realizadas com cultura de tecidos têm utilizado o meio MS, desenvolvido por Murashige e Skoog (1962). Tal meio caracteriza-se por apresentar concentração iônica total alta, sendo as concentrações de

nitrogênio, potássio, zinco e cloro mais elevadas quando comparadas a outros meios (LEIFERT; MURPHY; LUMSDEN, 1995). Segundo Leifert et al. (1991), o meio MS e suas adaptações representam, comercialmente, cerca de 50% da utilização na micropropagação.

Não existe meio universal para a cultura *in vitro*, levando-se em conta que as espécies vegetais e seus cultivares são geneticamente específicos (SARIĆ; MEZEI; RUŽIĆ, 1995). As exigências nutricionais consideradas ideais variam amplamente entre os genótipos das plantas e sistemas de cultivo (KANASHIRO, 2005). No entanto, os meios de cultura utilizados na propagação *in vitro* são em grande parte baseados em modificações empíricas de formulações básicas (RAMAGE; WILLIAMS, 2002b; KANASHIRO, 2005; CORREIA, 2006; KANASHIRO et al., 2007). Além disso, em muitas ocasiões, apenas um tipo de meio é utilizado durante a cultura, embora esta formulação possa não ser a ideal para as diferentes fases de crescimento e desenvolvimento das brotações (RAMAGE; WILLIAMS, 2002a; KANASHIRO, 2005).

De acordo com Williams (1995), o micro-ambiente químico *in vitro* pode ser considerado como tendo três fases principais: o meio de cultura, a atmosfera e o material vegetal. Sob circunstâncias *in vitro*, o crescimento da planta depende dos elementos minerais e dos componentes orgânicos do meio, devido à taxa muito baixa de fotossíntese e à pequena área foliar das plantas. Sendo assim, a escolha destes componentes minerais e orgânicos é muito importante (LUMSDEN; PRICE; LEIFERT, 1990).

Ramage e Williams (2002b) ressaltam que são poucos os estudos realizados com o intuito de esclarecer os efeitos da nutrição mineral no desenvolvimento de órgãos e morfogênese da planta. Fatores como o fornecimento, absorção, transporte e metabolismo dos diferentes minerais parecem variar entre os diferentes estágios de iniciação dos órgãos e do tecido meristemático e de crescimento (KANASHIRO, 2005).

A composição mineral de muitos meios é deficiente ou tem excesso de macronutrientes, induzindo, assim, crescimento anormal, vitrificação e outros efeitos indesejáveis (RUŽIĆ et al., 2000). Higashi e Gonçalves (2001) descrevem que os meios de cultura mais utilizados no cultivo *in vitro* de *Eucalyptus* são modificações do MS, de

Murashigue e Skoog (1962), JADS, de Correia et al. (1995) e Gonçalves (1980), sendo que tais meios diferem entre si pelas concentrações dos nutrientes.

O meio de cultura JADS, desenvolvido no Laboratório de Fisiologia das Árvores da Escola Superior de Agricultura de “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), é específico para o cultivo *in vitro* de *Eucalyptus grandis* Hill. A definição deste meio de cultura baseou-se em informações bibliográficas de teores de nutrientes minerais de *Eucalyptus grandis* Hill., os quais foram obtidos em diferentes estudos conduzidos com material juvenil (CORREIA, 2006).

Gribble et al. (2002), estudando a absorção mineral de clone híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis in vitro*, definiram um novo meio de cultura baseado na avaliação nutricional foliar deste clone. Segundo os autores, as brotações desenvolvidas no meio não apresentaram alguns sintomas como clorose, resultando em um balanço nutricional adequado e crescimento mais uniforme. No entanto, Correia (2006), em referência a este mesmo estudo, observa que modificações de concentração de nutrientes no meio de cultura nem sempre resultaram em mudanças similares nos tecidos das plantas. Estas diferenças, segundo o autor, poderiam estar relacionadas à existência de interações entre os nutrientes no meio de cultura.

2.1.3.1 Nutrientes minerais e crescimento *in vitro*

O crescimento das plantas depende de variáveis do ambiente como temperatura, intensidade de luz, disponibilidade de água e nutrientes minerais (CASTRO, 2007). Tais nutrientes possuem funções essenciais e específicas no metabolismo vegetal, podendo agir como constituintes da estrutura orgânica, ativadores de reações enzimáticas, carreadores de cargas e osmorreguladores (MARSCHNER, 1995).

Para que o desenvolvimento dos tecidos *in vitro* seja favorecido, a determinação da composição orgânica e mineral no meio de cultivo é especialmente importante, uma vez que os nutrientes precisam estar presentes em quantidades suficientes para manter seu crescimento e diferenciação (MAZZETTI; ROSATI; CASALICCHIO, 1991). Além disso, otimizando a composição mineral do meio de cultura, pode-se reduzir as

concentrações de reguladores de crescimento necessários para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* (RAMAGE; WILLIAMS, 2002b).

Gribble et al. (2002) mostraram que, apesar da importância da nutrição mineral no crescimento de plantas *in vitro*, poucos estudos abordam a absorção ou a otimização dos meios usados na cultura *in vitro*. A absorção é realizada pela planta para suprir as necessidades de seu metabolismo, que compreende os processos pelos quais estes nutrientes serão utilizados para seu crescimento e manutenção (EPSTEIN; BLOOM, 2006). De acordo com a teoria de Ingestad (1979), a absorção de cada nutriente influencia e é influenciada pelos outros (TORIBIO; PARDOS, 1989).

A absorção de nutrientes minerais em plantas depende da quantidade e da forma pela qual os íons estão disponíveis à planta, de sua interface com a fonte e da seletividade no processo de absorção. Os princípios básicos da absorção de nutrientes minerais aplicam-se para plantas cultivadas *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, diferenças nas condições fisiológicas e ambientais entre plantas *in vitro* e *in vivo* interferem nos processos de absorção. Tais diferenças relacionam-se com o ambiente químico e físico do meio de cultivo e às condições atmosféricas no frasco de cultura, especialmente quanto à umidade e ao tipo de material vegetal em cultivo (CORREIA, 2006).

O balanço nutricional de nitrogênio, fósforo e cálcio é essencial para a morfogênese e o crescimento, enquanto íons como potássio, magnésio e enxofre parecem exercer papel de suporte (KANASHIRO, 2005).

Ružić, Sarić e Čulafić (1997), estudando a cultura de cereja (cherry rootstock Gisela 5), observaram graves sinais de deficiência ocorrida após exclusões individuais de N, P e Ca do meio de cultura. Sendo assim, concluíram que o efeito dos elementos essenciais na nutrição mineral *in vitro*, sobre o crescimento ótimo vegetal, em fases específicas de cultivo, é de primordial importância.

Higashi (1996) obteve resposta semelhante ao avaliar deficiências nutricionais, induzidas *in vitro*, em três híbridos de *Eucalyptus*, constatando que as deficiências foram mais visíveis na ausência de macronutrientes.

Joshi et al. (2003) verificaram que brotações de *Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus grandis* apresentaram maior taxa de multiplicação de brotações em meio

MS completo, melhor alongamento e enraizamento das brotações alongadas em MS com a concentração dos sais reduzidos à metade, sem acréscimo de reguladores de crescimento e com adição de AIB ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$), respectivamente.

2.1.3.1.1 Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um constituinte elementar da nutrição das plantas. Possui função estrutural no vegetal, pois faz parte de muitos componentes da célula, como proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, enzimas, coenzimas, vitaminas e pigmentos, e participa de processos como absorção iônica, fotossíntese, respiração, multiplicação e diferenciação celular (CASTRO, 2007). Na biosfera, encontra-se disponível para as plantas em diferentes formas, incluindo o N molecular (N_2), amônia ou óxidos de N (NH_3 , NO_x), N mineral (NO_3^- e NH_4^+) e N orgânico, como aminoácidos e peptídeos (SHANTHARAM; MATTOO, 1997).

Os meios comumente utilizados para a cultura de tecidos vegetais apresentam diferentes concentrações de nitrogênio e, na maioria dos casos, o fornecimento de nitrogênio é inorgânico e se dá pela combinação de nitrato e amônio. No entanto, uma desvantagem que tem sido atribuída à utilização de altas concentrações de amônio ou sua utilização como única fonte de N, no meio de cultura, é a indução da vitrificação, principalmente nas espécies arbóreas (CAPALDI, 2002).

A deficiência de N inibe rapidamente o crescimento vegetal, provoca clorose nas folhas, sobretudo nas mais velhas, reduz a produção de folhas e dos perfilhos, diminui a área foliar (LAWLOR, 2002). A superfície para absorção de luz também é prejudicada, reduzindo o teor de clorofila e atividade da Rubisco e gerando, assim, baixas taxas de fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Capaldi (2002) avaliou diferentes fontes de nitrogênio em explantes de *Cryptomeria japonica in vitro*. Dez variações de concentrações de NO_3^- ($22,5 \text{ mmol L}^{-1}$ a $40,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e NH_4^+ ($0,0 \text{ mmol L}^{-1}$ a $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$) foram estabelecidas em meio de cultura básico MS, utilizando como fonte de nutriente NH_4NO_3 , KNO_3 ou $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, e variando apenas o nitrogênio total ($25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ a $60,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e as relações NO_3^- : NH_4^+ (2:1 a 26:0). As diferentes concentrações de NO_3^- e NH_4^+

influenciaram o crescimento das brotações, o incremento em massa seca e o conteúdo de carboidratos, proteínas e aminoácidos. A omissão do amônio favoreceu o aumento do crescimento das brotações, da massa seca e dos parâmetros bioquímicos, porém reduziu a produção de brotações. As concentrações de NO_3^- entre 22,5 e 31,0 mmol L^{-1} e de NH_4^+ até 5,0 mmol L^{-1} foram as mais efetivas para o crescimento e desenvolvimento das brotações.

O crescimento *in vitro* de *Pfaffia glomerata*, em meio de cultura MS solidificado, sem acréscimo de reguladores de crescimento e sob efeito de diferentes concentrações de nitrogênio (0,0; 15,0; 30,0; 60,0 e 90,0 mmol L^{-1}), foi avaliado por Russowski e Nicolosso (2003). Para tanto, utilizaram segmentos nodais com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, obtidos de culturas estabelecidas *in vitro*. Os resultados obtidos mostraram que no meio de cultura contendo 30,0 mmol L^{-1} de nitrogênio houve maior porcentual de explantes enraizados e maior número de raízes por explantes, 15 dias após a inoculação. Aos 40 dias de cultivo, o crescimento em altura das brotações, o número de segmentos nodais por explante, o índice de área foliar, o número de folhas, a massa seca da parte aérea e das raízes e a massa seca total do explante foram maiores em concentração próxima a 48 mmol L^{-1} de nitrogênio.

Higashi e Gonçalves (2006), estudando o efeito da omissão seletiva de nitrogênio no meio de cultura JADS líquido, em brotações de *Eucalyptus grandis* Hill., observaram, aos 21 dias de cultivo, uma redução 82,02% da massa seca e de 47% do teor de nitrogênio, em relação aos controles. Entre os macronutrientes, o nitrogênio foi o elemento que apresentou maior efeito na redução da biomassa, seguido das omissões seletivas dos micronutrientes ferro (45,98%) e zinco (46,76%).

2.1.3.1.2 Fósforo

O fósforo (P) é um elemento essencial para o crescimento das plantas e está envolvido na maioria dos processos metabólicos. É um componente integral de compostos como ésteres de carboidratos, fosfolipídios, coenzimas e ácidos nucleicos (RAGHOTHAMA; KARTHIKEYAN, 2005). Está envolvido em processos de armazenamento e transferência de energia e fixação simbiótica do N. Este nutriente

está relacionado com a formação rápida de raízes, a maturação acelerada de frutos, o aumento da frutificação e do teor de carboidratos, óleos, gorduras e proteínas. Em muitas espécies, o P é um nutriente bastante exigido na floração (MALAVOLTA, 2006).

Sua absorção se dá pela forma iônica H_2PO_4^- , sendo essa a forma preferencialmente acrescentada aos meios de cultura. Pode também ser adicionado ao meio a partir de fontes orgânicas, como o fosfato de sódio, glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato e adenosina (HELLER et al., 1968).

A deficiência de P pode produzir folhas amareladas como resultado da proteólise. Ângulo agudo entre caules e folhas, dormência de gemas laterais, redução do perfilhamento, senescência precoce e folhas menores podem ocorrer devido ao menor número de células (MALAVOLTA, 2006). Primeiramente, a limitação deste nutriente reduz a assimilação de CO_2 na fotossíntese e, após um período variável, diminui a produção de biomassa, reduz a fotossíntese e a condutância estomática (FUJITA et al., 2003).

De modo geral, os aspectos citológicos e metabólicos mais relevantes em plantas deficientes em P são a ocorrência de núcleos e cloroplastos pequenos, redução na síntese protéica, alto conteúdo de açúcares e alta pressão osmótica (MALAVOLTA, 2006).

Limitações no desenvolvimento dos tecidos *in vitro*, causadas por deficiência de fósforo (P), têm sido observadas por vários pesquisadores. Singha, Oberly e Townsend (1987), trabalhando com *Malus sp.* e *Pyrus communis*, verificaram que aproximadamente 50% do P inicial do meio era removido durante as primeiras seis semanas de cultivo. Mezzetti, Rosati e Casalicchio (1991) observaram que apenas 5,5% do P inicial permanecia no meio de cultura após 30 dias de cultivo com *Actinidia deliciosa*.

Ao investigar *Sinningia allgophylla*, utilizando o meio de cultura MS básico líquido, foram testadas diferentes concentrações de KH_2PO_4 (0,0; 0,0124; 0,124 e 1,24 mmol L^{-1}) no cultivo de segmentos nodais obtidos de plântulas germinadas *in vitro*, com o objetivo de avaliar a adaptação desta espécie às condições de cerrado. Aos 90 dias de cultivo, os resultados mostraram que maiores crescimentos foram alcançados na

maior concentração ou na ausência total de KH_2PO_4 , sugerindo que esta espécie apresenta eficiência na utilização de fósforo presente no meio de cultura MS e que a espécie utiliza os nutrientes armazenados em seus tecidos (GOMES; SHEPHERD, 2000).

O efeito de cinco concentrações de fósforo (0,0; 0,312; 0,625; 1,25 e 1,875 mmol L^{-1}) em meio de cultura MS solidificado ($0 \leq P \leq 150\%$ de fósforo em relação à concentração padrão do meio MS), sem acréscimo de reguladores de crescimento, foi avaliado utilizando segmentos nodais de *Pfaffia glomerata*, com aproximadamente 1,0 cm de comprimento, obtidos de culturas estabelecidas *in vitro*. Maior porcentual de explantes enraizados e maior número de raízes por explantes foram obtidos em meio de cultura suplementado com 0,625 mmol L^{-1} de fósforo, 15 dias após a inoculação. Aos 40 dias de cultivo, o crescimento em altura das brotações, o número de segmentos nodais por explante, o índice de área foliar, o número de folhas, a massa seca da parte aérea e das raízes e a massa seca total do explante foram maiores na concentração equivalente a 80% de P em relação à concentração padrão, próxima a 1,0 mmol L^{-1} de fósforo (RUSSOWSKI; NICOLOSSO, 2003).

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

2.1.3.1.3 Cálcio

O cálcio (Ca) é um cátion bivalente (Ca^{+2}), sendo o constituinte estrutural da lamela média das células (MASCHNER, 1995; BORGES; OLIVEIRA; SOUZA, 1997; AMARAL, 2003; TREVIZAM, 2005). Seus íons são considerados um modulador de muitas reações químicas e bioquímicas que ocorrem no desenvolvimento e crescimento de plantas (MARSCHNER, 1986). Está envolvido no funcionamento das membranas e na absorção iônica (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

O cálcio pode ser fornecido em altas concentrações, podendo atingir mais de 10% do peso seco, em folhas adultas, por exemplo, sem que ocorram sintomas de

toxicidade ou de inibição do crescimento da planta. As altas concentrações de Ca encontram-se na lamela média da parede celular, na superfície exterior da membrana plasmática, no retículo endoplasmático e no vacúolo (AMARAL, 2003). É encontrado principalmente nas folhas e, como possui mobilidade muito baixa, é detectado em maiores quantidades nas folhas velhas. Por se encontrar em sua maior parte na lamela média das paredes celulares como sais de compostos pécticos, sua concentração no citossol é baixa quando comparada à do vacúolo e de outras organelas (MASCARENHAS, 1977).

A baixa concentração de Ca em tecidos vegetais pode não acarretar sintomas, até que certa fase ou condição fisiológica ocorra, desencadeando, assim, processos metabólicos que expressem a deficiência (FERGUSON; DROBAK, 1988).

Sua deficiência é caracterizada pela redução de crescimento dos tecidos meristemáticos, pois este nutriente está envolvido na manutenção da integridade e da estabilidade da membrana e da expansão celular (MENGEL et al., 2001). Além de limitação do crescimento, tal deficiência está relacionada com a murcha e morte de gemas terminais e escurecimento das extremidades das raízes (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

Sintomas de toxidez por doses de cálcio não têm sido relatados com frequência na literatura. Segundo Bergman (1992), o excesso de cálcio pode ser observado principalmente através da clorose, mais comum em frutíferas e plantas ornamentais.

Calderon-Baltierra (1994) testou a influência de diferentes concentrações de cálcio (110,0; 220,0 e 440,0 mg L⁻¹) e de ácido giberélico (0,1 e 0,5 mg L⁻¹) no alongamento de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em meio de cultura MS. Brotações alongadas foram obtidas com 440 mg L⁻¹ de cálcio, com adição de 0,1 mg L⁻¹ de GA₃. Este procedimento resultou em melhorias na produtividade, na altura dos brotos e na taxa de enraizamento.

Higashi (1996), após 21 dias de cultivo *in vitro* de *Eucalyptus*, observou queda de folhas e ramos, e que a ausência de cálcio em soluções nutritivas ocasionou deformação e impariamento das folhas nos três híbridos estudados.

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

Mokotedi et al. (2000) observaram que maiores taxas de enraizamento de brotações *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus nitens* foram alcançadas quando as soluções de cálcio e de magnésio, em meio de cultura MS, foram reduzidas à terça parte cada uma e o meio foi suplementado com 0,5 mmol L⁻¹ de AIB.

Gribble et al. (2002) avaliaram a multiplicação de brotações *in vitro* de *Gypsophila paniculata*, em meio de cultura solidificado contendo soluções de macronutrientes de acordo com George et al. (1987), e de micronutrientes conforme orientação de Murashige e Skoog (1962), suplementado com reguladores de crescimento e cálcio em diferentes concentrações (0,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mmol L⁻¹). A massa fresca alcançou valor máximo entre as concentrações de 0,64 mmol L⁻¹ e 1,25 mmol L⁻¹ de cálcio, enquanto ganhos de massa seca foram observados até a concentração de 1,25 mmol L⁻¹.

Higashi e Gonçalves (2006) verificaram o efeito da omissão seletiva de cálcio, em meio de cultura JADS líquido, em brotações de *Eucalyptus grandis* Hill. Aos 21 dias de cultivo, verificaram redução de aproximadamente 15% da massa seca e de 86% do teor de cálcio em relação aos controles.

2.1.3.1.4 Magnésio

O Magnésio (Mg) é um cátion bivalente, estando envolvido em processos como síntese orgânica, balanço eletrolítico e estabilidade dos ribossomos. É ativador de muitas enzimas, ATPases, RNA polimerases, fosfatases, carboxilases, entre outras (DING; LUO; XU, 2006). Participa também da organização das membranas dos tilacóides, atua como um co-fator e ativador alostérico de enzimas envolvidas na fixação de CO₂ (HERMANS; VERBRUGGEN, 2004). É essencial para os cloroplastos, sendo o átomo central da molécula de clorofila e uma ponte de ligação entre as subunidades ribossomais necessárias para a síntese protéica (DING; LUO; XU, 2006). Também forma complexos ternários com enzimas, nos quais as pontes de cátions são necessárias para estabelecer uma geometria precisa entre enzima e substrato, como por exemplo a Rubisco (AMARAL, 2003).

A deficiência de Mg costuma causar clorose internerval das folhas, geralmente começando e sendo mais severa nas folhas mais velhas. Em algumas espécies observa-se necrose nas folhas e surgimento de cor alaranjada, vermelha ou roxa (MALAVOLTA, 2006).

Gomes e Shepherd (2000) testaram as variações das concentrações de MgSO₄.7H₂O (0,0; 0,015; 0,15 e 1,50 mmol L⁻¹), em meio de cultura MS líquido, no cultivo de *Sinningia allgophylla* germinadas *in vitro*. Aos 90 dias de cultivo, os resultados mostraram que os maiores crescimentos foram obtidos na concentração mais elevada ou na ausência de MgSO₄.7H₂O.

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

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Descrição geral dos experimentos

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

2.2.2 Material vegetal

Foram utilizados explantes provenientes de brotações coletadas de um povoamento de *Eucalyptus globulus* Labill., com procedência de Portugal, propagados por sementes em área de produção de sementes (APS). Tal povoamento foi implantado no dia 15 de janeiro de 1997 e está localizado no talhão 21, quadra B; situado na Estação Experimental de Itatinga (latitude de 23° 02' 01" S, longitude 48° 38' 34"), Itatinga - SP, pertencente à ESALQ/USP. O clima local é do tipo mesotérmico úmido, segundo classificação de Köppen, com temperatura média anual de 19,4 °C. A umidade relativa média anual é de 83,3% e a precipitação média anual é de 1635 mm. A vegetação natural original era o cerrado.

Para a emissão das brotações, foram selecionadas e cortadas, aleatoriamente, 5 árvores de *Eucalyptus globulus* Labill., a aproximadamente 20 cm do solo, sendo irrigadas antes e posteriormente ao corte. Das 5 árvores cortadas, somente 2 emitiram brotações, tendo sido utilizada para o preparo dos explantes (segmentos nodais) a que apresentou brotações mais vigorosas.

Realizou-se a coleta das brotações no período da manhã, com o auxílio de tesoura de poda afiada, utilizada no corte de miniestacas de *Eucalyptus sp.* em viveiros comerciais, a fim de minimizar os danos nos tecidos do material vegetal provenientes do corte. Tais brotações foram colocadas na posição vertical em recipientes plásticos contendo água, sendo estes acondicionados em caixa de isopor (Figuras 1A e 1B), para a condução até o LAFISA. Entre a coleta das brotações e a chegada ao laboratório levou-se, aproximadamente, três horas.

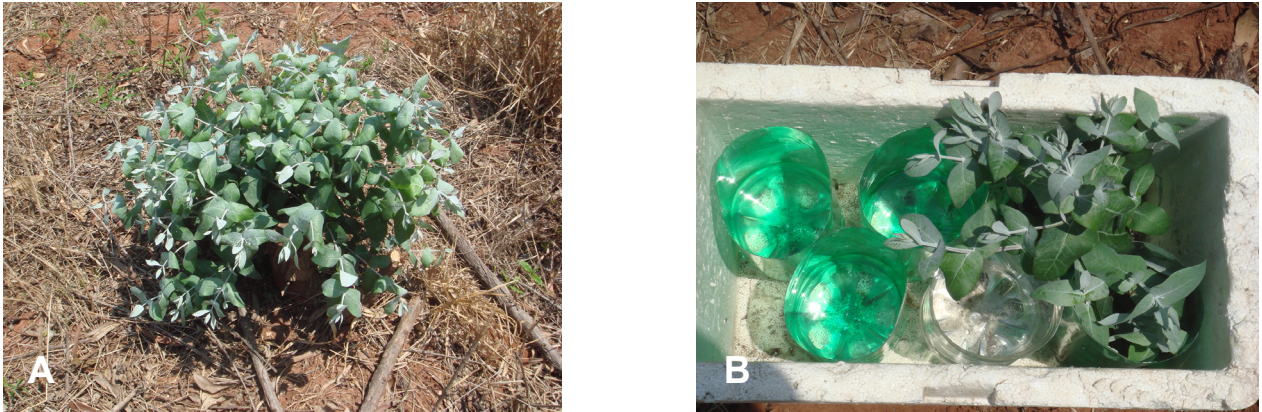


Figura 1 - (A) Brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. aos 25 dias após sua emissão; (B) recipientes plásticos utilizados na coleta e acondicionamento das brotações para transporte do material vegetal

2.2.3 Desinfestação dos explantes

Os explantes utilizados constituíram de segmentos nodais oriundos das brotações, os quais foram seccionados, medindo entre 1 a 2 cm de comprimento (Figura 2).



Figura 2 - Padrão do explante seccionado (segmento nodal), pronto para a desinfestação e inoculação *in vitro*. Barra = 1 cm

Para a desinfestação, os segmentos nodais foram colocados em recipiente plástico, com a boca tampada com uma gaze e amarrada com o auxílio de barbante; e lavados com água corrente pelo período de uma hora. Em seguida, os explantes permaneceram em solução de hipoclorito de sódio comercial (2-2,5% p/v de NaClO), durante 30 minutos, contendo 2% de cloro ativo, com adição de três gotas de Tween 20 para cada 100 mL de solução, sendo agitados na solução a cada 5 minutos. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, foram imersos em água destilada esterilizada, lavados por 5 vezes consecutivas e inoculados em meio de cultura.

2.2.4 Obtenção das brotações *in vitro*

Após a etapa de descontaminação superficial, os explantes foram inoculados em meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995), disponibilizados em tubos de ensaio de vidro transparente da marca Pyrex®, com capacidade volumétrica de, aproximadamente, 40 mL (Figura 3). Cada frasco, vedado com tampa de polipropileno, continha 10 mL de meio de cultura. Em câmara de fluxo laminar, inoculou-se um explante (segmento nodal) por tubo. Para a composição do meio de cultura, adicionou-se 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 6 g L⁻¹ de ágar Merck®. O pH do meio foi ajustado para 5,8 utilizando KOH 1N, antes do acréscimo do ágar, e sua esterilização deu-se em autoclave à temperatura de 121°C, sob pressão de 1,05 kg cm⁻², durante 20 minutos.



Figura 3 - Explantes (segmentos nodais) recém inoculados em meio de cultura JADS para a emissão de brotações. Barra = 1 cm

As brotações se desenvolveram após o período de 30 a 45 dias de cultivo, em sala de crescimento à temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12/12 horas (luz/escuro) e radiação ativa fotossintética (PAR) de $50 \text{ mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes Sylvânia®, branca fria, com 110 W cada uma e localizadas a 30 cm do nível em cada prateleira.

2.2.5 Estabelecimento das culturas *in vitro*

Aos 30 a 45 dias após a inoculação dos explantes, realizou-se a primeira transferência das brotações, oriundas das gemas axilares dos segmentos nodais. Foram transferidas quatro brotações por frasco de vidro transparente, com capacidade volumétrica de, aproximadamente, 250 mL e contendo 40 mL do mesmo meio de cultura, mesmo pH e mesmo sistema de esterilização utilizado para a inoculação dos segmentos nodais. Após 28 dias, realizou-se o primeiro subcultivo e assim sucessivamente, respeitando o mesmo intervalo de tempo, até o estabelecimento da cultura fornecedora das brotações (explante-padrão) para a instalação dos experimentos (Figuras 4A e 4B).

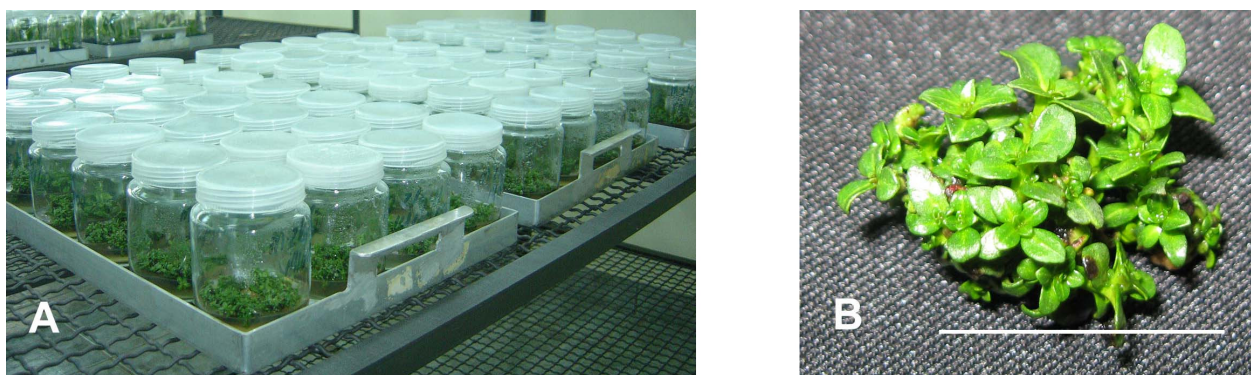


Figura 4 - (A) Estabelecimento da cultura fornecedora das brotações para a realização dos experimentos; (B) explante-padrão com 28 dias de cultivo. Barra = 1 cm

2.2.6 Definição geral dos tratamentos

O meio de cultura básico utilizado nos experimentos foi o meio JADS (Tabela 1), definido com base em informações sobre teores de nutrientes minerais obtidos em material jovem de *Eucalyptus grandis* Hill.

Tabela 1 - Fontes e concentrações de nutrientes minerais do meio de cultura JADS

Fontes de nutrientes	JADS	Nutriente	JADS
	mmol L ⁻¹		mmol L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	4	N	26,0
KNO ₃	8	P	3,0
KH ₂ PO ₄	3	K	11,0
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	5	Ca	5,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	3	Mg	3,0
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,2	S	3,29
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,2	B	0,05
H ₃ BO ₃	0,05	Cu	0,005
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,1	Fe	0,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,015	Mn	0,07
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0006	Zn	0,015
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005	Na	0,402
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,001	Co	0,001
		Cl	0,002
		Mo	0,0006
Íons totais			52,03

JADS (CORREIA et al., 1995)

2.2.6.1 Variáveis analisadas

Todas as variáveis analisadas nos experimentos correspondem ao crescimento das brotações. Essas variáveis são descritas a seguir.

a) Massa fresca: lavou-se todos os explantes (aglomerado de brotos), individualmente, com água destilada e deionizada, sendo, posteriormente, dispostos sobre uma toalha de papel absorvente. A pesagem, em mg, foi realizada em balança analítica eletro-mecânica, marca Metter.

b) Massa seca: colocou-se todos os explantes, individualmente, em embalagens de papel, sendo, posteriormente, levados para a estufa de secagem à temperatura de 60°C, e permanecendo até obter peso constante. A pesagem, em mg, foi realizada em balança analítica eletro-mecânica, marca Metter.

c) Porcentagem da massa seca: foi obtida por meio do seguinte cálculo: [massa seca da unidade experimental/massa fresca da unidade experimental] x 100.

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

2.2.6.2 Análises estatísticas

Para a realização dos cálculos estatísticos dos experimentos foi utilizado o Programa computacional de análises estatísticas e planejamento de experimentos SISVAR (Ferreira, 2000).

2.2.7 Experimentos realizados

2.2.7.1 Experimento I

2.2.7.1.1 Definição dos tratamentos

Os tratamentos foram compostos por explantes (aglomerado de brotos) de diferentes tamanhos, indicados na Tabela 2, sendo o JADS utilizado como meio básico de cultura (CORREIA et al., 1995). A realização deste experimento teve como objetivo definir o tamanho dos explantes utilizados nos experimentos seguintes.

Tabela 2 - Massa fresca média inicial, em gramas, de explantes (aglomerado de brotos) utilizados como tratamentos

Tratamentos	T ₁	T ₂	T ₃
Massa fresca média inicial (g)	0,1429	0,2684	0,5179

2.2.7.1.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado (DIA), composto por 3 tratamentos, 4 repetições e 5 períodos de avaliações, totalizando 60 unidades experimentais, dispostas em um esquema fatorial 3 x 5. Cada unidade experimental foi composta por 1 frasco contendo 4 explantes-padrão (aglomerado de brotos compactos e uniformes), totalizando 240 unidades observacionais (explantes-padrão).

2.2.7.1.3 Análises estatísticas do crescimento das brotações em função de períodos de cultivo

O crescimento das brotações foi analisado durante 28 dias de cultivo (0, 7, 14, 21, e 28). Em cada período, 4 unidades experimentais foram analisadas, totalizando 20 unidades experimentais por tratamento.

Realizou-se as avaliações das variáveis massa fresca, massa seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo. Efetuou-se a análise exploratória dos dados para averiguar as pressuposições de homogeneidade de variâncias, independência dos erros e distribuição normal dos erros. Posteriormente, as análises estatísticas dos resultados experimentais foram realizadas pela análise de variância da regressão, tendo como variáveis-respostas massa fresca, massa seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo e, como variável independente, o período de cultivo. Pelo fato dos tratamentos se iniciarem com medidas de massa diferentes entre si (Tabela 2), não foi possível avaliar os efeitos dos mesmos nas variáveis massas fresca e seca, mediante teste de comparações de médias. Sendo assim, os efeitos dos tratamentos nas variáveis porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo (%) foram avaliados mediante análise de variância e teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

2.2.7.2 Experimento II

2.2.7.2.1 Definição dos tratamentos

Os tratamentos indicados na Tabela 3 constaram de variações nas concentrações dos macronutrientes, com base no meio de cultura JADS, sendo os meios JADS e MS controles, com suas concentrações de sais originais.

Tabela 3 - Concentrações, em mmol L^{-1} , de macronutrientes utilizados como tratamentos

Macronutrientes	Meios de cultura (tratamentos)									
	MS	JADS	N ₁	N ₂	P ₁	P ₂	Ca ₁	Ca ₂	Mg ₁	Mg ₂
	mmol L^{-1}									
Nitrogênio (N)	60,0	26,0	45,0	60,0	26,0	26,0	26,0	26,0	26,0	26,0
Fósforo (P)	1,25	3,0	3,0	3,0	1,0	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Cálcio (Ca)	3,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	7,5	10,0	5,0	5,0
Magnésio (Mg)	1,5	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	1,5	4,5

Meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962); Meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995)

2.2.7.2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado (DIA), composto por 10 tratamentos, 3 repetições e 5 períodos de avaliações, totalizando 150 unidades experimentais, dispostas em um esquema fatorial 10 x 5. Cada unidade experimental foi composta por 1 frasco contendo 4 explantes-padrão (aglomerado de brotos compactos e uniformes), totalizando 600 unidades observacionais (explantes-padrão).

2.2.7.2.3 Análises estatísticas do crescimento das brotações em função de períodos de cultivo

O crescimento das brotações foi analisado durante 28 dias de cultivo (0, 7, 14, 21, e 28). Em cada período, 3 unidades experimentais foram analisadas, totalizando 15 unidades experimentais por tratamento.

Realizou-se as avaliações das variáveis massa fresca, massa seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo. Efetuou-se a análise exploratória dos dados para averiguar as pressuposições de homogeneidade de variâncias, independência dos erros e distribuição normal dos erros. Posteriormente, as análises estatísticas dos resultados experimentais foram realizadas pela análise de variância da regressão, tendo como variáveis-respostas massa fresca, massa seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo e, como variável independente, o período de cultivo. Os efeitos dos tratamentos nas variáveis estudadas foram avaliados mediante análise de variância e teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

2.2.7.3 Experimento III

2.2.7.3.1 Definição dos tratamentos

Os tratamentos indicados na Tabela 4 constaram de variações nas concentrações dos macronutrientes, com base no meio de cultura JADS, sendo os meios JADS e MS controles, com suas concentrações de sais originais.

Tabela 4 - Concentrações, em mmol L^{-1} , de macronutrientes utilizados como tratamentos

Macronutrientes	Meios de cultura (tratamentos)			
	MS	JADS	N ₁ Ca ₁	N ₂ Ca ₁
mmol L^{-1}				
Nitrogênio (N)	60,0	26,0	45,0	60,0
Fósforo (P)	1,25	3,0	3,0	3,0
Cálcio (Ca)	3,0	5,0	7,5	7,5
Magnésio (Mg)	1,5	3,0	3,0	3,0

Meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962); Meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995)

2.2.7.3.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente aleatorizado (DIA), composto por 4 tratamentos, 6 repetições e 5 períodos de avaliações, totalizando 120 unidades experimentais, dispostas em um esquema fatorial 4 x 5. Cada unidade experimental foi composta por 1 frasco contendo 4 explantes-padrão (aglomerado de

brotos compactos e uniformes), totalizando 480 unidades observacionais (explantes-padrão).

2.2.7.3.3 Análises estatísticas do crescimento das brotações em função de períodos de cultivo

O crescimento das brotações foi analisado durante 28 dias de cultivo (0, 7, 14, 21, e 28). Em cada período, 6 unidades experimentais foram analisadas, totalizando 30 unidades experimentais por tratamento.

Realizou-se as avaliações das variáveis massa fresca, massa seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo. Efetuou-se a análise exploratória dos dados para averiguar as pressuposições de homogeneidade de variâncias, independência dos erros e distribuição normal dos erros. Posteriormente, as análises estatísticas dos resultados experimentais foram realizadas pela análise de variância da regressão, tendo como variáveis-respostas massa fresca, massa seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo e, como variável independente, o período de cultivo. Os efeitos dos tratamentos nas variáveis estudadas foram avaliados mediante análise de variância e teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Experimento I

2.3.1.1 Crescimento de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivados em diferentes tamanhos de explantes *in vitro*, em função do período de cultivo

2.3.1.1.1 Observações visuais

A morfologia refere-se à forma e/ou estrutura da planta, podendo ser definida pelo formato externo do vegetal (SATTLER; RUTISHAUSER, 1997). Para Bell (1991), o estudo da morfologia é um instrumento utilizado para compreender a forma e a

estrutura das plantas em todos os seus níveis organizacionais, como órgãos, tecidos, células e moléculas. Já a morfogênese das plantas trata da dinâmica da geração e expansão de seus órgãos no tempo e no espaço, podendo ser expressa em termos de taxa de expansão (CHAPMAN; LEMAIRE, 1993).

Além das diferenças de ganhos de biomassa em função dos diferentes tratamentos, algumas características específicas dos explantes foram visualmente observadas, ao final dos 28 dias de cultivo (Tabela 5).

Tabela 5 - Características visuais das brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes tamanhos de explantes, aos 28 dias

Tratamentos (g)	Crescimento das brotações	Folha	Textura do tecido vegetal	Vigor
T₁ (0,1429)	<ul style="list-style-type: none"> ● Multiplicação homogênea e uniforme ● Crescimento médio 	● Médias	● Macia	● Bom
T₂ (0,2684)	<ul style="list-style-type: none"> ● Multiplicação homogênea e uniforme ● Crescimento médio 	● Médias	● Macia	● Bom
T₃ (0,5179)	<ul style="list-style-type: none"> ● Multiplicação homogênea e uniforme ● Crescimento médio 	● Médias	● Macia	● Bom

As características de crescimento das brotações nos tratamentos, aos 28 dias de cultivo, podem ser visualizadas na Figura 5.

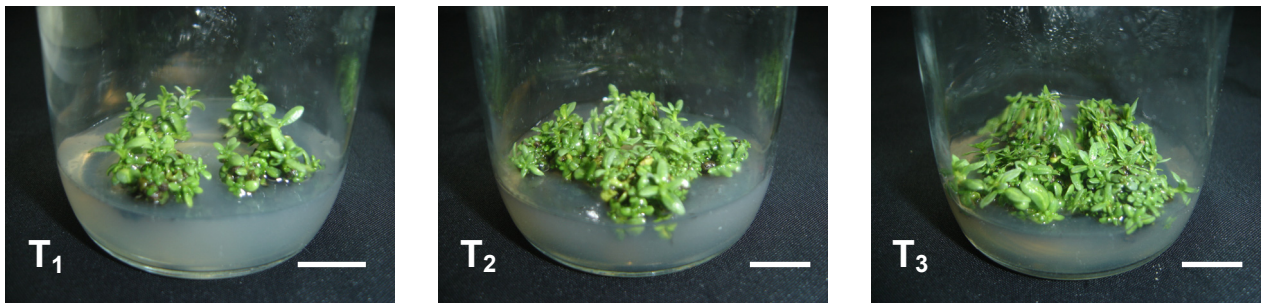


Figura 5 - Características do crescimento de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas em meio de cultura JADS, com diferentes tamanhos de explantes (aglomerado de brotações), aos 28 dias de cultivo *in vitro*. Em gramas: T₁= 0,1429; T₂ = 0,2684; T₃ = 0,5179. Barras = 1 cm

Segundo observações visuais, aos 28 dias de cultivo, não foi possível notar diferenças de crescimento entre os tratamentos T₂ e T₃, em função do tamanho dos explantes; no caso do tratamento T₁, no entanto, o incremento de massa fresca ao final dos 28 dias foi menor em relação aos demais, provavelmente devido ao tamanho reduzido do explante inicial utilizado. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), a fonte de variação do crescimento *in vitro* entre os explantes pode estar relacionada ao tamanho do explante inicial e à posição deste, quando seccionado no explante de origem.

2.3.1.1.2 Efeito do tamanho do explante inicial

2.3.1.1.2.1 Massas fresca e seca

Para as variáveis massa fresca e massa seca, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, demonstrou que os modelos linear ($p=0,0001$) e quadrático ($p=0,0001$) foram significativos para os tratamentos T₁ e T₂, e para o T₃, respectivamente (Figuras 6 e 7).

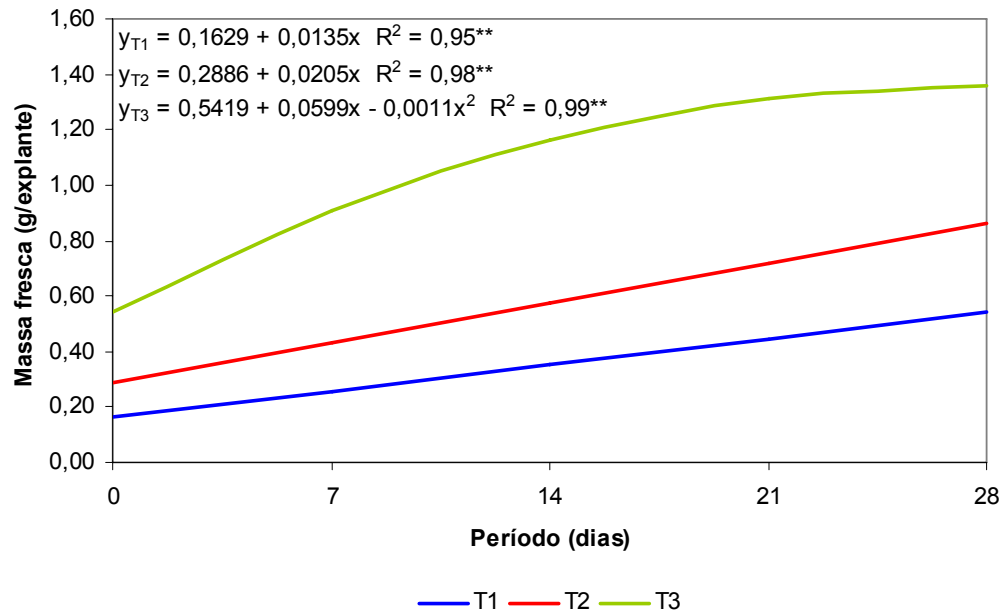


Figura 6 - Valores observados e funções ajustadas para a massa fresca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes tamanhos de explantes, em função do período de cultivo. Em gramas: $T_1 = 0,1429$; $T_2 = 0,2684$; $T_3 = 0,5179$. ****Significativo** ($p=0,0001$)

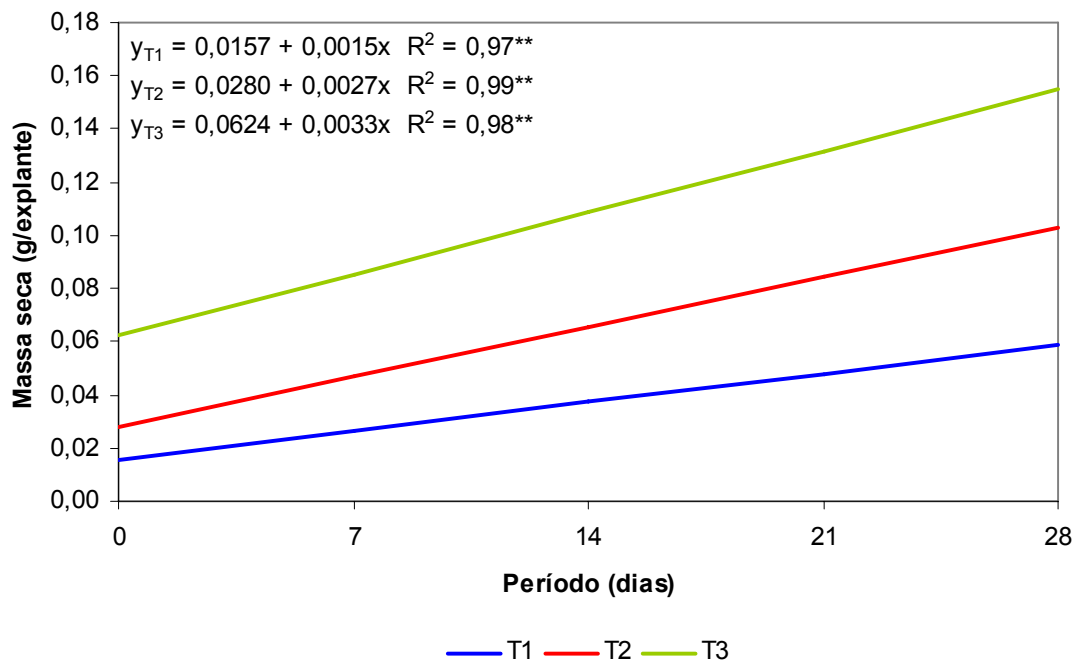


Figura 7 - Valores observados e funções ajustadas para a massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes tamanhos de explantes, em função do período de cultivo. Em gramas: $T_1 = 0,1429$; $T_2 = 0,2684$; $T_3 = 0,5179$. ****Significativo** ($p=0,0001$)

De acordo com os resultados obtidos, em todos os tratamentos houve incremento das massas fresca e seca das brotações, ao longo do período de cultivo (Figuras 6 e 7).

Do início ao final do período de cultivo, as brotações apresentaram incrementos percentuais de massas fresca e seca de 392,2 e 381,5, 26,1 e 355,3, 260,3 e 252,0, para os tratamentos T_1 , T_2 e T_3 , respectivamente. Além do tamanho inicial dos explantes, o crescimento das brotações pode estar associado às características da própria espécie, como, por exemplo, o grau de melhoramento, sendo que materiais geneticamente selecionados normalmente apresentam crescimento mais acentuado comparativamente aos que não passaram por etapas de melhoramento.

2.3.1.1.2.2 Porcentagem de massa seca

De acordo com a Figura 8, para a variável porcentagem de massa seca, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, demonstrou que o modelo cúbico ($p=0,0001$) foi significativo para todos os tratamentos.

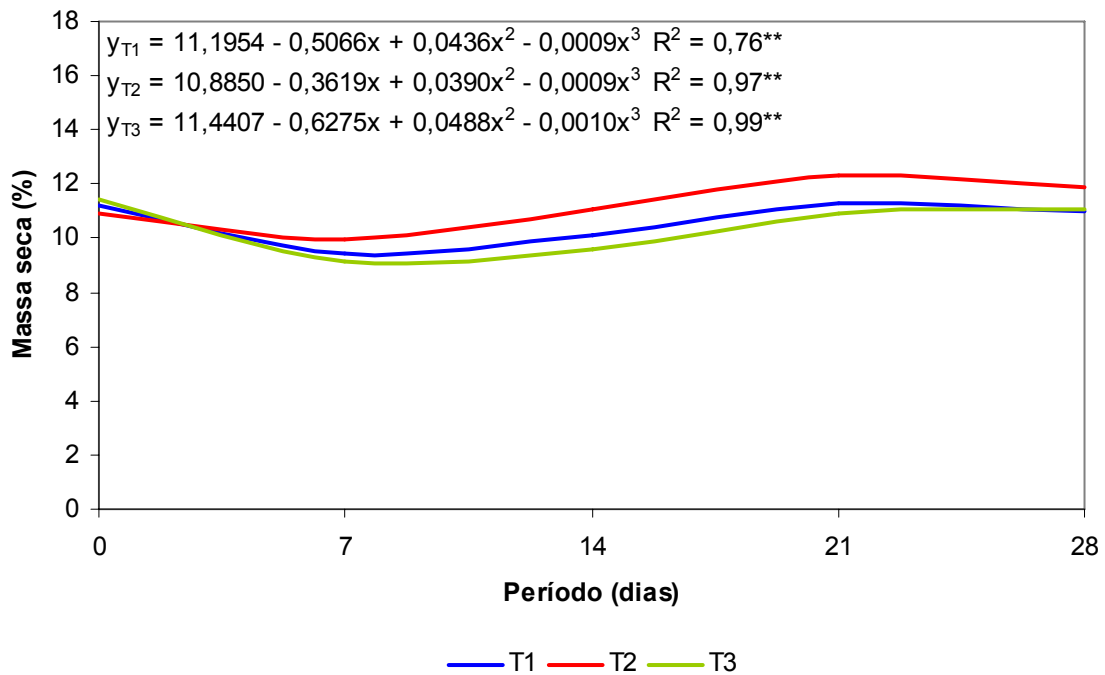


Figura 8 - Valores observados e funções ajustadas para a porcentagem da massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes tamanhos de explantes, em função do período de cultivo. **Significativo ($p=0,0001$)

A tendência das curvas indica que os valores de porcentagem de massa seca pouco variaram entre os diferentes tratamentos, durante o período de cultivo, sugerindo que diferentes tamanhos de explantes iniciais não resultam em grandes diferenças na porcentagem de massa seca. No entanto, as brotações do tratamento T₂ foram as que apresentaram maior porcentagem de massa seca, observada já a partir da primeira semana de cultivo (Figura 8).

2.3.1.1.2.3 Taxa de crescimento relativo (TCR)

De acordo com a Figura 9, para a variável taxa de crescimento relativo, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, demonstrou que o modelo linear ($p=0,0001$) foi significativo para todos os tratamentos.

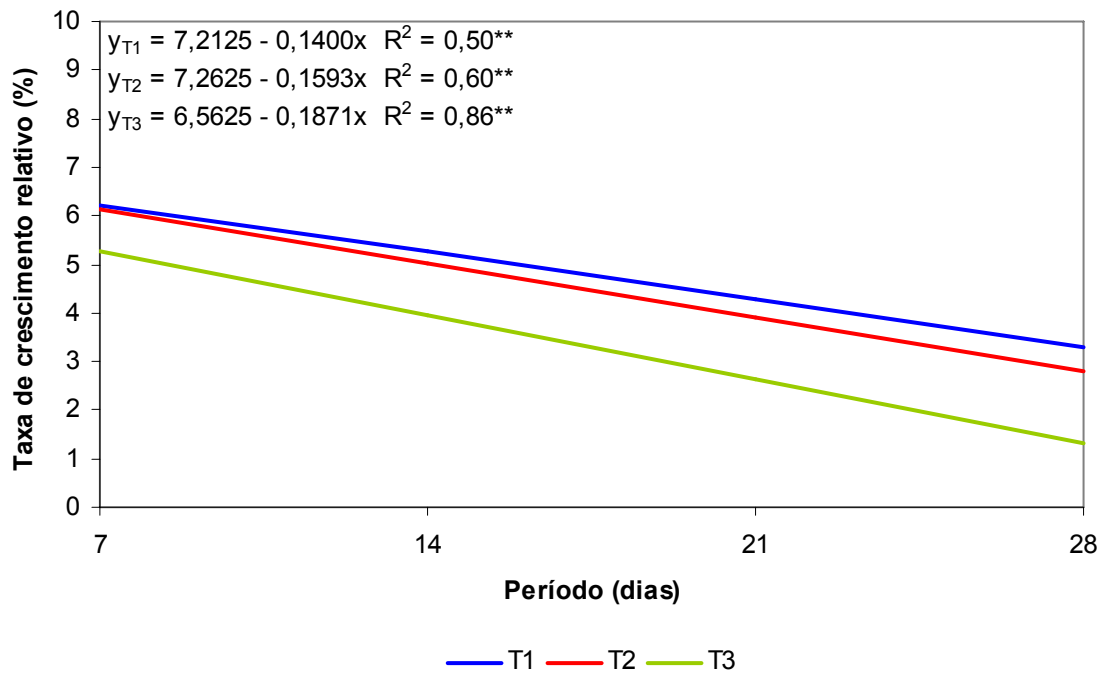


Figura 9 - Valores observados e funções ajustadas para a taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes tamanhos de explantes, em função do período de cultivo. ** Significativo ($p=0,0001$)

As maiores taxas de crescimento relativo foram observadas aos 7 dias de cultivo, sendo superiores em T₁ e T₂. A tendência das curvas sugere diminuição destas taxas ao longo do período estudado, apresentando os menores valores percentuais aos 28 dias de cultivo. Ao longo dos 28 dias, T₃ apresentou reduzidas taxas de crescimento relativo (Figura 9). Isto provavelmente ocorreu devido à elevada massa inicial dos explantes utilizados neste tratamento (em média 0,5179g), sugerindo déficit de nutrientes no meio de cultura para manutenção de maiores taxas de crescimento relativo neste tratamento.

2.3.1.2 Crescimento de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes tamanhos de explantes, aos 28 dias de cultivo

Os resultados da análise de variância para porcentagens de massa seca e de taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivados *in vitro* em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo, encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados das análises de variância para porcentagens de massa seca e de taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes tamanhos de explantes, aos 28 dias de cultivo

Fonte de variação	GL.	Quadrados médios	
		Massa seca (%)	Taxa de crescimento relativo (%)
Tratamentos	2	2,1258**	15,7658**
Resíduo	45	0,4449	1,2607
F		4,778**	12,506**
CV (%)		6,20	26,89

**Significativo pelo teste F, $p = 0,0001$

2.3.1.2.1 Porcentagem de massa seca

As médias de porcentagem de massa seca pouco variaram entre os tratamentos, não sendo significativas entre si (amplitude de 11,1 a 11,9%).

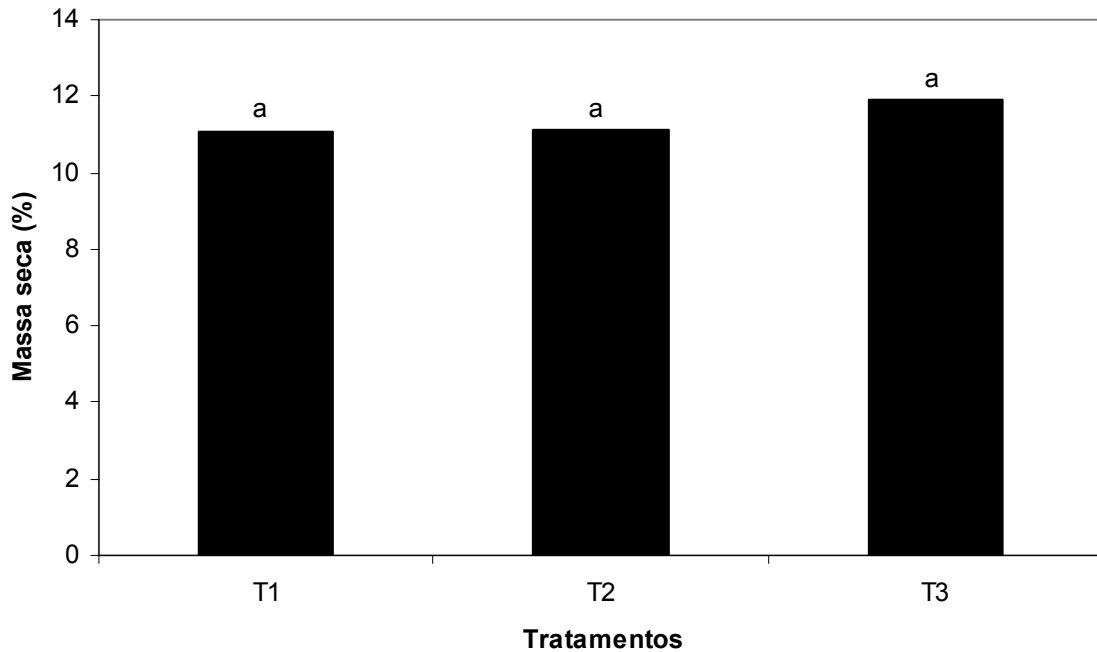


Figura 10 - Porcentagem de massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes em diferentes tamanhos de explantes, aos 28 dias de cultivo. Médias indicadas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Em gramas: $T_1= 0,1429$; $T_2 = 0,2684$; $T_3 = 0,5179$

Em nenhum dos tratamentos ocorreu hiperhidria, sendo que todas as brotações apresentaram características próximas às ideais para o cultivo *in vitro*. Sendo assim, a variação no tamanho inicial dos explantes não resultou em diferenças na relação massa seca/fresca (%) (Figura 10), independente das produções destas massas entre os tratamentos ao longo do período de cultivo.

2.3.1.2.2 Taxa de crescimento relativo

As médias observadas da taxa de crescimento relativo variaram de forma significativa entre os tratamentos, sendo maior em T_1 , seguido de T_2 e T_3 .

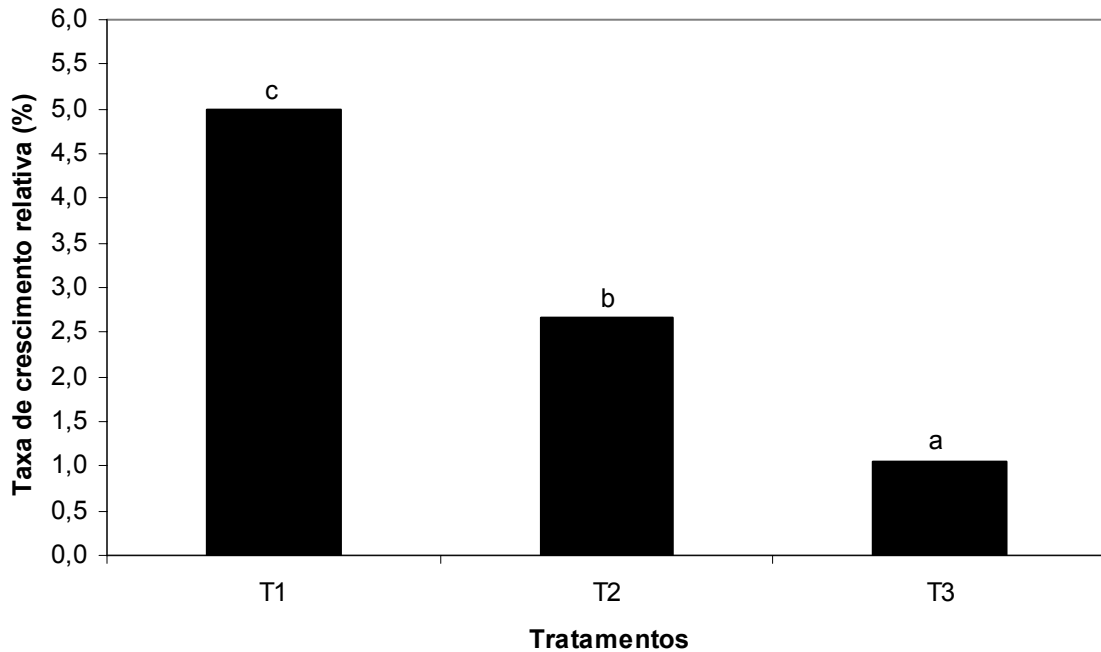


Figura 11 - Taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes tamanhos de explantes, aos 28 dias de cultivo. Médias indicadas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Em gramas: $T_1=0,1429$; $T_2=0,2684$; $T_3=0,5179$

As menores taxas de crescimento relativo foram encontradas nos tratamentos representados por explantes iniciais de maior massa fresca (T_3 e T_2) (Figura 11). Provavelmente, as brotações destes tratamentos entraram em competição por nutrientes, resultando na estabilização do crescimento das mesmas. Segundo Correia (2006), a redução do número de explantes ou o fornecimento de um volume maior de meio de cultura em cada unidade experimental poderia contribuir para o aumento da biomassa.

2.3.2 Experimento II

2.3.2.1 Crescimento de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivados em diferentes concentrações de macronutrientes *in vitro*, em função do período de cultivo.

2.3.2.1.1 Observações visuais

De acordo com os resultados dos diferentes tratamentos, a morfogênese foi afetada em função do macronutriente e da concentração utilizada (Figuras 12 e 13). Tais observações coincidem com as descritas no trabalho de Correia (2006), que estudou os efeitos dos macronutrientes no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* Hill. *in vitro*. Segundo este mesmo autor, para a melhoria do sistema de cultivo *in vitro* buscaram-se ganhos de biomassa e qualidade da cultura de tecidos. Assim, pretende-se um crescimento ótimo e máximo das brotações, que contribua para aumentar o rendimento nas fases de multiplicação e alongamento dessas brotações (CORREIA et al., 1995; RAMAGE; WILLIAMS, 2003).

Além das diferenças de ganhos de biomassa em função dos tratamentos, algumas características dos explantes foram visualmente observadas, ao final de 28 dias de cultivo *in vitro*. Estas observações estão reunidas na Tabela 7.

Tabela 7 - Características visuais das brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, sob diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias

Tratamentos (mmol L ⁻¹)	Crescimento das brotações	Tamanho das folhas	Textura do tecido vegetal	Vigor
MS*	<ul style="list-style-type: none"> • Multiplicação heterogênea e desuniforme • Crescimento intenso com ocorrência de brotos alongados 	<ul style="list-style-type: none"> • Médias e grandes 	<ul style="list-style-type: none"> • Maciez reduzida • Alta frequência de lâminas foliares encurvadas para baixo • Presença de folhas quebradiças (hiperhidria) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ruim
JADS**	<ul style="list-style-type: none"> • Multiplicação homogênea e uniforme • Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequenas e médias 	<ul style="list-style-type: none"> • Macia 	<ul style="list-style-type: none"> • Bom
N₁ (45,0)	<ul style="list-style-type: none"> • Multiplicação homogênea e uniforme • Crescimento intenso 	<ul style="list-style-type: none"> • Médias 	<ul style="list-style-type: none"> • Macia • Baixa frequência de lâminas foliares encurvadas para baixo 	<ul style="list-style-type: none"> • Regular
N₂ (60,0)	<ul style="list-style-type: none"> • Multiplicação heterogênea e desuniforme • Crescimento muito intenso 	<ul style="list-style-type: none"> • Médias e grandes 	<ul style="list-style-type: none"> • Maciez reduzida • Média frequência de lâminas foliares encurvadas para baixo e para cima. • Presença acentuada de folhas quebradiças (hiperhidria) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ruim
P₁ (1,0)	<ul style="list-style-type: none"> • Multiplicação homogênea e uniforme • Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> • Médias 	<ul style="list-style-type: none"> • Macia 	<ul style="list-style-type: none"> • Bom
P₂ (2,0)	<ul style="list-style-type: none"> • Multiplicação homogênea e uniforme • Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> • Médias 	<ul style="list-style-type: none"> • Macia 	<ul style="list-style-type: none"> • Bom
Ca₁ (7,5)	<ul style="list-style-type: none"> • Multiplicação homogênea e uniforme • Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequenas e médias 	<ul style="list-style-type: none"> • Macia 	<ul style="list-style-type: none"> • Bom
Ca₂ (10,0)	<ul style="list-style-type: none"> • Multiplicação homogênea e uniforme • Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequenas e médias 	<ul style="list-style-type: none"> • Macia 	<ul style="list-style-type: none"> • Bom
Mg₁ (1,5)	<ul style="list-style-type: none"> • Multiplicação homogênea e uniforme • Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequenas e médias 	<ul style="list-style-type: none"> • Macia 	<ul style="list-style-type: none"> • Bom
Mg₂ (4,5)	<ul style="list-style-type: none"> • Multiplicação homogênea e uniforme • Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequenas e médias 	<ul style="list-style-type: none"> • Macia 	<ul style="list-style-type: none"> • Bom

*(N = 60,0; P = 1,25; Ca = 3,0; Mg = 1,5 mmol L⁻¹); **(N = 26,0; P = 3,0; Ca = 5,0; Mg = 3,0 mmol L⁻¹)

As características de crescimento das brotações, aos 28 dias de cultivo, podem ser visualizadas na Figura 12. A Figura 13 ilustra, com maior detalhe, as características de crescimento das brotações referentes aos tratamentos MS, N₁ e N₂.

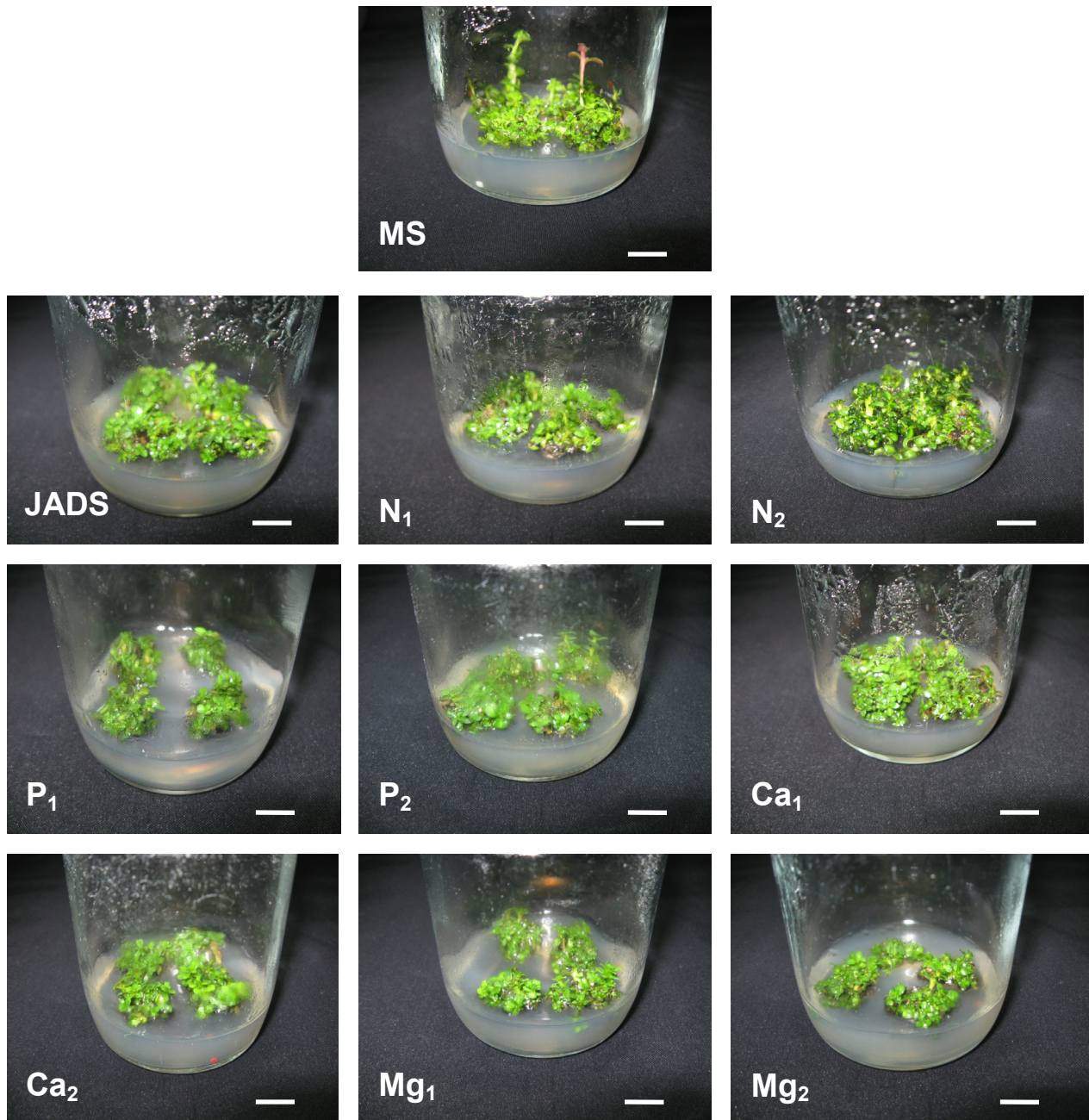


Figura 12 - Características do crescimento de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo *in vitro*. Em mmol L^{-1} : MS (N = 60,0; P = 1,25; Ca = 3,0; Mg = 1,5); JADS (N = 26,0; P = 3,0; Ca = 5,0; Mg = 3,0); N₁ = 45,0; N₂ = 60,0; P₁ = 1,0; P₂ = 2,0; Ca₁ = 7,5; Ca₂ = 10,0; Mg₁ = 1,5; Mg₂ = 4,5

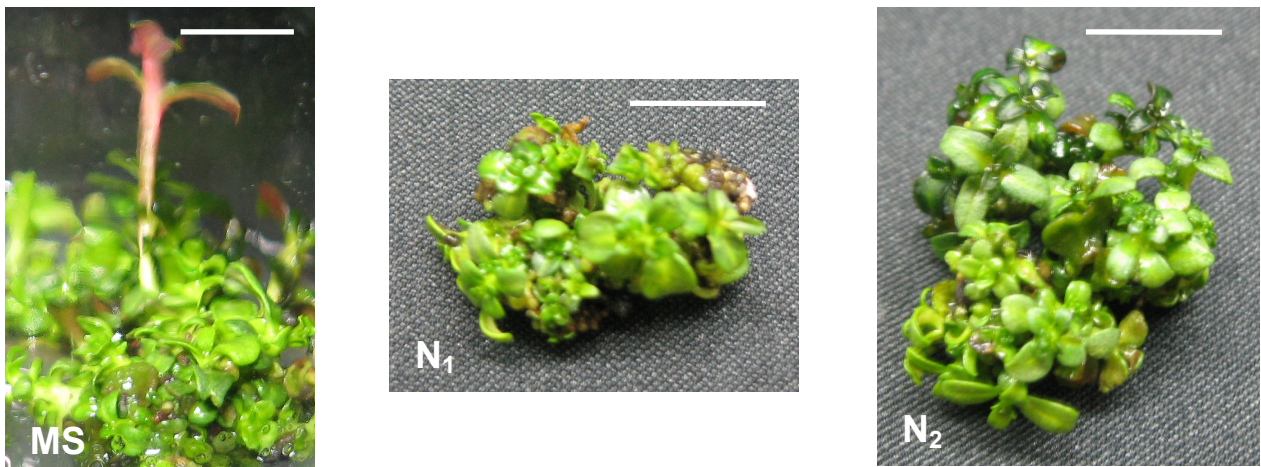


Figura 13 - Detalhes das características de crescimento de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo *in vitro*. Em mmol L^{-1} : MS = (N = 60,0; P = 1,25; Ca = 3,0; Mg = 1,5); N₁ = 45,0; N₂ = 60,0. Barras = 1 cm

Os resultados obtidos mostraram um crescimento acentuado nas brotações referentes aos tratamentos N₁, N₂ e MS. No entanto, nem sempre o crescimento máximo corresponde ao ótimo (INGESTAD; ÅGREN, 1995). Os tratamentos N₂ e MS apresentaram crescimento das brotações fora do padrão considerado adequado à multiplicação das mesmas, dentro de sistema de cultura *in vitro* de *Eucalyptus* (Figuras 12 e 13). As características desejadas deste sistema ideal são brotações vigorosas, com crescimento homogêneo e uniforme, e ausência de hiperhidria.

Tais resultados denotam a complexidade de estudos sobre nutrição mineral *in vitro* e as respostas morfogênicas em função do macronutriente, de sua concentração e disponibilidade, das interações com outros nutrientes e da interface entre meios de cultura e explantes (WILLIAMS, 1995; RAMAGE; WILLIAMS, 2002b). Outros fatores como a aeração do meio de cultura, o fotoperíodo e a qualidade e intensidade de luz podem influenciar o crescimento e o desenvolvimento das brotações (CORREIA et al., 1995; WILLIAMS, 1995; RAMAGE, WILLIAMS, 2002b).

2.3.2.1.2 Efeito do nitrogênio

2.3.2.1.2.1 Massas fresca e seca

Para as variáveis massa fresca e massa seca, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, em meios de cultura suplementados com 60,0 (MS); 26,0 (JADS); 45,0 (N₁) e 60,0 (N₂) mmol L⁻¹ de nitrogênio, demonstrou que o modelo linear ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações deste nutriente (Figuras 14 e 15).

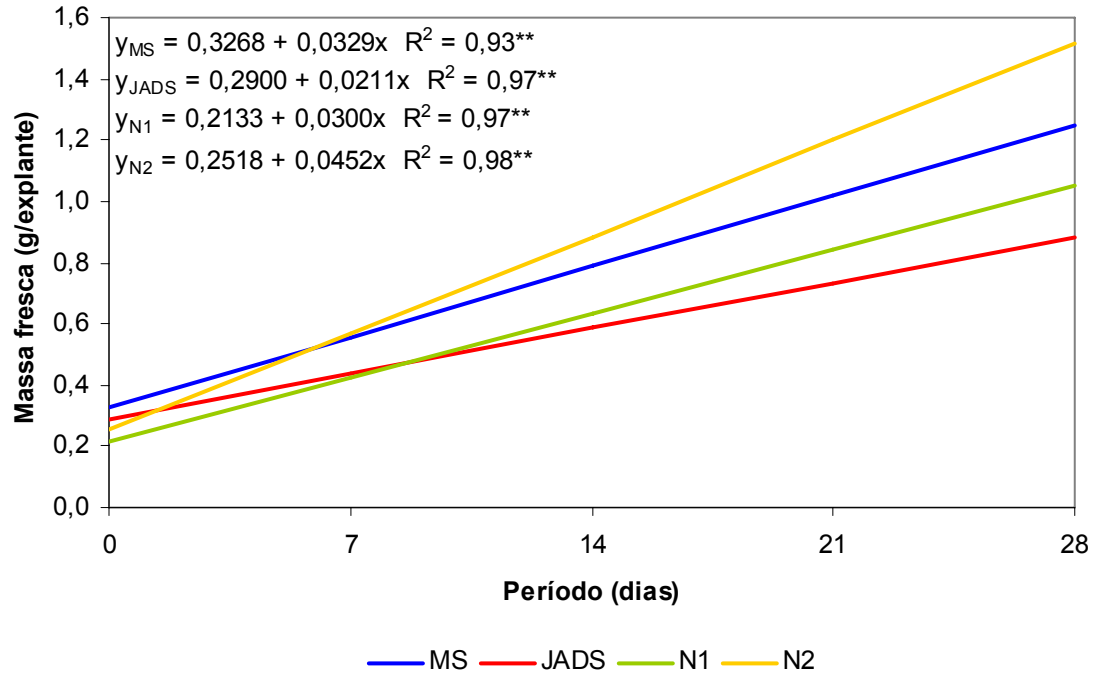


Figura 14 - Valores observados e funções ajustadas para a massa fresca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de nitrogênio, em função do período de cultivo. **Significativo ($p=0,0001$)

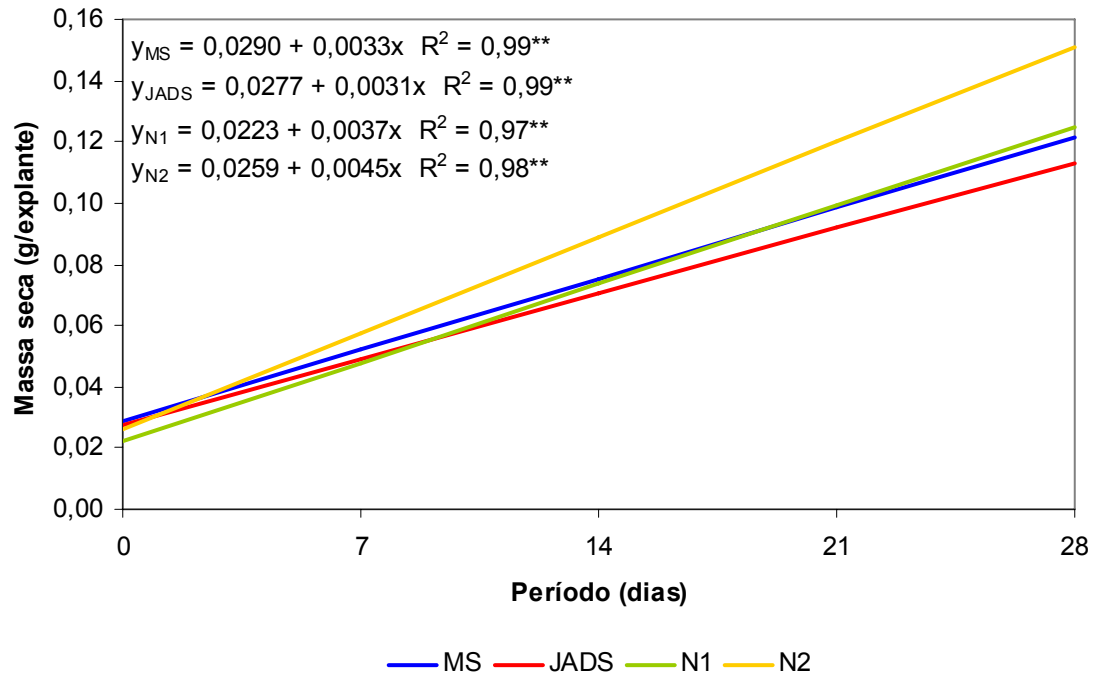


Figura 15 - Valores observados e funções ajustadas para a massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de nitrogênio, em função do período de cultivo. ******Significativo ($p=0,0001$)

Os resultados obtidos mostraram que em todos os tratamentos houve incremento das massas fresca e seca das brotações, ao longo do período de cultivo. Do início ao final desse período, as brotações apresentaram incrementos percentuais de massas fresca e seca de 382,1 e 420,2, 303,7 e 408,9, 494,0 e 558,8, 602,3 e 583,8, para os tratamentos MS, JADS, N₁ e N₂, respectivamente.

Entre as concentrações de nitrogênio, observou-se que o crescimento das brotações na menor concentração (JADS-26,0 mmol L⁻¹) foi menor que nos demais tratamentos, a partir da segunda semana de cultivo, resultando em menor produção de massas fresca e seca (Figuras 14 e 15). No entanto, este tratamento apresentou brotações com boas características de crescimento, como aglomerado homogêneo, crescimento uniforme e folhas pequenas e médias (Tabela 7; Figura 12).

Ao final dos 28 dias de cultivo, as concentrações de nitrogênio presentes nos tratamentos MS (60,0 mmol L⁻¹), N₁ (45,0 mmol L⁻¹) e N₂ (60,0 mmol L⁻¹) resultaram em crescimento intenso das brotações, quanto aos incrementos de massas seca e fresca

(Figuras 14 e 15). MS apresentou brotações com incremento de massa seca inferior ao N_1 . Além disso, em MS notou-se hiperhidria, característica esta indesejável na cultura *in vitro* e que comprometeu o vigor das brotações (Figuras 12 e 13). O tratamento N_1 ($45,0 \text{ mmol L}^{-1}$) não apresentou hiperhidria (Figuras 13).

A maior produção de massas fresca e seca foi a de N_2 ($60,0 \text{ mmol L}^{-1}$), obtida, praticamente, ao longo de todo o período de cultivo (Figuras 14 e 15). No entanto, este tratamento foi o que mais apresentou características de crescimento indesejáveis das brotações, como aglomerado heterogêneo, crescimento desuniforme, folhas médias e grandes e acentuada hiperhidria (Figuras 12 e 13; Tabela 7). Russowski e Nicoloso (2003), caracterizando o efeito do nitrogênio ($0 \leq N \leq 150\%$ do meio MS) em plântulas de *P. glomerata*, constataram que o aumento da massa seca total foi maior na concentração de 60% de N e tendeu a decrescer em concentrações maiores desse elemento; Donato et al. (2003), estudando a eficiência de variedades de cana-de-açúcar no processo de assimilação de nitrogênio *in vitro*, em meio MS, em concentrações variando entre $0,0$ a $7,37 \text{ mmol L}^{-1}$, observaram que a maioria das variedades apresentou crescimento da massa seca com o aumento da concentração de N.

Neste mesmo sentido, Kanashiro (2005) verificou que entre as concentrações de nitrogênio testadas ($7,5 \leq N \leq 120,0 \text{ mmol L}^{-1}$) em meio de cultura MS, a concentração de $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de nitrogênio apresentou nível ótimo para a produção de massa fresca e massa seca da parte aérea de *Aechmea blanchetiana*. Também Correia (2006), ao estudar o efeito dos macronutrientes no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* Hill., nas concentrações $17,3$; $26,0$ (JADS); $39,0$ e $58,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de nitrogênio, verificou um maior incremento de massa fresca nas maiores concentrações deste nutriente; no entanto, verificou que a maior concentração de N não se refletiu na maior produção de massa seca e que em concentrações elevadas deste nutriente ocorreu hiperhidria. Desta forma, sugeriu que a concentração total de nitrogênio mais adequada para a multiplicação de brotações *Eucalyptus grandis* Hill. cultivadas *in vitro*, encontra-se entre 26 mmol L^{-1} e abaixo de 39 mmol L^{-1} .

As respostas encontradas para as diferentes concentrações de nitrogênio, aliadas aos incrementos de massas fresca e seca, sugerem que a concentração total

mais adequada deste nutriente para a multiplicação de *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro* situa-se na faixa de 26,0 a 45,0 mmol L⁻¹.

2.3.2.1.2.2 Porcentagem de massa seca

Para a variável porcentagem de massa seca, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, obtida em meios de cultura suplementados com 60,0 (MS), 26,0 (JADS), 45,0 (N₁) e 60,0 (N₂) mmol L⁻¹ de nitrogênio, demonstrou que o modelo cúbico ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações deste nutriente (Figura 16).

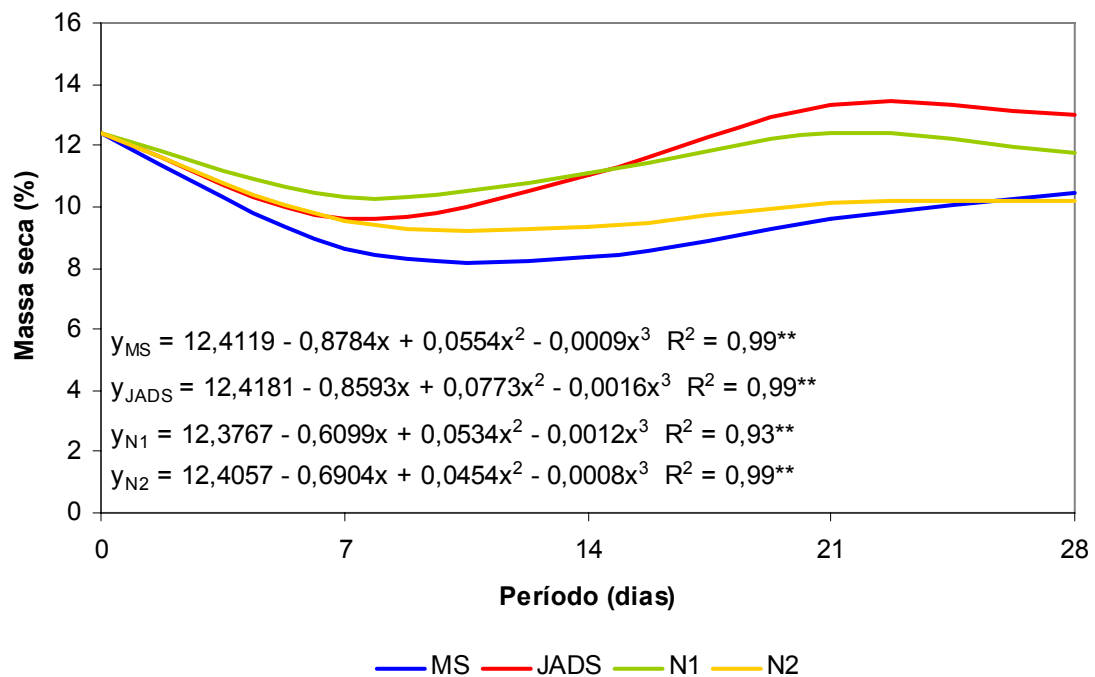


Figura 16 - Valores observados e funções ajustadas para a porcentagem da massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de nitrogênio, em função do período de cultivo. **Significativo ($p=0,0001$)

De acordo com os resultados obtidos, as maiores porcentagens de massa seca ocorreram aos 21 dias de cultivo, nas concentrações JADS e N₁, apresentando redução após este período. Também no instante inicial do período estudado, particularmente nas concentrações MS e N₂, ocorreram porcentagens elevadas de massa seca (Figura 16). As menores porcentagens de massa seca foram obtidas aos 7 dias de cultivo, nas

concentrações JADS e N_1 ; e entre 7 e 14 dias de cultivo, nas concentrações MS e N_2 (Figura 16). Segundo Ramage e Williams (2003), estas reduções podem estar relacionadas com a intensa atividade de crescimento e diferenciação celular durante os primeiros 7 dias de cultivo, o que leva a um desequilíbrio homeostático, exigindo da cultura maior atividade metabólica e de redistribuição de solutos e nutrientes, os quais são necessários à manutenção do crescimento.

Epstein e Bloom (2005) verificaram que a variação no conteúdo de água na planta reflete-se na síntese dos hormônios vegetais e na absorção de nutrientes minerais, transporte e metabolismo celular. No presente estudo, a porcentagem de massa seca foi maior na menor concentração de nitrogênio ($26,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e, conseqüentemente, com o menor conteúdo de água ao longo do período de cultivo, resultando em maior acúmulo de massa seca nas brotações.

Ao que parece, o aumento da concentração de nitrogênio estimulou o acúmulo de água e o crescimento das brotações. Observou-se, ainda, que em concentrações mais elevadas deste nutriente ocorreu hiperhidria, de forma mais acentuada nos tratamentos MS e N_2 (Figura 13).

2.3.2.1.2.3 Taxa de crescimento relativo

Para a variável taxa de crescimento relativo, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, em meios de cultura suplementados com $60,0$ (MS); $26,0$ (JADS); $45,0$ (N_1) e $60,0$ (N_2) mmol L^{-1} de nitrogênio, demonstrou que o modelo linear ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações deste nutriente, exceto para N_1 ($p=0,3087$) (Figura 17).

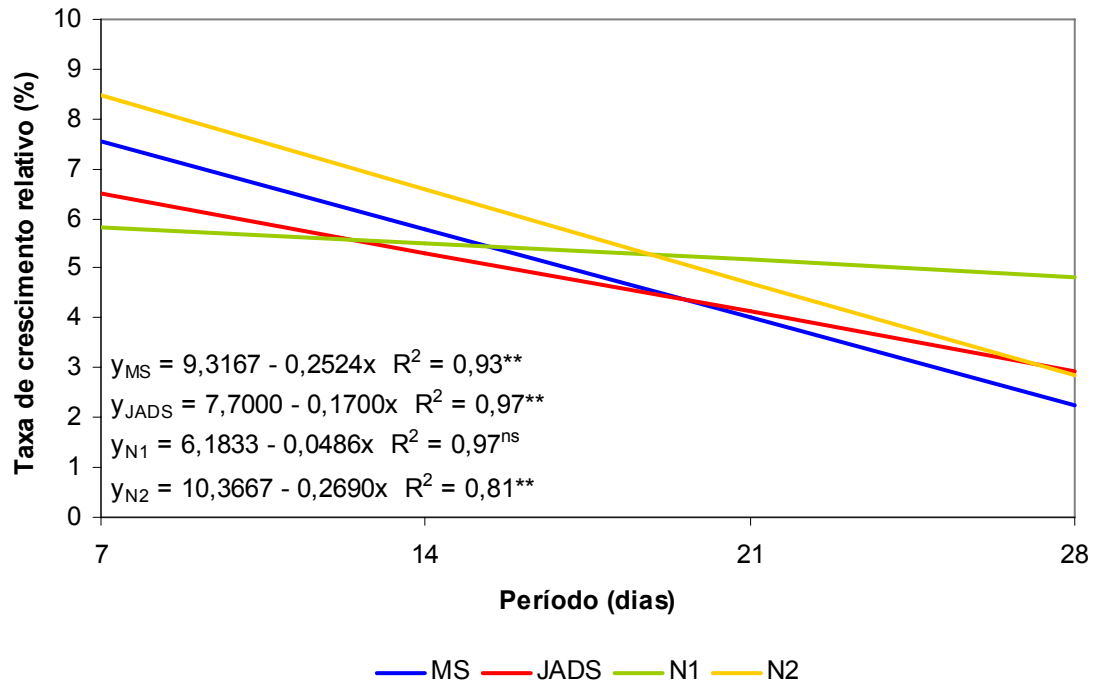


Figura 17 - Valores observados e funções ajustadas para a taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de nitrogênio, em função do período de cultivo. **Significativo ($p=0,0001$); ^{ns}não significativo ($p=0,3087$)

As maiores taxas de crescimento relativo ocorreram aos 7 dias de cultivo, sendo maior em N₂, seguido de MS, JADS e N₁. Ao longo do período estudado, houve redução desta taxa em todos os tratamentos que, aos 28 dias, apresentaram as menores taxas de crescimento. No entanto, N₁ destacou-se dos demais tratamentos por manter uma taxa de crescimento relativo aproximadamente constante durante o período estudado (Figura 17). A uniformidade e a constância no crescimento das brotações neste tratamento devem ser resultantes do melhor equilíbrio nutricional e melhor relação meio de cultura/planta. Tais respostas são as desejadas nos sistemas de cultivo *in vitro*, aliadas ao bom crescimento das massas fresca e seca, e à ausência de deformações morfológicas.

2.3.2.1.3 Efeito do fósforo

2.3.2.1.3.1 Massas fresca e seca

Para as variáveis massa fresca e massa seca, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, em meios de cultura suplementados com 1,25 (MS); 3,0 (JADS); 1,0 (P₁) e 2,0 (P₂) mmol L⁻¹ de fósforo, demonstrou que o modelo linear ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações deste nutriente (Figuras 18 e 19).

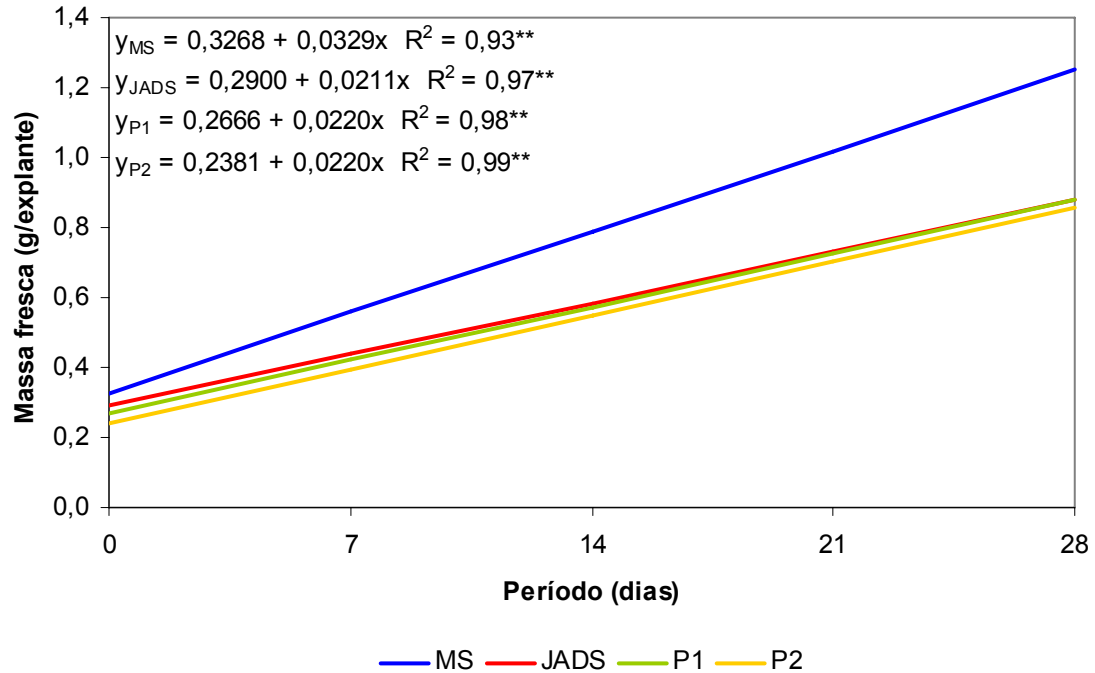


Figura 18 - Valores observados e funções ajustadas para a massa fresca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de fósforo, em função do período de cultivo. ******Significativo ($p=0,0001$)

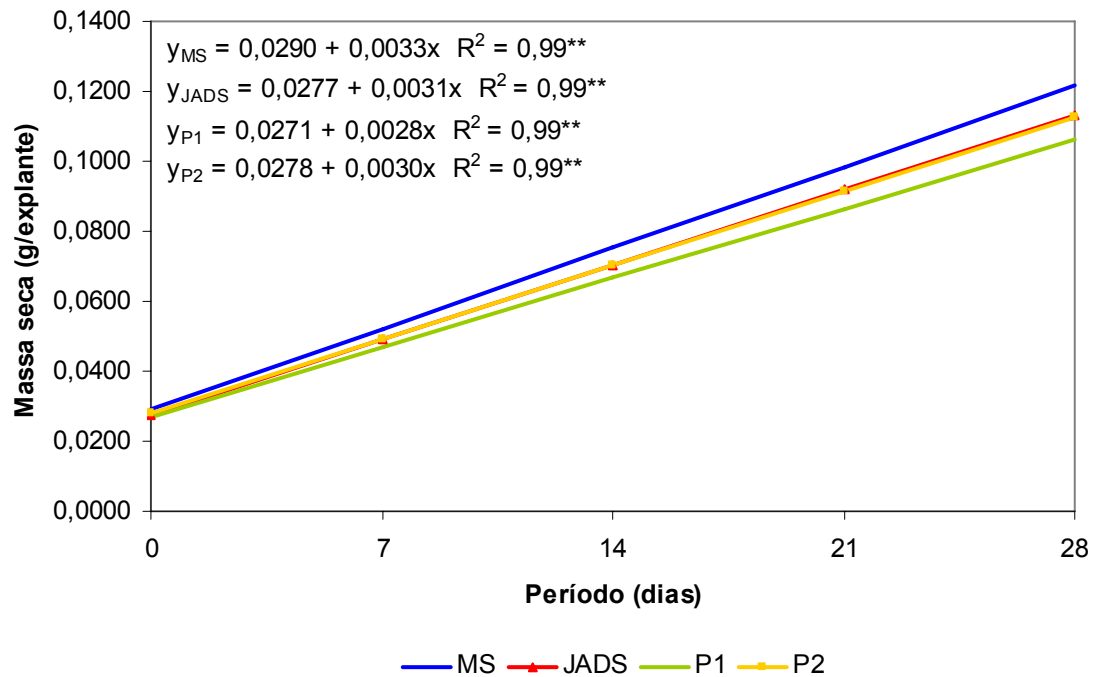


Figura 19 - Valores observados e funções ajustadas para a massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de fósforo, em função do período de cultivo. **Significativo ($p=0,0001$)

De acordo com os resultados obtidos, em todos os tratamentos houve incremento das massas fresca e seca das brotações, ao longo do período de cultivo. Do início ao final do período, as brotações apresentaram incrementos percentuais de massas fresca e seca de 382,1 e 420,2; 303,7 e 408,9; 330,5 e 392,3; 359,2 e 405,9, para os tratamentos MS, JADS, P₁ e P₂, respectivamente (Figuras 18 e 19).

Durante o período de cultivo, consideradas as concentrações de fósforo, observou-se que praticamente não houve diferença na produção de massa fresca entre JADS (3,0 mmol L⁻¹), P₁ (1,0 mmol L⁻¹) e P₂ (2,0 mmol L⁻¹). Somente em MS (1,25 mmol L⁻¹) notou-se um aumento da produção de massa fresca em relação aos demais tratamentos (Figura 18). No entanto, ao que tudo indica, esta produção está diretamente relacionada à alta concentração de nitrogênio total contida neste meio de cultura (60,0 mmol L⁻¹).

Quanto à produção de massa seca, no decorrer do período estudado, houve pouca diferença entre os tratamentos, sendo P₁ responsável pelo menor valor. Em MS

foi observada uma produção de massa seca pouco maior que nos demais tratamentos (Figura 19). Os tratamentos P₁ e P₂ obtiveram brotações com boas características, como aglomerado homogêneo, crescimento uniforme e folhas pequenas e médias para JADS; e médias para P₁ e P₂ (Tabela 7; Figura 12). Russowski e Nicolosso (2003), estudando o efeito do fósforo no crescimento de *Pfaffia glomerata*, observaram que a massa seca da parte aérea, obtida em meio de cultura MS modificado em concentrações de fósforo ($0,0 \leq P \leq 1,875 \text{ mmol L}^{-1}$), foi maior em concentração próxima a 1 mmol L^{-1} . Kanashiro (2005), ao estudar o efeito do fósforo no crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana*, observou o que o crescimento da massa fresca total foi obtido com o incremento da concentração de fósforo no meio MS modificado ($0,0 \leq P \leq 1,875 \text{ mmol L}^{-1}$); observou, ainda, que para cada mmol L^{-1} de fósforo acrescido no meio MS modificado houve um incremento de 0,0751 g na produção de massa fresca total, sendo a concentração de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de fósforo responsável pela maior produção de massa fresca e massa seca foliar. Correia (2006), ao estudar o efeito dos macronutrientes no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis*, nas concentrações 2,0; 3,0 (JADS), 4,5 e $6,75 \text{ mmol L}^{-1}$ de fósforo, chegou a resultados semelhantes aos aqui obtidos com *Eucalyptus globulus* Labill., ou seja, o autor constatou pouca variação em função das concentrações de fósforo durante o ciclo de cultivo. Ademais, o estudo realizado por Correia (2006) ainda revelou que concentrações de fósforo acima de $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ resultaram em brotações com características de crescimento fora dos padrões ideais para cultivo *in vitro*.

Considerando-se os incrementos de massa seca e massa fresca, e avaliando as respostas encontradas para as diferentes concentrações de fósforo na multiplicação de *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro*, pode-se sugerir que a concentração total mais adequada deste nutriente situa-se na faixa de 2,0 a $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

2.3.2.1.3.2 Porcentagem de massa seca

Para a variável porcentagem da massa seca, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, em meios de cultura suplementados com 1,25 (MS); 3,0 (JADS), 1,0 (P₁) e 2,0 (P₂) mmol L⁻¹ de fósforo, demonstrou que o modelo cúbico ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações deste nutriente, exceto em P₂ ($p=0,9098$) (Figura 20).

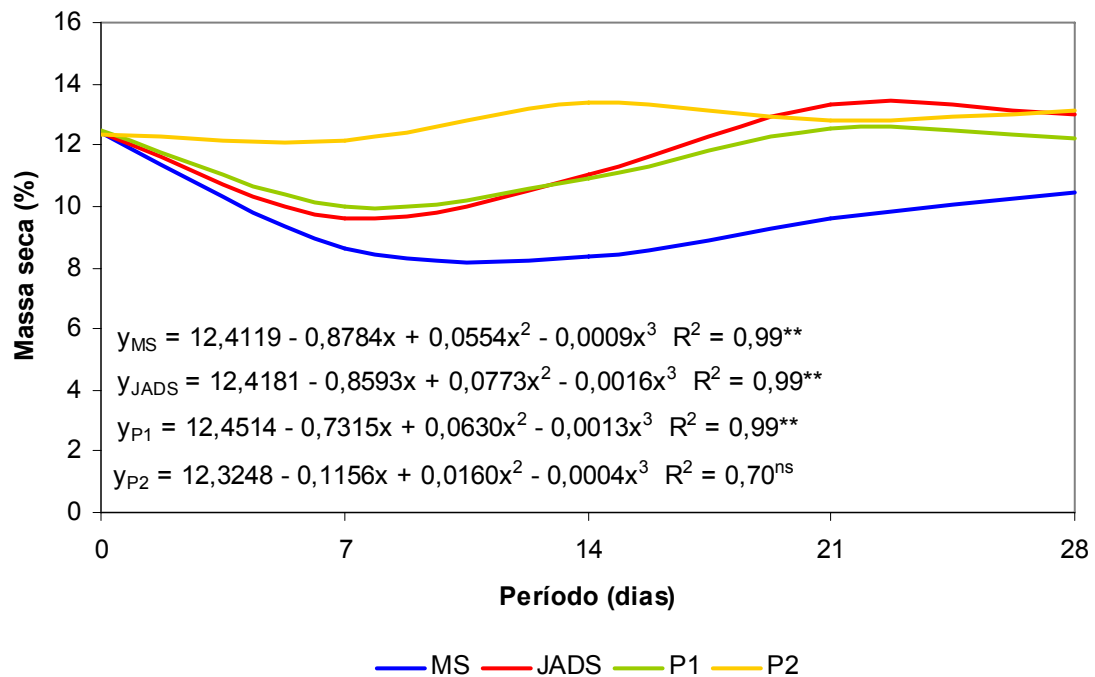


Figura 20 - Valores observados e funções ajustadas para a porcentagem da massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de fósforo, em função do período de cultivo. **Significativo ($p=0,0001$); ^{ns}não significativo ($p=0,2847$)

Durante o período de cultivo, a porcentagem de massa seca foi maior para as concentrações P₁ e P₂ que para MS. Além disso, em P₁ e P₂ não ocorreu hiperhidria (Tabela 7; Figuras 12 e 20). Sendo assim, fica ainda mais evidente que o maior acúmulo de água pelas brotações parece estar ligado diretamente ao aumento da concentração de nitrogênio, pelas razões já descritas anteriormente.

Diferentemente dos demais tratamentos, a concentração P₂ comportou-se de forma praticamente constante ao longo dos 28 dias, apresentando em média as

maiores taxas de porcentagem de massa seca durante todo o período, sendo inferior somente a de JADS aos 21 dias (Figura 20). Tal comportamento pode estar relacionado à modificação da homeostase celular, o que favorece o acúmulo de massa seca, conforme já aventado por Correia (2006).

2.3.2.1.3.3 Taxa de crescimento relativo

Para a variável taxa de crescimento relativo, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, em meios de cultura suplementados com 1,25 (MS), 3,0 (JADS), 1,0 (P₁) e 2,0 (P₂) mmol L⁻¹ de fósforo, demonstrou que o modelo linear (p=0,0001) foi significativo para todas as concentrações deste nutriente (Figura 21).

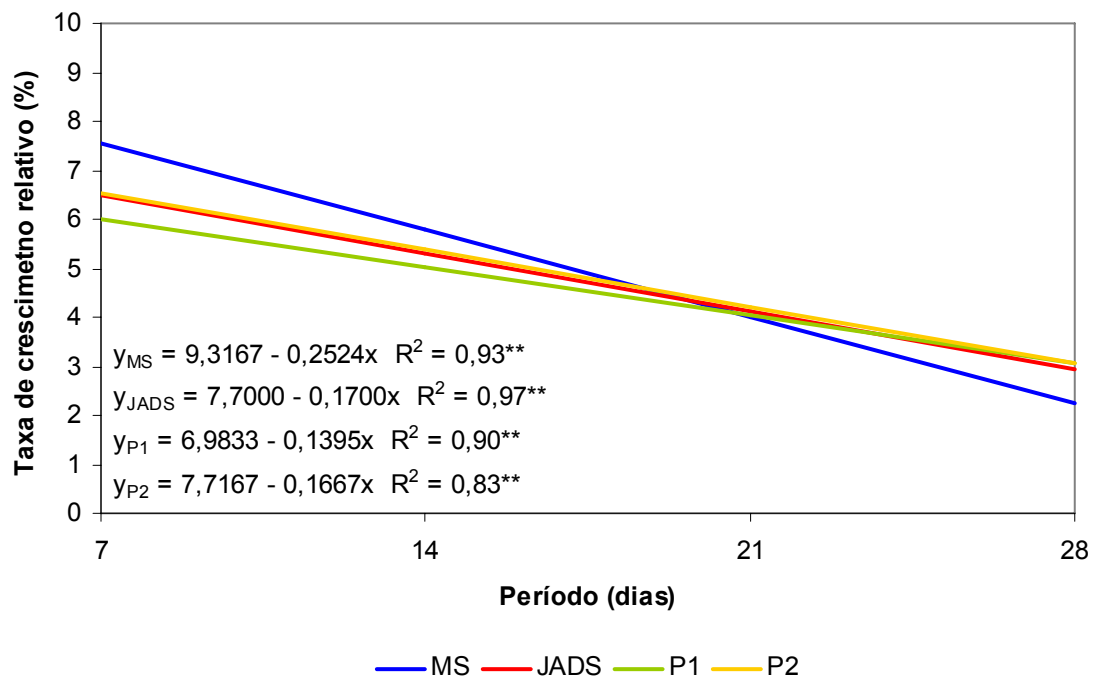


Figura 21 - Valores observados e funções ajustadas para a taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de fósforo, em função do período de cultivo. **Significativo (p=0,0001)

A tendência das curvas mostra que, além das taxas de crescimento relativo diminuírem ao longo dos 28 dias, os tratamentos JADS, P₁ e P₂ pouco diferiram entre si. Aos 7 dias, o maior crescimento relativo foi observado em MS, seguido de P₂, JADS

e P₁. Entre 21 e 28 dias de cultivo, todos os tratamentos apresentaram praticamente o mesmo crescimento relativo, sugerindo manutenção do crescimento das brotações, a não ser por MS aos 28 dias, o qual apresentou taxa inferior aos demais tratamentos (Figura 21).

2.3.2.1.4 Efeito do cálcio

2.3.2.1.4.1 Massas fresca e seca

Para as variáveis massa fresca e massa seca, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, em meios de cultura suplementados com 3,0 (MS), 5,0 (JADS), 7,5 (Ca₁) e 10,0 (Ca₂) mmol L⁻¹ de cálcio, demonstrou que o modelo linear ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações deste nutriente (Figuras 22 e 23).

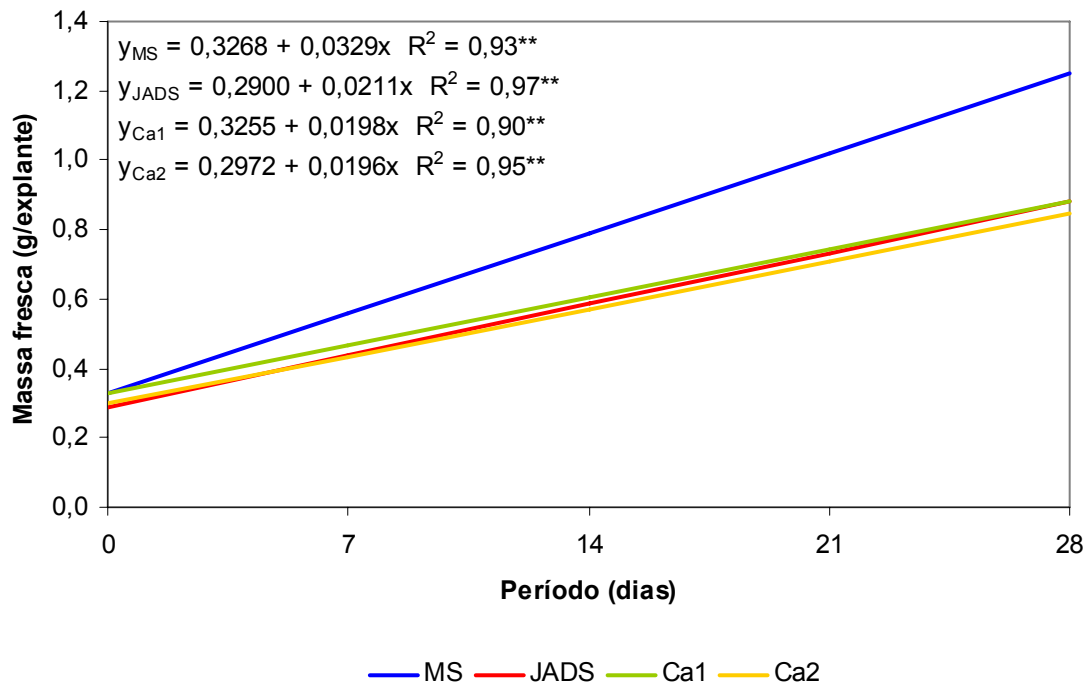


Figura 22 - Valores observados e funções ajustadas para a massa fresca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de cálcio, em função do período de cultivo. **Significativo ($p=0,0001$)

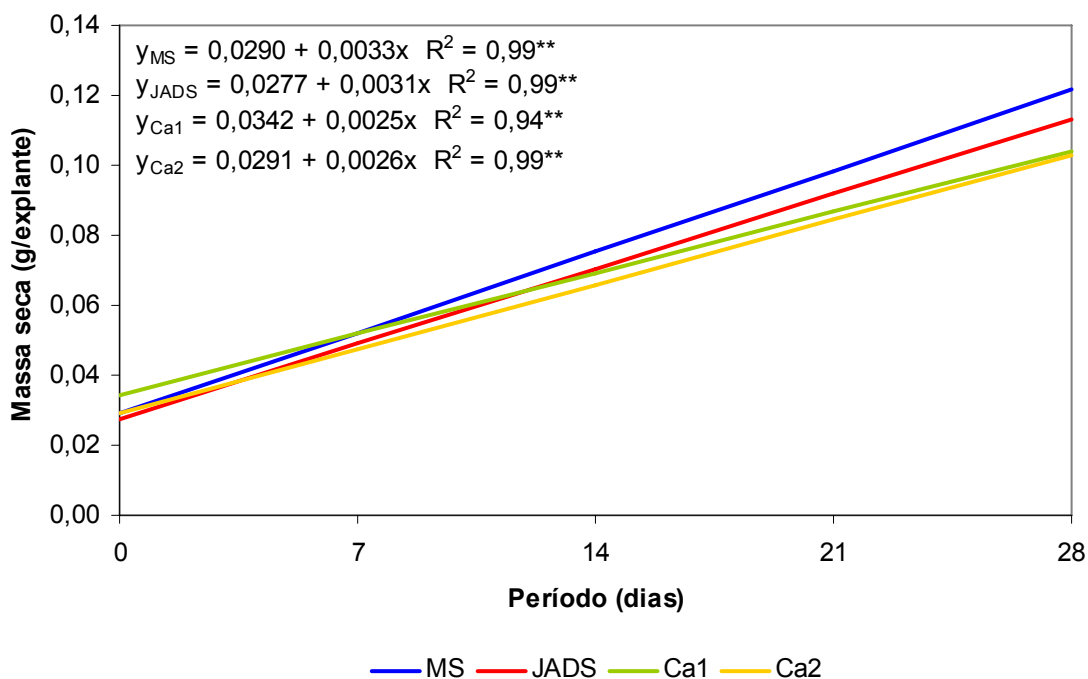


Figura 23 - Valores observados e funções ajustadas para a massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de cálcio, em função do período de cultivo. **Significativo ($p=0,0001$)

Os resultados obtidos mostraram que em todos os tratamentos houve incremento das massas fresca e seca das brotações, ao longo do período de cultivo. Do início ao final do período, as brotações apresentaram incrementos percentuais de massas fresca e seca de 382,1 e 420,2, 303,7 e 408,9, 270,5 e 304,1, 284,9 e 354,1, para os tratamentos MS, JADS, Ca₁ e Ca₂, respectivamente (Figuras 22 e 23).

Durante o ciclo de cultivo, observou-se que praticamente não houve diferença na produção de massa fresca entre as concentrações de Ca em JADS (5,0 mmol L⁻¹), Ca₁ (7,5 mmol L⁻¹) e Ca₂ (10,0 mmol L⁻¹). Somente em MS (3,0 mmol L⁻¹) notou-se um aumento da produção de massa fresca em relação aos demais tratamentos (Figura 22), reforçando a idéia de que esta produção está diretamente ligada à alta concentração de nitrogênio total contida neste meio de cultura (60,0 mmol L⁻¹).

Quanto à produção de massa seca, no decorrer do período estudado houve pouca diferença entre os tratamentos, sendo a concentração de 5,0 mmol L⁻¹ (JADS) superior às de Ca₁ e Ca₂. No entanto, tal diferença tornou-se mais pronunciada

somente a partir da terceira semana de cultivo (Figura 23). Nos tratamentos Ca_1 e Ca_2 , as brotações apresentaram boas características de crescimento, independente do aumento da concentração de cálcio, tais como aglomerado homogêneo, crescimento uniforme e folhas de tamanho reduzido (Tabela 7; Figura 12). Ademais, Langer (2000), ao avaliar o crescimento de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em meio de cultura JADS, em 21 dias de cultivo *in vitro*, observou que, a partir de $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de cálcio, houve estímulo ao crescimento e diferenciação das brotações. Kanashiro (2005), ao estudar o efeito do cálcio no crescimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana*, observou que, no intervalo experimental $1,5 \leq Ca \leq 12 \text{ mmol L}^{-1}$, a menor massa fresca total foi estimada na concentração $3,473 \text{ mmol L}^{-1}$; a partir desse ponto, com o aumento da concentração de cálcio no meio MS, houve aumento da massa fresca até a concentração $9,574 \text{ mmol L}^{-1}$. Resultado semelhante ocorreu com a massa seca, obtendo sua maior produção na concentração $9,382 \text{ mmol L}^{-1}$ de cálcio.

Quanto aos incrementos de massas fresca e seca, as respostas obtidas para as diferentes concentrações de cálcio sugerem que, na multiplicação de *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro*, a concentração total mais adequada deste nutriente situa-se entre $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (JADS) a $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Respostas semelhantes a estas foram encontradas por Correia (2006), ao estudar o efeito de macronutrientes em brotações de *Eucalyptus grandis* Hill., nas concentrações 3,3, 5,0 (JADS), 7,5 e $11,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de cálcio. Aos 21 dias de cultivo *in vitro*, na concentração de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de cálcio (JADS), o autor obteve maior produção de massa fresca, exceto pela concentração $11,25 \text{ mmol L}^{-1}$, e melhores características de crescimento das brotações.

2.3.2.1.4.2 Porcentagem de massa seca

Para a variável porcentagem da massa seca, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, em meios de cultura suplementados com 3,0 (MS), 5,0 (JADS), 7,5 (Ca_1) e $10,0 (Ca_2) \text{ mmol L}^{-1}$ de cálcio, demonstrou que o modelo cúbico ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações deste nutriente (Figura 24).

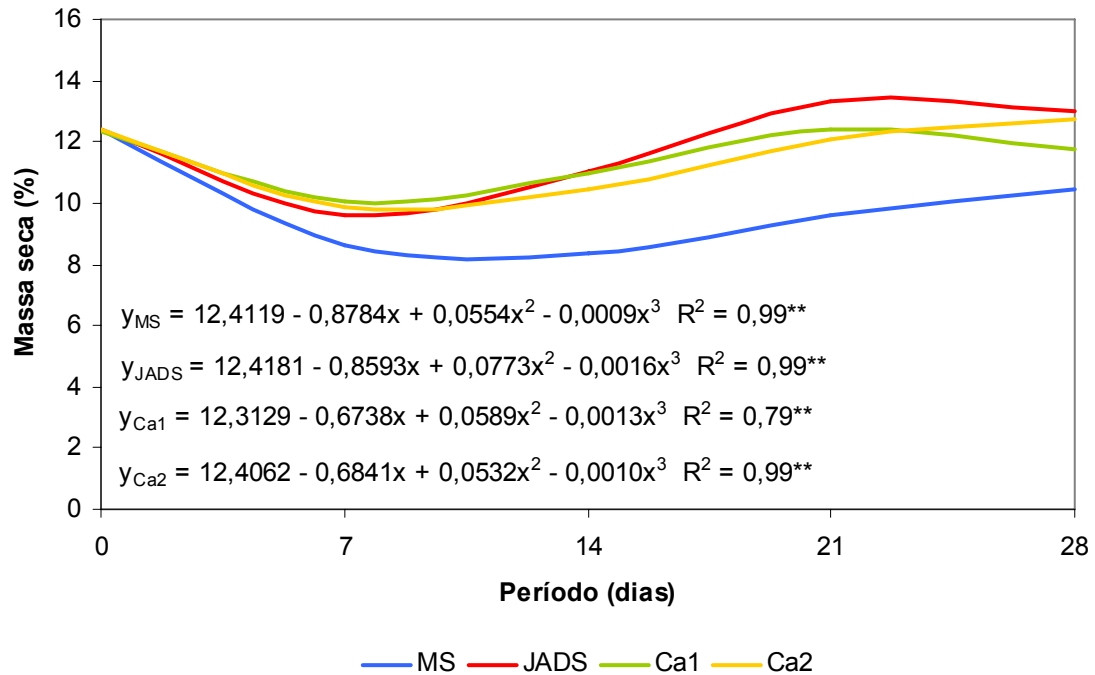


Figura 24 - Valores observados e funções ajustadas para a porcentagem da massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de cálcio, em função do período de cultivo. **Significativo ($p=0,0001$)

As tendências observadas nos tratamentos JADS, Ca₁ e Ca₂, durante os 28 dias de cultivo, pouco diferenciaram entre si, apresentando porcentagens de massa seca mais elevadas aos 21 dias de cultivo (Figura 24). O aumento das concentrações de cálcio, tanto em Ca₁ quanto Ca₂, não ocasionou alterações morfológicas nas brotações, não influenciando de forma negativa no seu crescimento (Figura 12), situação inversa à encontrada por Correia (2006) em concentrações cálcio acima de 7,5 mmol L⁻¹.

2.3.2.1.4.3 Taxa de crescimento relativo

Para a variável taxa de crescimento relativo, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, em meios de cultura suplementados com 3,0 (MS), 5,0 (JADS), 7,5 (Ca₁) e 10,0 (Ca₂) mmol L⁻¹ de cálcio, demonstrou que o modelo linear ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações deste nutriente (Figura 25).

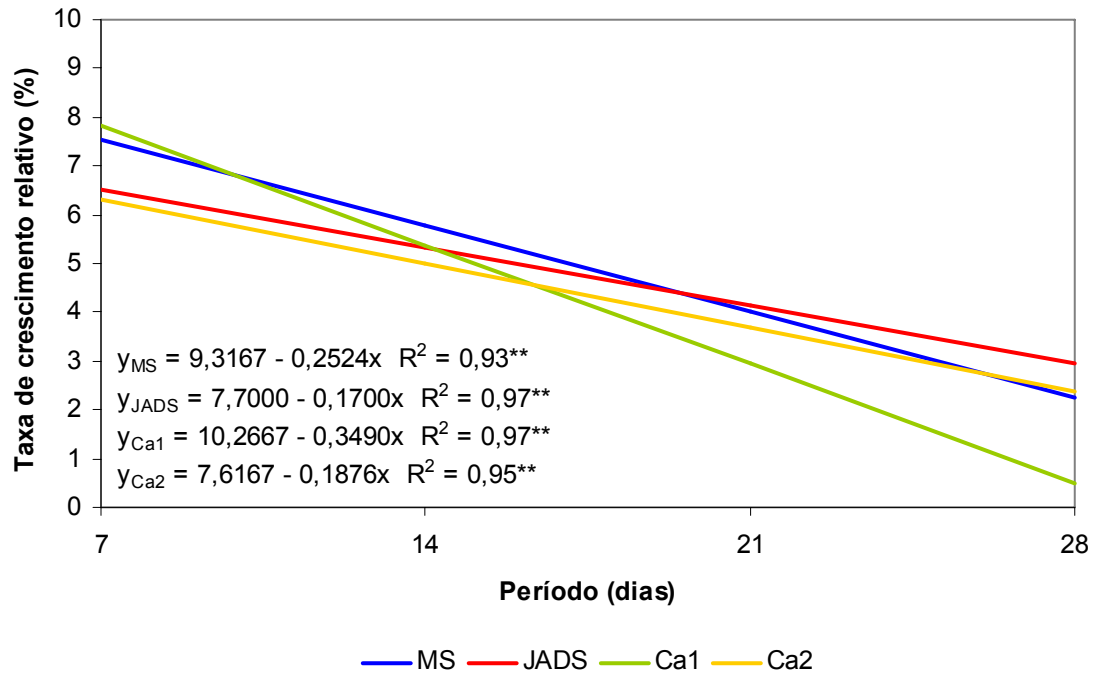


Figura 25 - Valores observados e funções ajustadas para a taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de cálcio, em função do período de cultivo. **Significativo ($p=0,0001$)

Ao longo dos 28 dias, as taxas de crescimento relativo, em todos os tratamentos, tiveram comportamento decrescente. O maior crescimento relativo, dentre as concentrações de cálcio testadas, foi obtido aos 7 dias em Ca₁, superando MS, JADS e Ca₂. Entre 21 e 28 dias, houve pouca variação do crescimento relativo entre os tratamentos, a não ser em Ca₁, que apresentou as menores taxas, sugerindo estabilização do crescimento das brotações deste tratamento neste intervalo de tempo (Figura 25).

2.3.2.1.5 Efeito do magnésio

2.3.2.1.5.1 Massas fresca e seca

Para as variáveis massa fresca e massa seca, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, em meios de cultura suplementados com 1,5 (MS), 3,0 (JADS), 1,5 (Mg₁) e 4,5 (Mg₂) mmol L⁻¹ de magnésio,

demonstrou que o modelo linear ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações deste nutriente (Figuras 26 e 27).

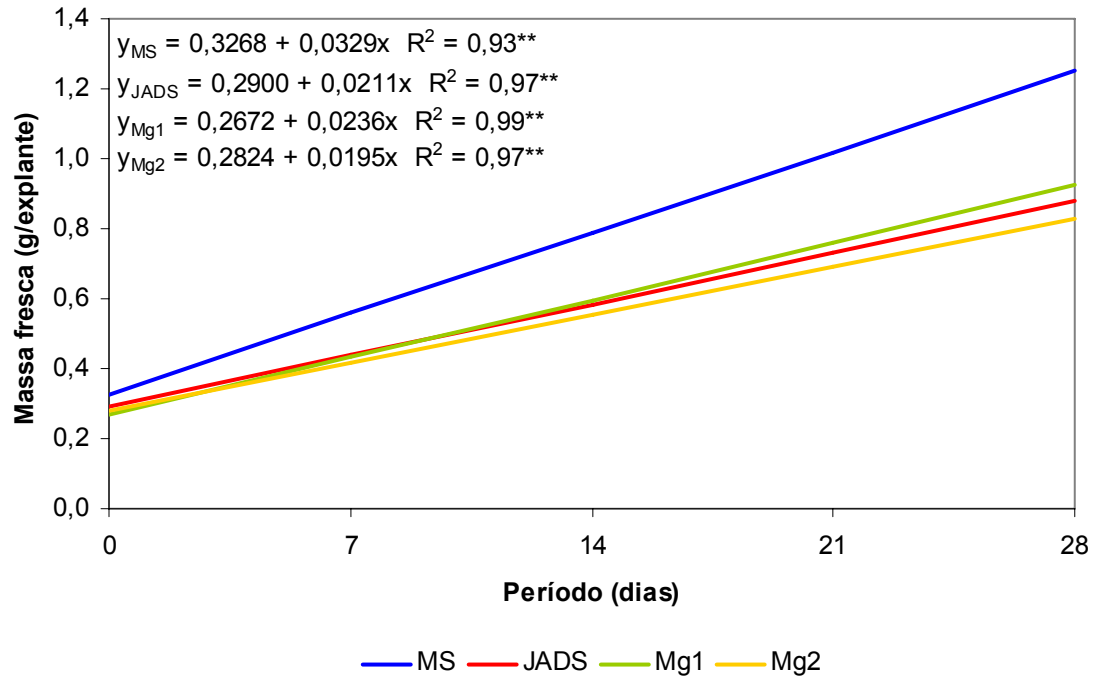


Figura 26 - Valores observados e funções ajustadas para a massa fresca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de magnésio, em função do período de cultivo. ******Significativo ($p=0,0001$)

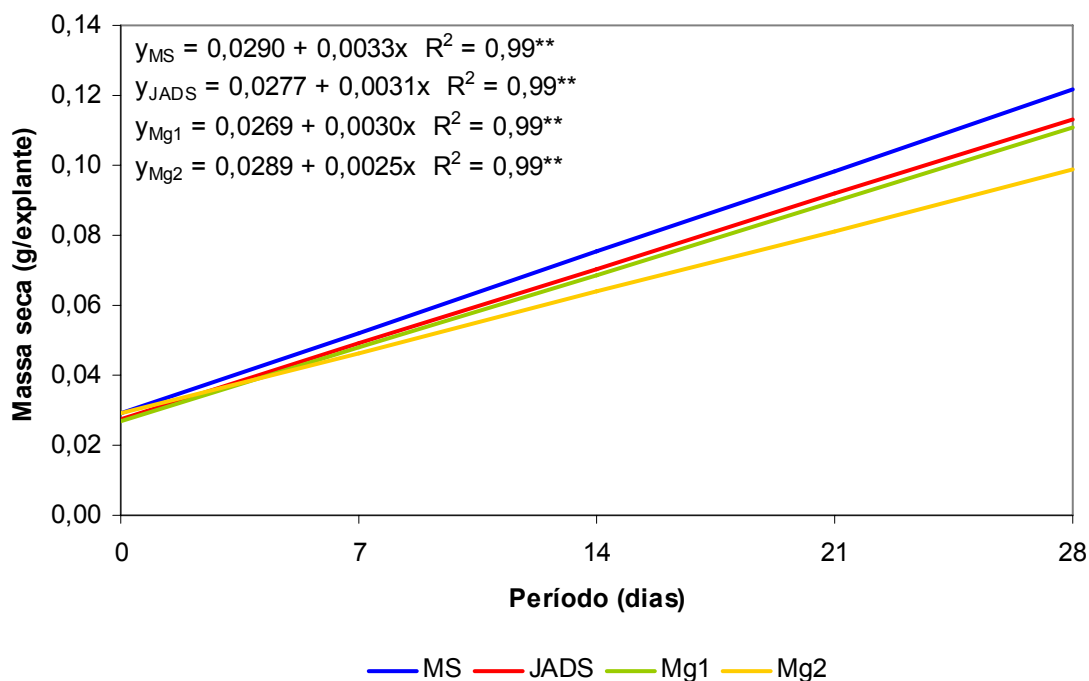


Figura 27 - Valores observados e funções ajustadas para a massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de magnésio, em função do período de cultivo. **Significativo ($p=0,0001$)

Os resultados obtidos mostraram que em todos os tratamentos houve incremento das massas fresca e seca das brotações, ao longo do período de cultivo. Do início ao final do período, as brotações apresentaram incrementos percentuais de massas fresca e seca de 382,1 e 420,2, 303,7 e 408,9, 346,8 e 411,3, 293,4 e 341,3, para os tratamentos MS, JADS, Mg₁ e Mg₂, respectivamente (Figuras 26 e 27).

Durante o período de cultivo, as produções de massas fresca e seca pouco diferiram entre os tratamentos, com exceção de MS e Mg₂. Em MS, o cultivo apresentou alta produção de massa fresca, no entanto com produção de massa seca pouco superior aos demais tratamentos; em Mg₂, apresentou a menor produção de massa seca da segunda semana aos 28 dias de cultivo (Figuras 26 e 27). Tanto Mg₁ quanto Mg₂ apresentaram boas características das brotações, como aglomerado homogêneo, crescimento uniforme e folhas médias (Tabela 7; Figura 12). Segundo Correia (2006), a concentração de magnésio de 3,0 mmol L⁻¹ (JADS) apresentou maior potencial para produção de massa fresca e seca em *Eucalyptus grandis* x *urophylla*,

enquanto concentrações inferiores e superiores a esta limitaram a produção das biomassas durante o ciclo de cultivo.

As respostas encontradas para as diferentes concentrações de magnésio, considerando os incrementos de massas fresca e seca, sugerem que a concentração total mais adequada deste nutriente para a multiplicação de *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro* situa-se na faixa de 1,5 a 3,0 mmol L⁻¹.

2.3.2.1.5.2 Porcentagem de massa seca

Para a variável porcentagem da massa seca, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, em meios de cultura suplementados com 1,5 (MS), 3,0 (JADS), 1,5 (Mg₁) e 4,5 (Mg₂) mmol L⁻¹ de magnésio, demonstrou que o modelo cúbico ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações deste nutriente (Figura 28).

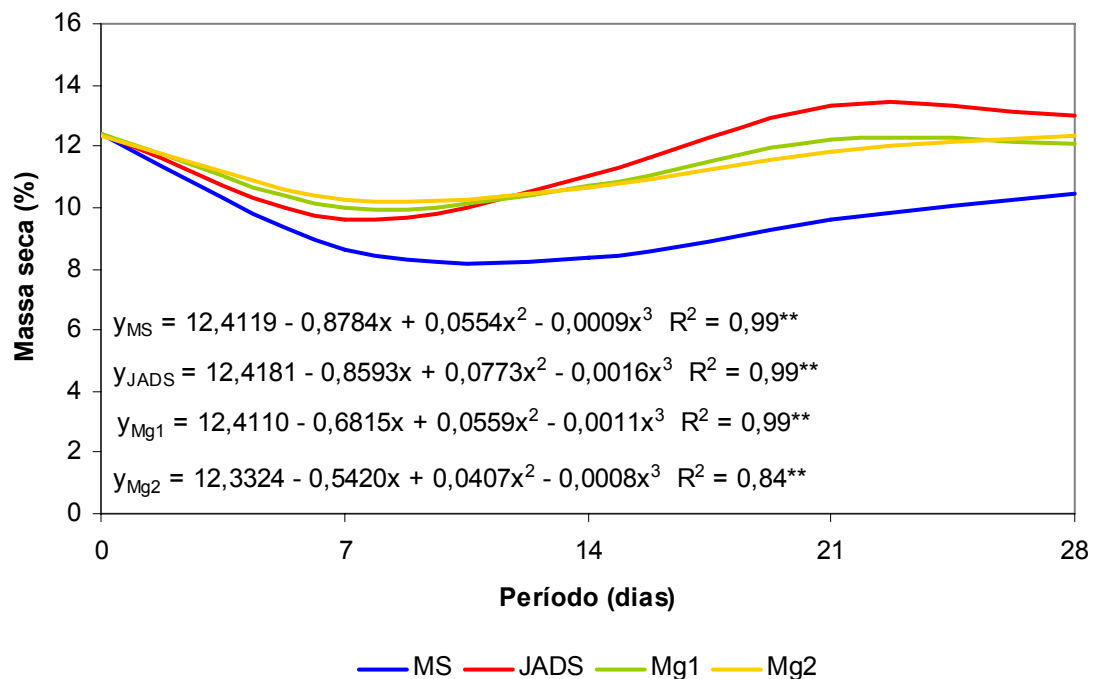


Figura 28 - Valores observados e funções ajustadas para a porcentagem da massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de magnésio, em função do período de cultivo. **Significativo ($p=0,0001$)

O comportamento das brotações nas concentrações Mg_1 e Mg_2 praticamente não diferem entre si quanto à porcentagem de massa seca. Tais concentrações apresentam porcentagem de massa seca inferior a JADS ($3,0 \text{ mmol L}^{-1}$), a partir dos 14 dias de cultivo; no entanto, não proporcionaram alterações morfológicas nas brotações (Tabela 7; Figuras 12 e 28).

2.3.2.1.5.3 Taxa de crescimento relativo

Para a variável taxa de crescimento relativo, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, em meios de cultura suplementados com 1,5 (MS), 3,0 (JADS), 1,5 (Mg_1) e 4,5 (Mg_2) mmol L^{-1} de magnésio, demonstrou que o modelo linear ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações deste nutriente (Figura 29).

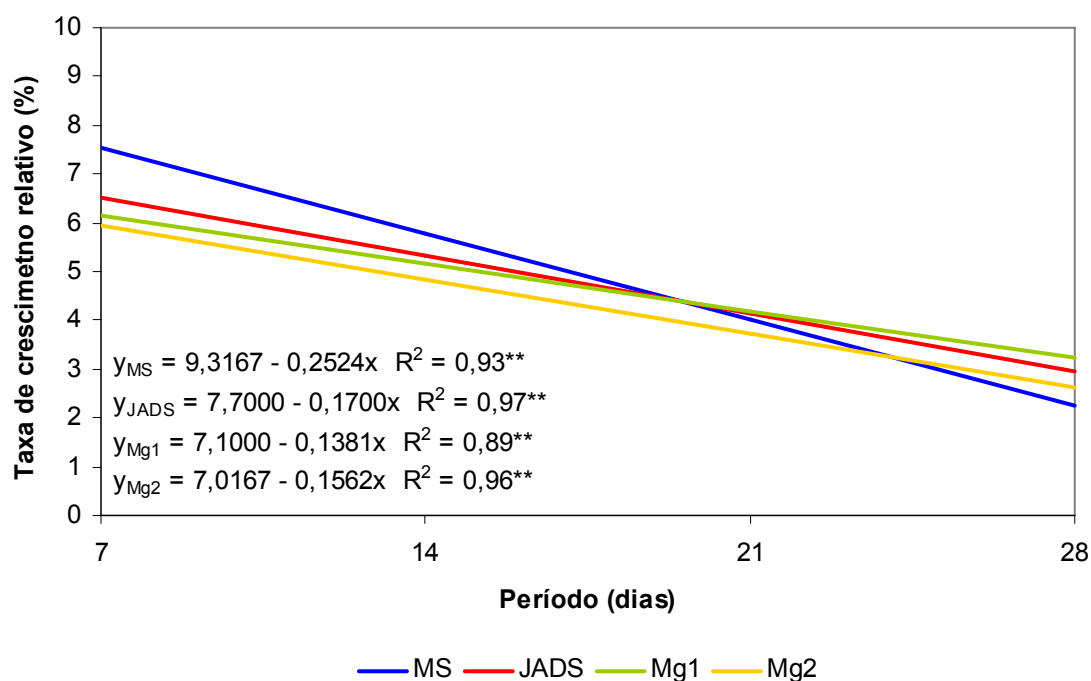


Figura 29 - Valores observados e funções ajustadas para a taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de magnésio, em função do período de cultivo. ** Significativo ($p=0,0001$)

Em todas as concentrações, as maiores taxas de crescimento relativo foram obtidas aos 7 dias, com MS apresentando o maior valor, seguido de JADS, Mg_1 e Mg_2 .

As menores taxas ocorreram aos 28 dias para Mg₁, seguido por JADS, Mg₂ e MS. As diferentes concentrações de magnésio testadas resultaram em padrões similares quanto à taxa de crescimento relativo, e foram decrescentes ao longo do período estudado (Figura 29).

2.3.2.2 Crescimento de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo

Os resultados da análise de variância para massa fresca, massa seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias, encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Resumo das análises de variância para massa fresca, massa seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo

Quadrados médios					
Fonte de variação	GL.	Massa fresca (g/explante)	Massa seca (g/explante)	Massa seca (%)	Taxa de crescimento relativo (%)
Tratamentos	9	0,1279**	0,0007**	2,9630**	3,9417**
Resíduo	100	0,0053	0,0001	0,6639	1,6521
F		23,907**	15,185**	4,463**	2,386**
CV (%)		11,54	9,77	7,15	27,11

**significativo pelo teste F, p = 0,0001

2.3.2.2.1 Massa fresca

Como pode-se observar na Figura 30, as maiores médias para produção de massa fresca foram obtidas em meios de cultura suplementados com maiores concentração de nitrogênio (N₂-1,44; MS-1,14 e N₁-1,13 g/explante). Essas médias apresentaram diferenças significativas entre si, a não ser entre MS e N₁. Em JADS, P₁, P₂, Ca₁, Ca₂, Mg₁ e Mg₂, as médias de massa fresca não apresentaram diferenças significativas entre si. Entre os macronutrientes, somente para nitrogênio houve

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

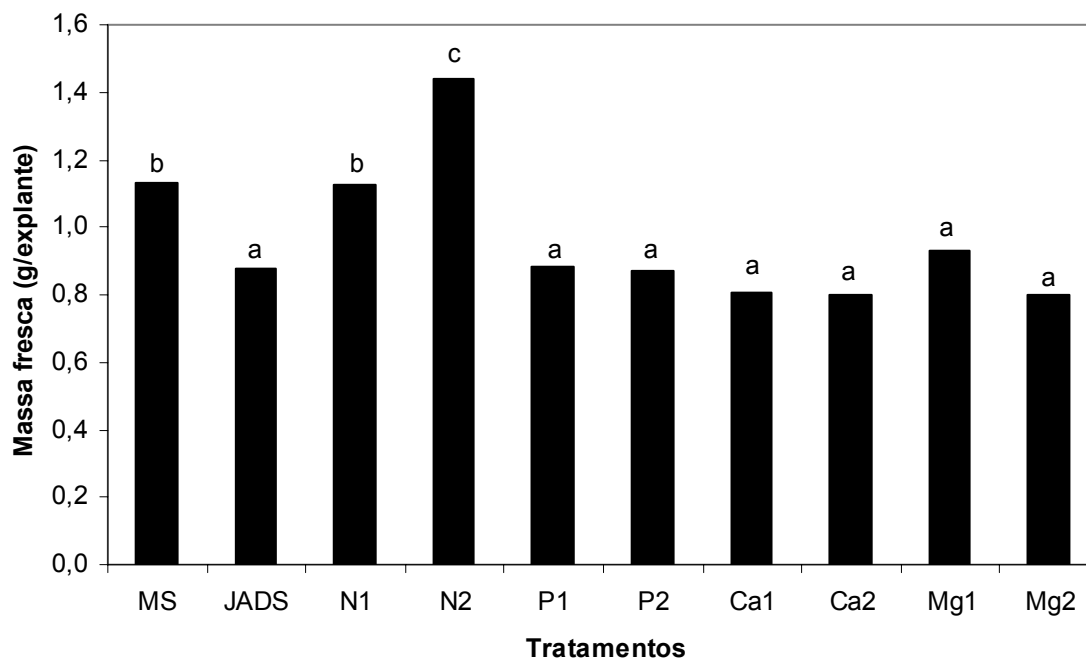


Figura 30 - Massa fresca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo. Médias indicadas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Em mmol L^{-1} : MS (N = 60,0; P = 1,25; Ca = 3,0; Mg = 1,5); JADS (N = 26,0; P = 3,0; Ca = 5,0; Mg = 3,0); N₁ = 45,0; N₂ = 60,0; P₁ = 1,0; P₂ = 2,0; Ca₁ = 7,5; Ca₂ = 10,0; Mg₁ = 1,5; Mg₂ = 4,5

Os maiores ganhos de massa fresca estão relacionados com as maiores concentrações de nitrogênio (N₁ com 45 mmol L^{-1} ; N₂ e MS, ambos com 60 mmol L^{-1}) (Figura 30). Entretanto, exceto em N₁, as brotações resultantes destes tratamentos (Tabela 7; Figuras 12 e 13) não apresentaram o padrão ideal de crescimento e multiplicação de brotações de *Eucalyptus in vitro*: aglomerados com folhas pequenas, vigorosas, com tamanho uniforme e homogêneo, que proporcione alta rentabilidade no estabelecimento de novos explantes no sistema comercial de micropropagação (CORREIA et al., 1995). Sendo assim, pode-se inferir que os níveis de nitrogênio em N₂ e MS foram excessivos e favoreceram o estabelecimento de interações iônicas que limitaram a absorção de um ou mais nutrientes e/ou a ocorrência de desvios metabólicos conduzindo a distúrbios fisiológicos, que em 28 dias de cultivo causaram

modificações como: redução do vigor, redução da maciez do tecido foliar, intumescimento das hastes e hiperhidria.

Os resultados mostraram que a menor produção de massa fresca relaciona-se com a menor concentração de nitrogênio (Figura 30), conforme já apontado por Epstein e Bloom (2005). No presente estudo, a importância deste elemento para o crescimento e desenvolvimento de brotações é evidenciado, sendo definida uma concentração ótima para a fase de multiplicação de *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro*.

2.3.2.2.2 Massa seca

A Figura 31 mostra que as maiores médias para produção de massa seca foram obtidas em meios de cultura suplementados com maiores concentração de nitrogênio (N_2 -0,15 e N_1 -0,13 g/explante), as quais não se diferenciam significativamente. Apesar da concentração de N em MS e N_2 (60,0 mmol L⁻¹) ser a mesma, estes tratamentos diferenciam-se de forma significativa. As menores produções de massa seca foram obtidas nas concentrações de cálcio, magnésio e fósforo, exceto em MS e P_2 , que apresentaram produções intermediárias (0,12 e 0,11 g/explante, respectivamente).

Pela metodologia utilizada (4 explantes por parcela em 40 mL de meio), aos 28 dias de cultivo obteve-se as maiores produções, correspondentes a 13 e 15 g de matéria seca L⁻¹ de meio de cultura em N_1 e N_2 , respectivamente. Em JADS e MS, foram obtidas produções de 11 e 12 g de matéria seca L⁻¹ de meio de cultura, respectivamente.

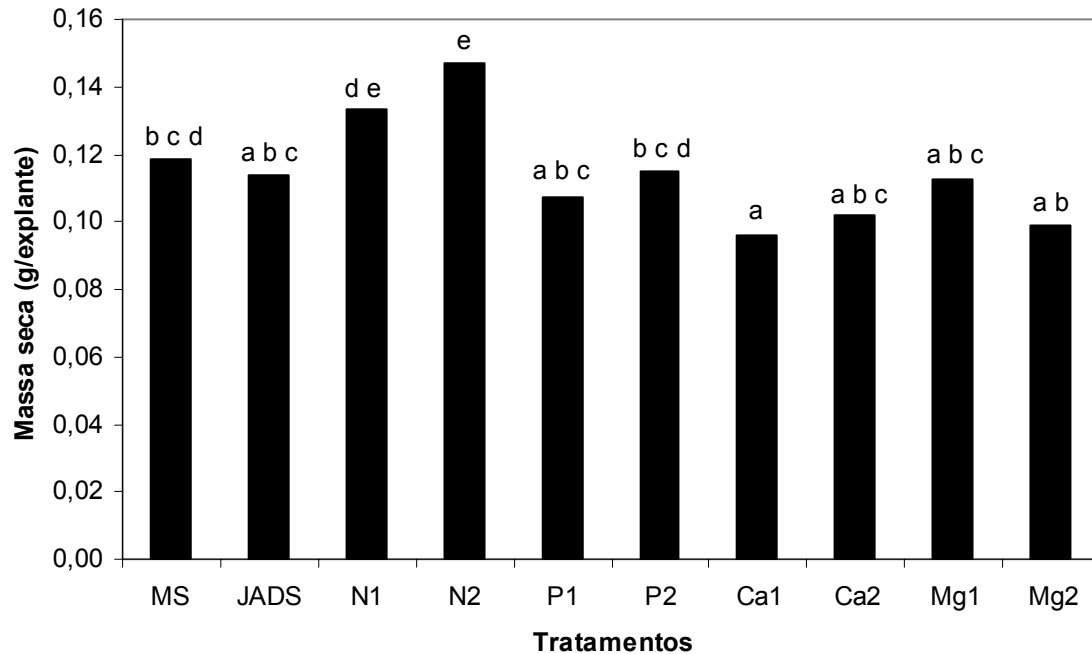


Figura 31 - Massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo. Médias indicadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Em mmol L^{-1} : MS (N = 60,0; P = 1,25; Ca = 3,0; Mg = 1,5); JADS (N = 26,0; P = 3,0; Ca = 5,0; Mg = 3,0); N₁ = 45,0; N₂ = 60,0; P₁ = 1,0; P₂ = 2,0; Ca₁ = 7,5; Ca₂ = 10,0; Mg₁ = 1,5; Mg₂ = 4,5

Lima (2004), cultivando clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, e Higashi e Gonçalves (2006), cultivando *Eucalyptus grandis* Hill., ambos em meio de cultura JADS, obtiveram, aos 21 dias de cultivo, produções médias de 13,5 e 12,8g de matéria seca L^{-1} de meio de cultura, respectivamente.

No entanto, nos experimentos aqui realizados, apesar de N₂ apresentar maior produção de massa seca que os demais tratamentos, sua elevada concentração de nitrogênio favoreceu o surgimento de características morfológicas indesejadas nas brotações, no que diz respeito à multiplicação de brotações *in vitro*, fato este também notado em MS (Tabela 7; Figura 13). Dentre as concentrações testadas, a que apresentou melhor relação produção de massa seca/boas características morfológicas das brotações, foi N₁ (45,0 mmol L^{-1}). JADS apresentou menor ganho de massa seca em relação à N₁, porém, destacou-se por obter as características mais adequadas de crescimento das brotações (Tabela 7; Figura 12). Sendo assim, em N₁, o crescimento

alcançado pelas brotações pode ser considerado mais próximo ao ótimo e adequado à multiplicação de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro*.

2.3.2.2.3 Porcentagem de massa seca

As médias de porcentagem de massa seca variaram de 10,2 a 13,2%. Segundo Epstein e Bloom (2005), o acúmulo de massa seca nestes níveis, e conseqüentemente a correspondente porcentagem de água nos tecidos vegetais (86,8 a 89,8%), pode ser considerada adequada ao desenvolvimento das plantas. JADS, P₂ e Ca₂ apresentaram as maiores médias de porcentagem de massa seca, diferenciando-se significativamente apenas de N₂ e MS, que apresentam as menores porcentagens de massa seca (Figura 32).

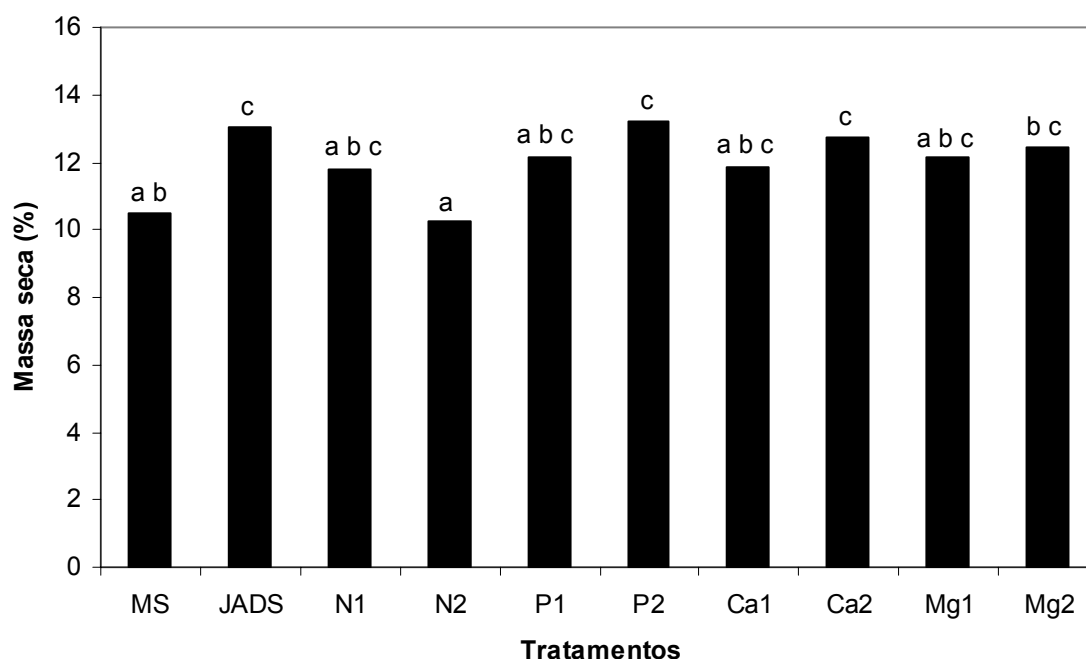


Figura 32 - Porcentagem de massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo. Médias indicadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Em mmol L^{-1} : MS (N = 60,0; P = 1,25; Ca = 3,0; Mg = 1,5); JADS (N = 26,0; P = 3,0; Ca = 5,0; Mg = 3,0); N₁ = 45,0; N₂ = 60,0; P₁ = 1,0; P₂ = 2,0; Ca₁ = 7,5; Ca₂ = 10,0; Mg₁ = 1,5; Mg₂ = 4,5

A hiperhidria, ocorrida principalmente nos tratamentos N₂ e MS, favoreceu o aumento da quantidade de água nos tecidos das brotações, resultando em menores incrementos de massa seca produzida e, conseqüentemente, menor porcentagem de massa seca. De acordo com os resultados obtidos fica evidente a importância do nitrogênio no processo de crescimento das plantas, o que está relacionado às exigências nutricionais de cada espécie.

2.3.2.2.4 Taxa de crescimento relativo

A maior taxa de crescimento relativo foi obtida na concentração N₁, diferenciando-se significativamente das encontradas nos demais tratamentos (Figura 33). Este resultado sugere que, para esta concentração de nitrogênio (45,0 mmol L⁻¹), o incremento de massas fresca e seca foi mantido, sem que ocorresse estabilização no crescimento das brotações. Os demais tratamentos apresentaram taxas de crescimento relativo intermediárias, a não ser Ca₁, que apresentou baixa taxa.

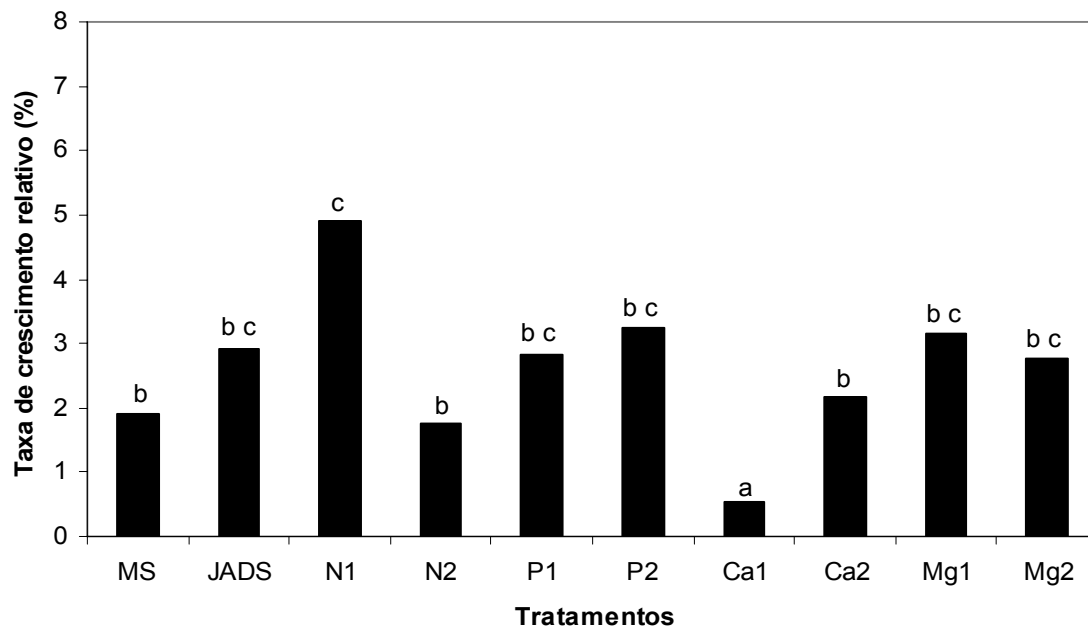


Figura 33 - Taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo. Médias indicadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Em mmol L⁻¹: MS (N = 60,0; P = 1,25; Ca = 3,0; Mg = 1,5); JADS (N = 26,0; P = 3,0; Ca = 5,0; Mg = 3,0); N₁ = 45,0; N₂ = 60,0; P₁ = 1,0; P₂ = 2,0; Ca₁ = 7,5; Ca₂ = 10,0; Mg₁ = 1,5; Mg₂ = 4,5

Altas taxas de crescimento relativo são almejadas no período de cultivo *in vitro* estipulado. Ca₁, apesar de apresentar uma das maiores médias de taxa de crescimento relativo dentre os tratamentos, no período entre 7 e 14 dias de cultivo, resultou no menor crescimento relativo ao final do período estudado (Figura 33), sugerindo estabilização do crescimento das brotações após as duas primeiras semanas de cultivo *in vitro*.

As taxas de crescimento relativo para as concentrações testadas em *Eucalyptus globulus* Labill. foram inferiores às encontradas por Correia (2006), que utilizou o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Segundo este autor, altas taxas de crescimento relativo podem estar relacionadas ao melhoramento do material genético utilizado.

2.3.3 Experimento III

2.3.3.1 Crescimento de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivados em diferentes concentrações de macronutrientes *in vitro*, em função do período de cultivo.

2.3.3.1.1 Observações visuais

Da mesma forma que no experimento anterior, os resultados dos diferentes tratamentos mostraram que a morfogênese das brotações foi afetada em função do macronutriente e da concentração utilizada. Além das diferenças de ganhos de biomassa ocorridas em função dos tratamentos, algumas características foram visualmente observadas nos explantes, ao final dos 28 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 9).

Tabela 9 - Características visuais das brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, sob diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo

Tratamentos (mmol L ⁻¹)	Crescimento das brotações	Tamanho das Folhas	Textura do tecido vegetal	Vigor
MS*	<ul style="list-style-type: none"> ● Multiplicação heterogênea e desuniforme ● Crescimento intenso 	<ul style="list-style-type: none"> ● Médias e grandes 	<ul style="list-style-type: none"> ● Maciez reduzida ● Média frequência de lâminas foliares encurvadas para baixo e para cima ● Presença de folhas quebradiças (hiperhidria) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Regular
JADS**	<ul style="list-style-type: none"> ● Multiplicação homogênea e uniforme ● Crescimento médio 	<ul style="list-style-type: none"> ● Médias 	<ul style="list-style-type: none"> ● Macia 	<ul style="list-style-type: none"> ● Bom
N₁Ca₁ (45,0; 7,5)	<ul style="list-style-type: none"> ● Multiplicação homogênea e uniforme ● Crescimento intenso 	<ul style="list-style-type: none"> ● Médias 	<ul style="list-style-type: none"> ● Macia ● Baixa frequência de lâminas foliares encurvadas para baixo 	<ul style="list-style-type: none"> ● Bom
N₂Ca₁ (60,0; 7,5)	<ul style="list-style-type: none"> ● Multiplicação heterogênea e desuniforme ● Crescimento intenso 	<ul style="list-style-type: none"> ● Médias 	<ul style="list-style-type: none"> ● Maciez reduzida ● Alta frequência de lâminas foliares encurvadas para baixo. ● Presença de folhas quebradiças (hiperhidria) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Ruim

*(N = 60,0; P = 1,25; Ca = 3,0; Mg = 1,5 mmol L⁻¹); **(N = 26,0; P = 3,0; Ca = 5,0; Mg = 3,0 mmol L⁻¹)

As características de crescimento, aos 28 dias de cultivo, encontram-se reunidas na Tabela 9 e mostradas na Figura 34. A Figura 35 mostra, com maior detalhe, características de crescimento de brotações referentes aos tratamentos N₁Ca₁ e N₂Ca₁.

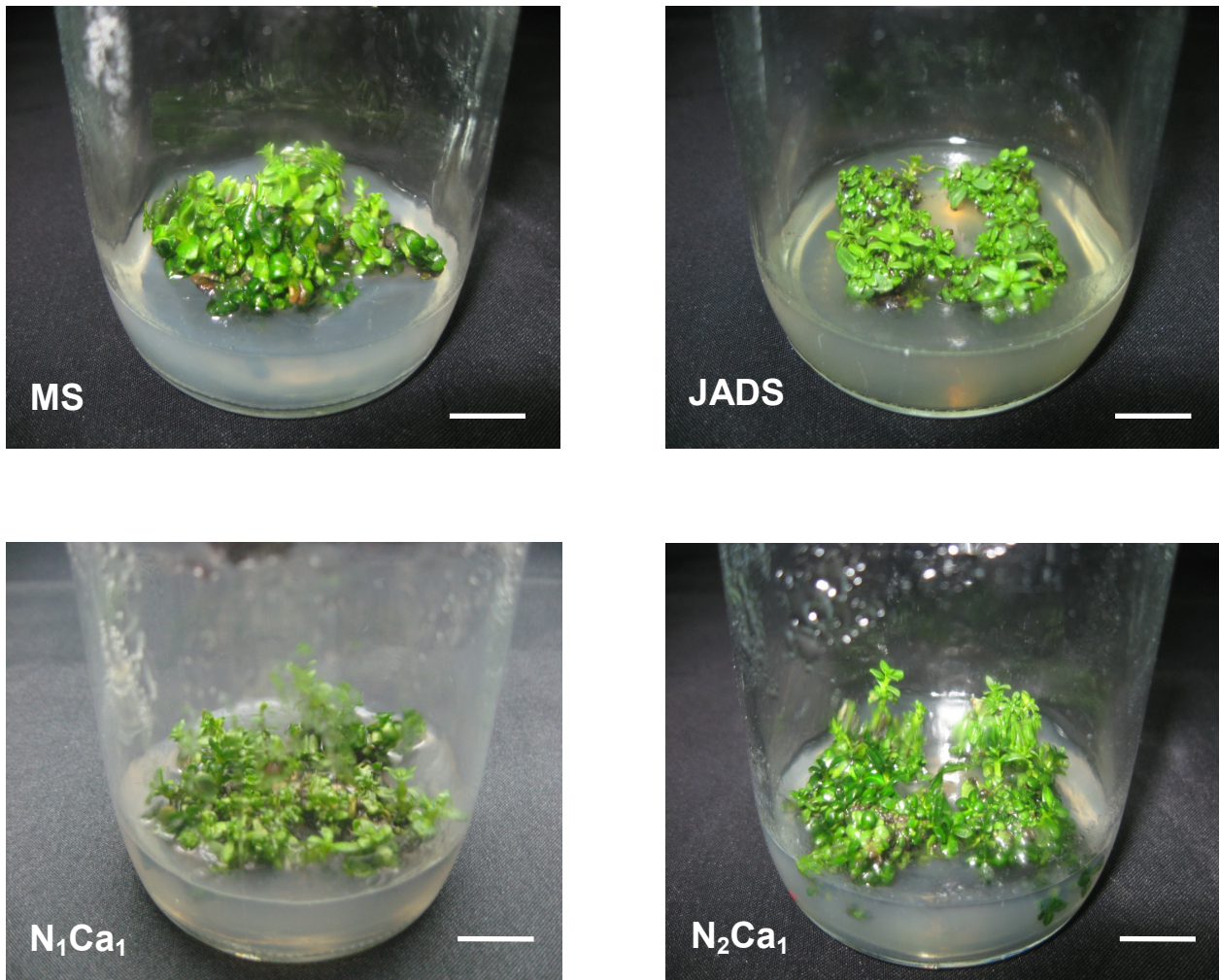


Figura 34 - Características do crescimento de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo *in vitro*. Em mmol L⁻¹: MS (N = 60,0; P = 1,25; Ca = 3,0; Mg = 1,5); JADS (N = 26,0; P = 3,0; Ca = 5,0; Mg = 3,0); N₁Ca₁ = 45,0 e 7,5, respectivamente; N₂Ca₁ = 60,0 e 7,5, respectivamente. Barras = 1cm

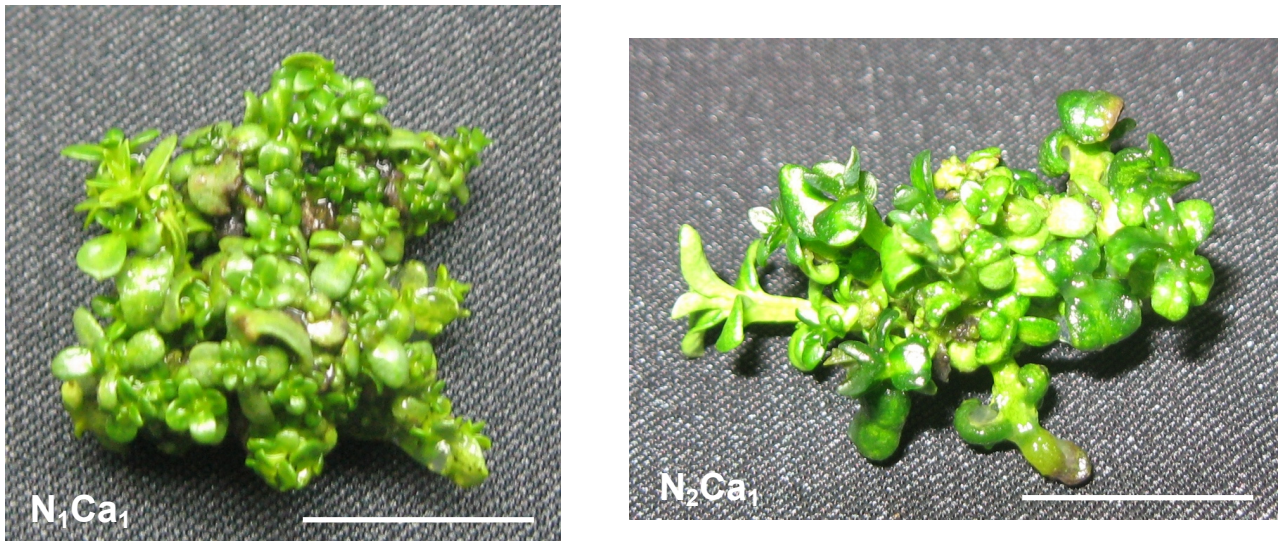


Figura 35 - Detalhes de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo *in vitro*. Em mmol L⁻¹: N₁Ca₁ = 45,0 e 7,5, respectivamente; N₂Ca₁ = 60,0 e 7,5, respectivamente. Barras = 1cm

O crescimento foi mais acentuado nas brotações referentes aos tratamentos com maiores concentrações de nitrogênio. No entanto, em MS e N₂Ca₁, o crescimento dessas brotações deu-se fora do padrão considerado adequado à multiplicação das mesmas dentro de sistema de cultura *in vitro* de *Eucalyptus* (Tabela 9; Figuras 34 e 35). Visualmente, o tratamento N₂Ca₁ foi o que mais apresentou crescimento inadequado de suas brotações, com deformações foliares e hiperhidria. O tratamento N₁Ca₁ apresentou um crescimento elevado das brotações, com características de crescimento mais favoráveis, em comparação com os demais tratamentos que também apresentaram crescimento elevado (N₂Ca₁ e MS) (Tabela 9; Figura 35).

2.3.3.1.2 Efeito do nitrogênio e do cálcio

2.3.3.1.2.1 Massas fresca e seca

Para as variáveis massa fresca e massa seca, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, em meios de cultura suplementados com 60,0 e 3,0 (MS), 26,0 e 5,0 (JADS), 45,0 e 7,5 (N₁Ca₁) e 60,0 e 7,5 (N₂Ca₁) mmol L⁻¹ de nitrogênio e cálcio, respectivamente, demonstrou que o modelo

linear ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações destes nutrientes (Figuras 36 e 37).

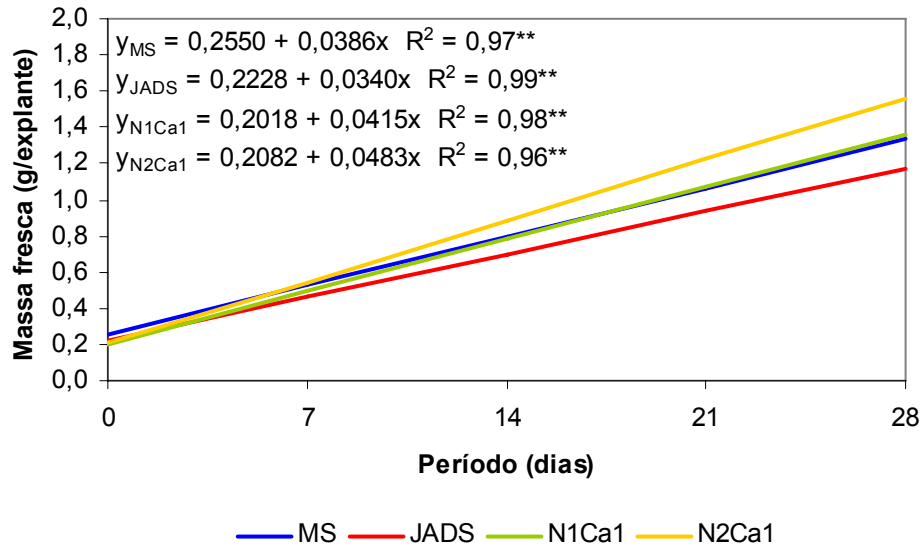


Figura 36 - Valores observados e funções ajustadas para a massa fresca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de nitrogênio e cálcio, em função do período cultivo. ** Significativo ($p=0,0001$)

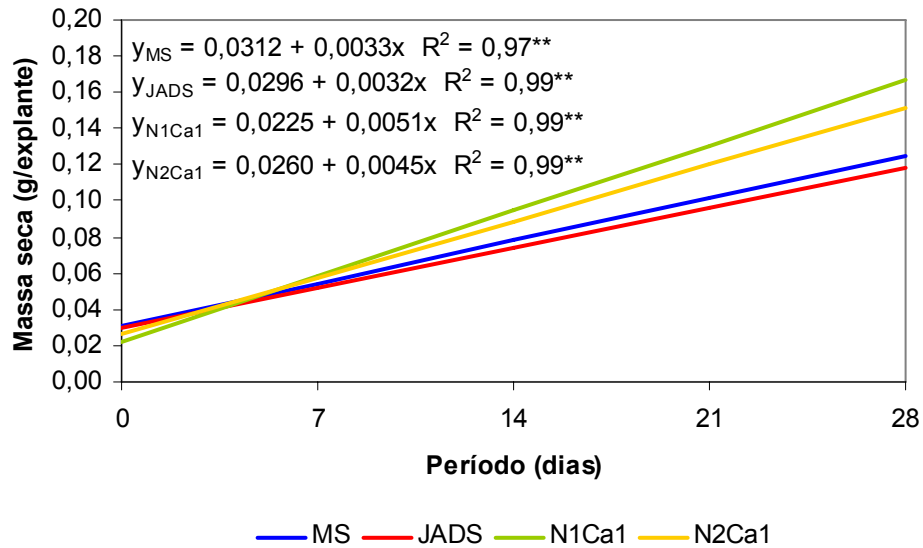


Figura 37 - Valores observados e funções ajustadas para a massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de nitrogênio e cálcio, em função do período cultivo. ** Significativo ($p=0,0001$)

Os resultados obtidos mostraram que em todos os tratamentos houve incremento das massas fresca e seca das brotações ao longo do período de cultivo. Do início ao final do período de cultivo, as brotações apresentaram incrementos percentuais de massas fresca e seca de 523,5 e 400,5, 527,3 e 401,7, 675,4 e 740,7, 749,2 e 582,7, para os tratamentos MS, JADS, N₁Ca₁ e N₂Ca₂, respectivamente (Figuras 36 e 37).

Entre as concentrações de nitrogênio, observou-se que o crescimento das brotações na menor concentração (JADS-26,0 mmol L⁻¹) foi menor que nos demais, a partir da segunda semana de cultivo, resultando nas menores produções de massa fresca e seca (Figuras 36 e 37). A exemplo do experimento anterior, este tratamento apresentou brotações com boas características de crescimento, como aglomerado homogêneo, crescimento uniforme e folhas pequenas e médias (Tabela 9, Figura 34).

Aos 28 dias de cultivo, as concentrações de nitrogênio presentes nos tratamentos MS (60,0 mmol L⁻¹) e N₁Ca₁ (45,0 mmol L⁻¹) resultaram em crescimento das brotações inferior à N₂Ca₁, quanto aos incrementos de massa fresca (Figura 36). No entanto, e também de maneira similar ao experimento anterior, o tratamento MS (60,0 mmol L⁻¹) apresentou brotações com incremento reduzido de massa seca em relação à sua massa fresca. Ademais, neste tratamento notou-se hiperhidria, o que comprometeu o vigor das brotações (Tabela 9; Figuras 35, 36 e 37).

Durante o ciclo de cultivo, a maior produção de massa fresca foi obtida em N₂Ca₁. No entanto, este tratamento não propiciou a maior produção de massa seca e foi o que mais apresentou características de crescimento indesejáveis das brotações, como aglomerado heterogêneo, crescimento desuniforme, folhas médias e grandes, alta frequência de lâminas foliares encurvadas para baixo, vigor ruim e acentuada hiperhidria (Tabela 9; Figuras 35, 36 e 37).

O tratamento N₁Ca₁ (45,0 e 7,5 mmol L⁻¹ de N e Ca, respectivamente) não apresentou hiperhidria e obteve a maior produção de massa seca, aos 28 dias de cultivo, resultando em brotações com boas características de crescimento (Tabela 9; Figura 37).

Estas respostas corroboram as encontradas no experimento II e sugerem que ajustes nutricionais no meio de cultura são necessários para a obtenção do crescimento

ótimo e máximo das brotações *in vitro*, conforme já aventado por Gribble et al. (2002), Kanashiro (2005) e Correia (2006).

2.3.3.1.2.2 Porcentagem de massa seca

Para a variável porcentagem de massa seca, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, em meios de cultura suplementados com 60,0 e 3,0 (MS), 26,0 e 5,0 (JADS), 45,0 e 7,5 (N₁Ca₁) e 60,0 e 7,5 (N₂Ca₁) mmol L⁻¹ de nitrogênio e cálcio, respectivamente, demonstrou que o modelo linear ($p=0,0001$) foi significativo para todas as concentrações destes nutrientes (Figura 38).

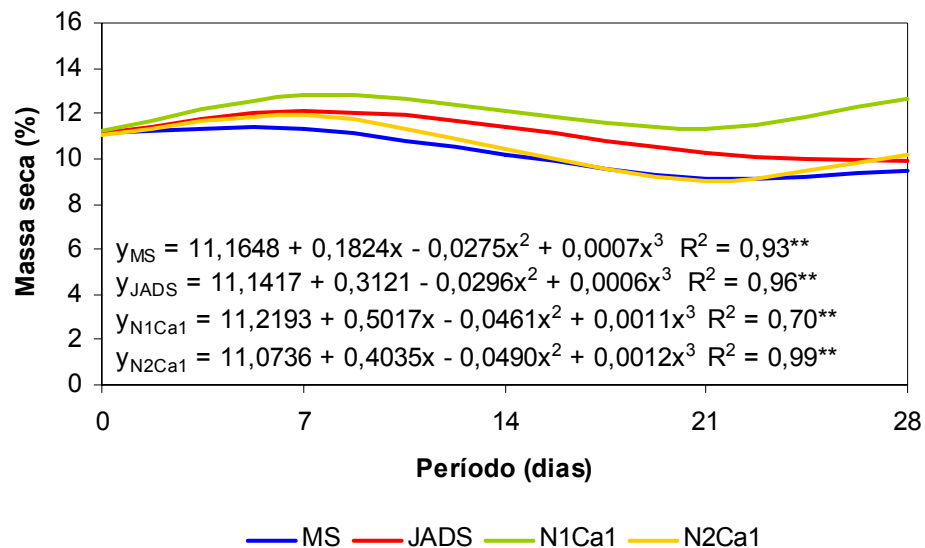


Figura 38 - Valores observados e funções ajustadas para a porcentagem da massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de nitrogênio e cálcio, em função do período cultivo. **Significativo ($p=0,0001$)

As menores porcentagens de massa seca ocorreram nas concentrações de 60,0 mmol L⁻¹ de nitrogênio (MS e N₂Ca₁), durante praticamente todo o período estudado, apresentando os menores valores aos 21 dias de cultivo. Além disso, ocorreu hiperhidria nas brotações destes tratamentos, sendo mais acentuada em N₂Ca₁ (Tabela 9; Figuras 35 e 38).

No entanto, o tratamento N₁Ca₁ resultou em pouca variação da porcentagem de massa seca durante os 28 dias de cultivo, obtendo as maiores produções, sem que as

brotações apresentassem deformações morfológicas, desfavoráveis ao cultivo *in vitro* (Tabela 9; Figuras 34, 35 e 38). Estes resultados indicam que as concentrações de nitrogênio (45,0 mmol L⁻¹) e cálcio (7,5 mmol L⁻¹) utilizadas estão próximas dos valores ideais para o crescimento máximo e ótimo das brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro*.

2.3.3.1.2.3 Taxa de crescimento relativo

Para a variável taxa de crescimento relativo, a aplicação da análise de variância da regressão, em função do período de cultivo, em meios de cultura suplementados com 60,0 e 3,0 (MS), 26,0 e 5,0 (JADS), 45,0 e 7,5 (N₁Ca₁) e 60,0 e 7,5 (N₂Ca₁) mmol L⁻¹ de nitrogênio e cálcio, respectivamente, demonstrou que o modelo linear (p=0,0001) foi significativo para todas as concentrações destes nutrientes (Figura 39).

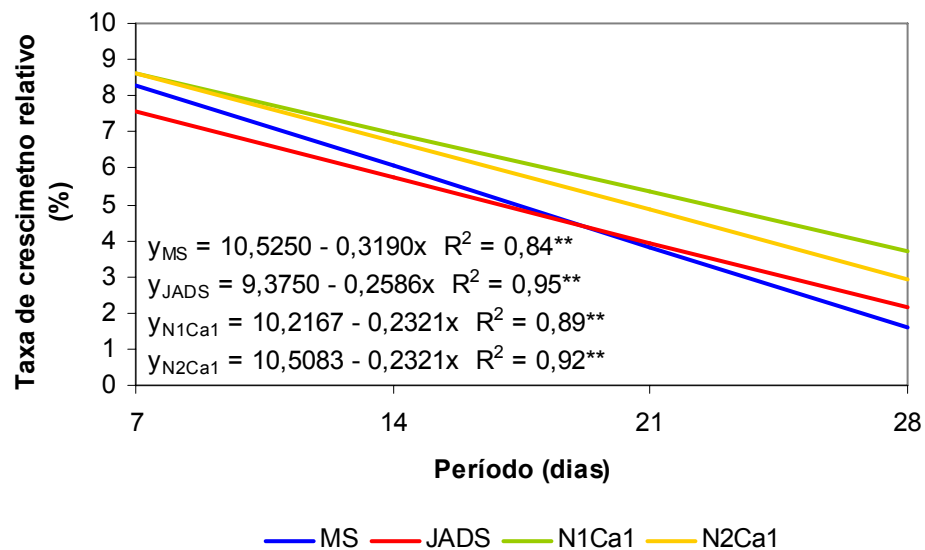


Figura 39 - Valores observados e funções ajustadas para a taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de nitrogênio e cálcio, em função do período cultivo. ******Significativo (p=0,0001)

As maiores taxas de crescimento relativo ocorreram aos 7 dias de cultivo, sendo maiores em N₁Ca₁ e N₂Ca₁, seguidos de MS e JADS. Já aos 28 dias de cultivo, o crescimento relativo das brotações foi maior em N₁Ca₁, seguido por N₂Ca₁, JADS e MS.

Durante o período estudado, houve redução da taxa de crescimento relativo em todos os tratamentos. No entanto, tal redução apresentou-se de forma menos acentuada em N₁Ca₁ e N₂Ca₁, tratamentos esses que resultaram nas maiores taxas de crescimento relativo ao longo de todo o período, sugerindo que o nitrogênio e o cálcio, nas concentrações 45,0 e 7,5 mmol L⁻¹, respectivamente, mantiveram o crescimento das brotações e propiciaram um bom crescimento e desenvolvimento das mesmas, sem que estas apresentassem características morfológicas indesejáveis ao cultivo *in vitro* (Tabela 9; Figuras 34, 35 e 39).

2.3.3.2 Crescimento de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo

Os resultados da análise de variância para massa fresca, massa seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivados *in vitro*, em meios de cultura com diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo, encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados das análises de variância para massa fresca, massa seca, porcentagem de massa seca e taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo

Quadrados médios					
Fonte de variação	GL.	Massa fresca (g/explante)	Massa seca (g/explante)	Massa seca (%)	Taxa de crescimento relativo (%)
Tratamentos	3	0,0940**	0,0037**	11,7860**	2,1604**
Resíduo	100	0,0064	0,0001	0,3624	1,9623
F		14,741**	58,840**	32,518**	1,101**
CV (%)		10,11	9,50	5,51	25,78

**significativo pelo teste F, p = 0,0001

2.3.3.2.1 Massa fresca

Conforme mostrado na Figura 40, as maiores médias para produção de massa fresca foram obtidas em meios de cultura suplementados com maiores concentrações de nitrogênio e cálcio (N_2Ca_1 -1,46 e N_1Ca_1 -1,34 g/explante), as quais apresentaram diferenças significativas em relação à JADS; N_2Ca_1 difere significativamente de MS que, por sua vez, não diferente significativamente de N_1Ca_1 .

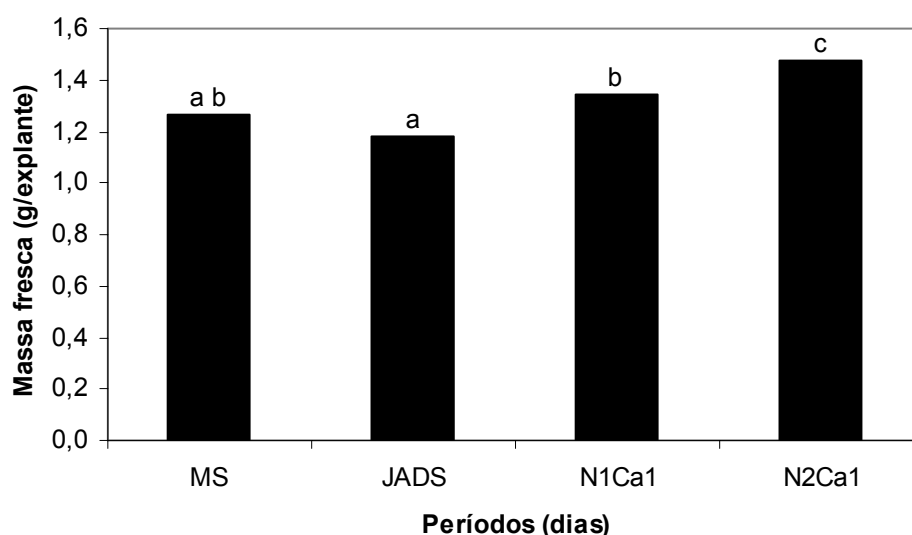


Figura 40 - Massa fresca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo. Médias indicadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Em mmol L^{-1} : MS (N = 60,0; P = 1,25; Ca = 3,0; Mg = 1,5); JADS (N = 26,0; P = 3,0; Ca = 5,0; Mg = 3,0); N_1Ca_1 = 45,0 e 7,5, respectivamente; N_2Ca_1 = 60,0 e 7,5, respectivamente

Tanto em MS quanto em N_2Ca_1 , as brotações apresentaram variações morfológicas indesejadas ao cultivo *in vitro*, como redução do vigor, redução da maciez do tecido foliar, intumescimento das hastes e hiperhidria. Em N_1Ca_1 , as características morfológicas apresentaram-se mais favoráveis à multiplicação das brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro* (Tabela 9; Figuras 34 e 35). Este tratamento sugere que o nitrogênio, na concentração $45,0 \text{ mmol L}^{-1}$, juntamente com o cálcio, na concentração $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$, contribuiu de forma positiva para o aumento da produção de massa fresca, sem que as brotações apresentassem deformações morfológicas.

2.3.3.2.2 Massa seca

À semelhança da produção de massa fresca, as maiores médias para produção de massa seca foram obtidas em meios de cultura suplementados com maiores concentrações de nitrogênio e cálcio; As médias de N₁Ca₁ e N₂Ca₁ apresentaram diferenças significativas entre si e com os demais tratamentos (JADS e MS) (Figura 41).

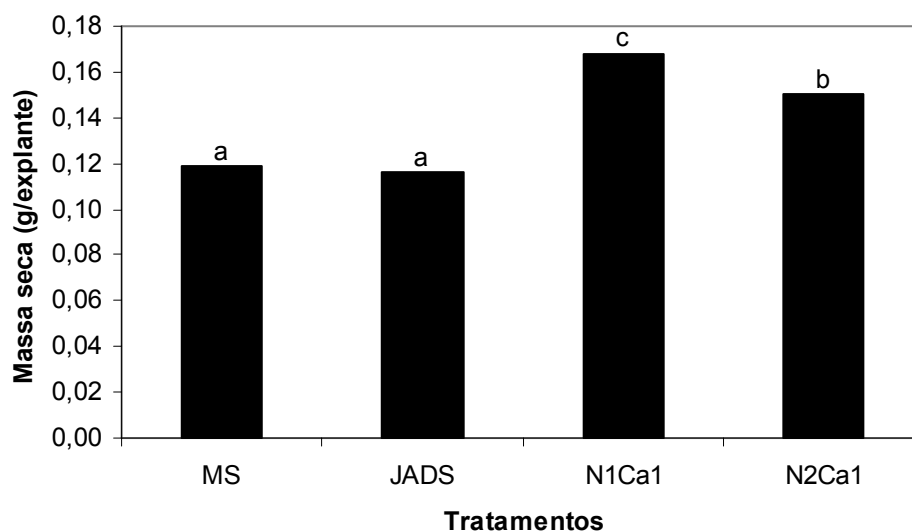


Figura 41 - Massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo. Médias indicadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Em mmol L⁻¹: MS (N = 60,0; P = 1,25; Ca = 3,0; Mg = 1,5); JADS (N = 26,0; P = 3,0; Ca = 5,0; Mg = 3,0); N₁Ca₁ = 45,0 e 7,5, respectivamente; N₂Ca₁ = 60,0 e 7,5, respectivamente.

No entanto, nem sempre as maiores produções de massa fresca correspondem às maiores produções de massa seca. Observou-se que a maior produção de massa fresca em N₂Ca₁ (1,46 g/explante) não resultou na maior produção de massa seca (0,15 g/explante), que foi obtida em N₁Ca₁ (0,17 g/explante). Já em N₂Ca₁ ocorreu hiperhidria, fato que está provavelmente associado à menor relação massa seca/massa fresca (Tabela 9; Figuras 40 e 41). As menores produções de massa seca foram encontradas em JADS e MS, sendo este último tratamento passível de brotações com características morfológicas indesejáveis ao cultivo *in vitro* (Tabela 9; Figura 41). Tanto JADS quanto N₁Ca₁ apresentaram brotações com boas características morfológicas.

As produções de massa seca representaram, aproximadamente, 17, 15, 12 e 11,5 g L⁻¹ de meio de cultura, para os tratamentos N₁Ca₁, N₂Ca₁, MS e JADS, respectivamente. Esses resultados sugerem que as concentrações de nitrogênio e cálcio em N₁Ca₁ (60,0 mmol L⁻¹ e 7,5 mmol L⁻¹) conduziram as brotações ao crescimento máximo e próximo ao ótimo em *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro*.

2.3.3.2.3 Porcentagem de massa seca

As médias de porcentagem de massa seca variaram de 9,4 a 12,6% (Figura 42); consequentemente, a água nos tecidos vegetais variou de 87,4 a 90,6%. O tratamento N₁Ca₁ destacou-se por apresentar a maior porcentagem de massa seca, diferenciando-se de forma significativa dos demais tratamentos, os quais não diferenciaram significativamente entre si. Os resultados obtidos em MS e N₂Ca₁ sugerem que a hiperhidria das brotações, ocorrida nestes tratamentos (Tabela 9), contribuiu de forma significativa para a maior produção de massa fresca e, consequentemente, maior conteúdo de água, resultando em menores porcentagens de massa seca.

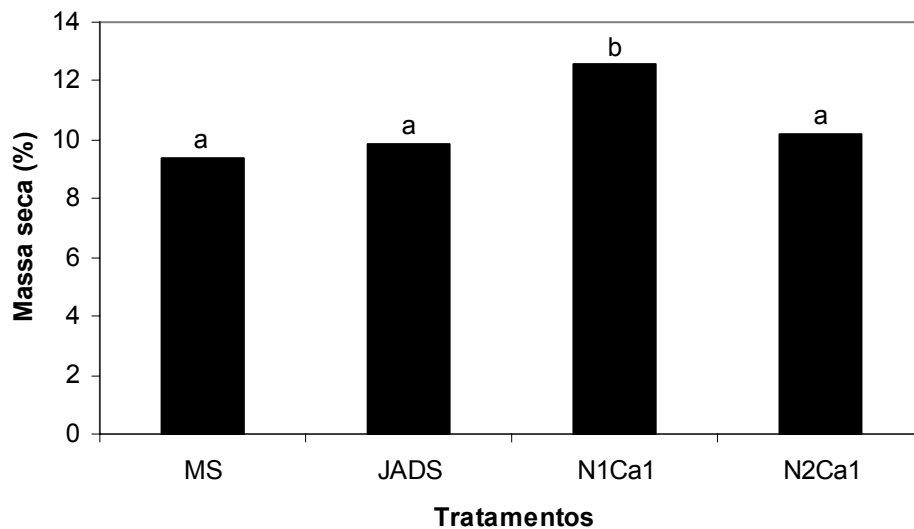


Figura 42 - Porcentagem de massa seca de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo. Médias indicadas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Em mmol L⁻¹: MS (N = 60,0; P = 1,25; Ca = 3,0; Mg = 1,5); JADS (N = 26,0; P = 3,0; Ca = 5,0; Mg = 3,0); N₁Ca₁ = 45,0 e 7,5, respectivamente; N₂Ca₁ = 60,0 e 7,5, respectivamente

Mesmo com o maior incremento de massas (fresca e seca) em N₁Ca₁, resultando na maior porcentagem de massa seca, as brotações deste tratamento apresentaram poucas características morfológicas desfavoráveis ao cultivo *in vitro* (Tabela 9; Figura 42).

2.3.3.2.4 Taxa de crescimento relativo

Aos 28 dias, a maior taxa de crescimento relativo foi obtida na concentração N₁Ca₁, diferenciando-se significativamente das encontradas nos demais tratamentos, exceto de N₂Ca₁ (Figura 43). Desta forma, fica evidente a relação positiva entre o nitrogênio e o crescimento das brotações. Ademais, o cálcio, na concentração utilizada em N₁Ca₁ e N₂Ca₁ (Ca-7,5 mmol L⁻¹), pode ter contribuído para a manutenção das taxas de crescimento relativo destes tratamentos.

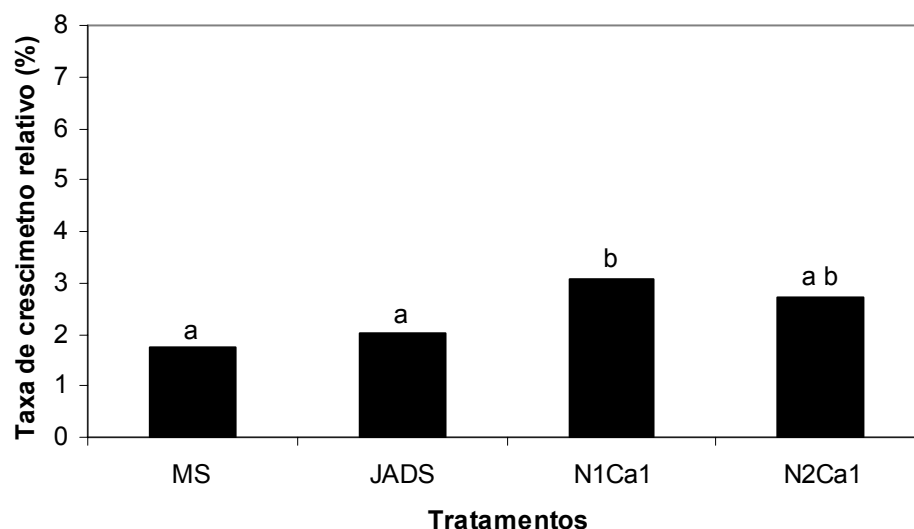


Figura 43 - Taxa de crescimento relativo de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações de macronutrientes, aos 28 dias de cultivo. Médias indicadas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Em mmol L⁻¹: MS (N = 60,0; P = 1,25; Ca = 3,0; Mg = 1,5); JADS (N = 26,0; P = 3,0; Ca = 5,0; Mg = 3,0); N₁Ca₁ = 45,0 e 7,5, respectivamente; N₂Ca₁ = 60,0 e 7,5, respectivamente

No entanto, as maiores taxas de crescimento relativo foram observadas aos 7 e 14 dias de cultivo. Sendo assim, para a manutenção de maiores taxas de crescimento relativo em *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro*, faz-se necessário a transferência das

brotações para novo meio de cultura entre 14 a 21 dias de cultivo, ou suplementação de nutrientes minerais na forma líquida após este período.

3 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante os experimentos permitem as conclusões abaixo elencadas:

- O tamanho do explante inicial pouco afetou o crescimento e desenvolvimento das brotações de *Eucalyptus globulus* Labill.;
- A produção de massa fresca e massa seca, a porcentagem de massa seca e a taxa de crescimento relativo de *Eucalyptus globulus* Labill. foram influenciadas pelos macronutrientes e pelas concentrações utilizadas;
- O crescimento máximo das brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. foi obtido em maiores concentrações de nitrogênio; no entanto, não apresentou o crescimento ótimo;
- O meio de cultura JADS mostrou ser mais adequado que MS em relação à multiplicação de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F.D. de; XAVIER, A.; DIAS, J.M.M. Propagação vegetativa de árvores selecionadas de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. por estaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 445-453, 2007.

AMARAL, A.F.C. **Comportamento in vitro de explantes de matrizes de cenoura (*Daucus carota* L.) tratadas com variáveis níveis de potássio**. 2003. 103 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

AQUINO, J.V. **Avances en la micropropagacion vegetativa in vitro de *Alnus acuminata*, *Pinus radiata* y *Eucalyptus globulus***. Cajamarca: ADEFOR, 1994. 7 p.

BELL, A.D. **Plant form: an illustrated guide to flowering plant morphology**. Oxford: Oxford University Press, 1991. 231p.

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

BERGMANN, W. **Colour atlas: nutritional disorders of plants**. New York: Gustav Fisher, 1992. 350 p.

BORGES, A.L.; OLIVEIRA, A.M.G.; SOUZA, L.S. Solos, nutrição e adubação. In: ALVES, E.J. (Ed.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: EMBRAPA, SPI; Cruz das Almas: EMBRAPA, CNPMF, 1997. p. 197-254.

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

BRONDANI, G.E. **Miniestaquia e Micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage X *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2008. 118 p. Dissertação (Mestrado em Silvicultura) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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

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

CARDIM, D.C. **Crescimento e desenvolvimento de brotações de progênies de *Eucalyptus grandis in vitro***. 2006. 45 p. Dissertação (Mestrado em Silvicultura e Manejo Florestal) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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

CHAPMAN, D.F.; LEMAIRE, G. Morphogenetic and structural determinants of plant regrowth after defoliation. In: BAKER M.J. (Ed.). **Grassland of our world**. Wellington: SIR Publ., 1993. p. 55-64.

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

CORREIA, D.; GRAÇA, M.E.C. *In vitro* propagation of black wattle (*Acácia meamsii* De Wild). Trabalho de Pesquisa. **IPEF**, Piracicaba, n. 48/49, p. 117-125, 1995.

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

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

DEL PONTE, E.M.; MATTEI, V.L.; PETERS, J.A.; ASSIS, T.F. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2001

DING, Y.; LUO, W.; XU, G. Characterization of magnesium nutrition and interaction of magnesium and potassium in rice. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 149, p. 111-123, 2006.

DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G.; SOUZA, E.S.; FRANÇA, J.G.E. Metabolismo de plantas de cana de açúcar cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1373-1379, 2003.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. 400 p.

_____. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. Londrina: Editora Paulista, 2006. 400 p.

FERGUSON, I.B.; DROBAK, B.K. Calcium and regulation of plant growth and senescence. **HortScience**, Alexandria, v. 23, n. 2, p. 262-266, 1988.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FUJITA, K.; OKADA, M.; LEI, K.; ITO, J.; OHKURA, K.; ADU_GYAMFI, J.J.; MOHAPATRA, P.K. Effect of P-deficiency on photoassimilate partitioning and rhythmic changes in fruit and stem diameter of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during fruit growth. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 392, p. 2519-2528, 2003.

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

GIACOMETTI, D.C. Impacto atual da cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP; EMBRAPA, 1990. p. 19-28.

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

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

_____. **Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake *in vitro***. 1982. 97 p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1982.

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

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

HARTNEY, V.J. Vegetative propagation of Eucalypts. **Australian Forestry Research**, Victoria, v.10, p. 191-211, 1980.

HARTNEY, V.J.; BARKER, P.K. The vegetative propagation of eucalypts by tissue culture. **Silviculture**, Victoria, v. 8, p. 791-792, 1983.

HELLER, R.; DARPAS, A.; DEVILLERS, P.; RICHEZ, M. Absorption et exsorption des tissus et fragments végétaux en culture. In: LES CULTURES de tissus de plants. Paris: CNRS, 1968. p. 149-169.

HERMANS, C.; VERBRUGGEN, N. Physiological characterization of Mg deficiency in *Arabidopsis thaliana*. **Photosynthetica**, Prague, v. 42, n. 2, p. 251- 255, 2004.

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

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

_____. **Omissão dos nutrientes minerais na produção de matéria seca, aspectos nutricionais e bioquímicos em *Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden) cultivado *in vitro***. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Ciências Florestais, Laboratório de Fisiologia das Árvores, 2006. 70 p.

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

HUNT, R. **Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis**. London: Edward Arnold, 1982. 248 p.

INGESTAD, T. Mineral nutrient requirements of *Pinus sylvestris* and *Picea Abies* seedlings. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 45, p. 373-380, 1979.

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

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

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

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

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B.R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 22, p. 205-211, 1997.

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

LARSON, C.G.; GÓMEZ, C.; OLATE, M.S.; RÍOS, D. Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucalyptus globulus*. **Bosque**, Valdivia, v. 27, n. 3, p. 250-257, 2006.

LAWLOR, D.W. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 773-787, 2002.

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

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

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

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

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

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

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1986. 674 p.

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

MASCARENHAS, H.A.A. **Cálcio, enxofre e ferro no solo e na planta**. Campinas: Fundação Cargill, 1977. 95 p.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A.; KOSEGARTEN, H.; APPEL, T. **Principles of plant nutrition**. 5th ed. Bern: International Potash Institute, 2001. 868 p.

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

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

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

NICCOL, R.J.; REGAN, P.A.; DE FILIPPIS, L.F. Simplified protocol for the micropropagation of selected *Eucalyptus* and *Banksia species*. **Australian Forestry**, Melbourne, v. 57, n. 4, p. 143-147, 1994.

PEREIRA, H.; ALMEIDA, M.H.; TOMÉ, M.; PEREIRA, J.S. *Eucalyptus globulus* Plantations: genetic, silvicultural and environmental control of fibre yield and quality. In: IUFRO CONFERENCE FOR TEMPERATE HARDWOOD FORESTRY, 1995, Hobart. **Proceedings...** Hobart: IUFRO, 1995. p. 46-48.

RAGHOTHAMA, K.G.; KARTHIKEYAN, A.S. Phosphate acquisition. **Plant and Soil**, Wageningen, v. 274, p. 37-49, 2005.

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

_____. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Oxon, v. 38, p. 115-124, 2002b.

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

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

RUŽIĆ, Đ.; SARIĆ, M.; ĆULAFIĆ, L.J. Uticaj pojedinih elemenata mineralne ishrane na fazu multiplikacije podloga za trešnju *in vitro*. **Jugoslovensko voćarstvo**, Belgrade, p. 117-128, 1997.

RUŽIĆ, Đ.; SARIĆ, M.; CEROVIĆ, R.; ĆULAFIĆ, L.J. Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, p. 9-14, 2000.

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

SANTOS, A.P. dos; XAVIER, A.; OLIVEIRA, M.L.; REIS, G.G. Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones de *Eucalyptus grandis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 68, p. 29-38, 2005.

SARIĆ, M.; MEZEI, S.; RUŽIĆ, Đ. Genetic aspects of mineral nutrition of plants grown *in vitro*. **Archives of Biological Sciences**, Belgrade, v. 47, p. 1-12, 1995.

SASSE, J. Problems with propagation of *Eucalyptus globulus* by stem cuttings. In: IUFRO CONFERENCE FOR TEMPERATE HARDWOOD FORESTRY, 1995, Hobart. **Proceedings...** Hobart: IUFRO, 1995. p. 319-320.

SATTLER, R.S.; RUTISHAUSER, R. The fundamental relevance on morphology and morphogenesis to plant research. **Annals of Botany**, Oxford, v. 80, p. 571-582, 1997.

SHANTHARAM, S.; MATTOO, A.K. Enhancing biological nitrogen fixation: an appraisal of current and alternative technologies for N input into plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 194, p. 205-216, 1997.

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

SHIMIZU, J. Aptidão de espécies e procedências de *Eucalyptus* para reflorestamento no planalto do Rio Grande do Sul. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 12, p. 1-12, 1986.

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

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

SOLETO, M.; MONZA, J. Micropropagation of *Eucalyptus globulus* elite trees. **Agrociencia**, Chapingov. 11, n. 1, p. 81-89, 2007.

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

TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e micropropagação**. 2001. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Clonal propagation of *Eucalyptus grandis* using the mini-cutting and micro-cutting techniques. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 71, p. 109-117, 2006.

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

TORIBIO, M.; PARDOS, J.A. Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry 5: trees II**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. v. 5, chap. 2, p. 479-506.

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

TRINDADE, H.; FERREIRA, J.G.; PAIS, M.S.; ALONI, R. The role of cytokinin and auxin in rapid multiplication of shoots of *Eucalyptus globulus* grown *in vitro*. **Australian Forestry**, Melbourne, v. 53, n. 3, p. 221-223, 1990.

XAVIER, A. **Silvicultura clonal I: princípios e técnicas de propagação vegetativa.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2002. 64 p

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

XAVIER, A.; COMÉRIO, J.; IANNELLI, C.M. Eficiência da estaquia, da microestaquia e da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* spp. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF *Eucalyptus*, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, 1997. v. 2, p. 40-45.

XAVIER, A.A.; SANFUENTES, E.V.; JUNGHANS, D.T.; ALFENAS, A.C. Resistência de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens* à ferrugem (*Puccinia psidii*). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 731-735, 2007.

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

WATT, M.P.; DUNCAN, M.; BLAKEWAY, F.C.; HERMAN, B. Field performance of micropropagated *Eucalyptus* hybrids. **South African Forestry Journal**, Pretoria, n. 173, p. 17- 21, 1995.

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