

LEANDRO SILVA DE OLIVEIRA

MICROPROPAGAÇÃO, MICROESTAQUIA E MINIESTAQUIA
DE CLONES HÍBRIDOS DE *Eucalyptus globulus*

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Florestal, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

LEANDRO SILVA DE OLIVEIRA

MICROPROPAGAÇÃO, MICROESTAQUIA E MINIESTAQUIA
DE CLONES HÍBRIDOS DE *Eucalyptus globulus*

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como parte
das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Florestal, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 01 de fevereiro de 2011

Prof. Haroldo Nogueira de Paiva
(Co-orientador)

Prof. Wagner Campos Otoni
(Co-orientador)

Pesq. Elizabete Keiko Takahashi

Prof. Aloisio Xavier
(Orientador)

*À minha família, especialmente aos meus pais
Geraldo Clemente de Oliveira e Carmelita Silva de Oliveira.*

*À minha irmã
Adriana Silva de Oliveira.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor por excelência da minha vida.

À minha família, pelo apoio, pelo amor e pela compreensão.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, pela oportunidade de realização deste treinamento.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor Aloisio Xavier, pela orientação, pela amizade e por todos os ensinamentos transmitidos.

À Empresa Celulose Nipo-Brasileira S.A. (CENIBRA), pelo fornecimento de material genético (clones).

Ao Professor Haroldo Nogueira de Paiva pela amizade e o apoio constante sempre que necessário.

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), especialmente ao Professor Wagner Campos Otoni e à Elisonete R. G. Lani, por todo o aprendizado e pela oportunidade de convívio.

Aos membros da banca examinadora, pelas críticas e sugestões.

Aos integrantes do grupo de Pesquisa e Desenvolvimento em Silvicultura Clonal: William, Anne, Poliana, Cibele, Tiago, Julyana, Gleidson, Giovani e Victor, pela ajuda e troca de experiências.

Aos meus estagiários Aline e Tiago que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários e amigos do Viveiro de Pesquisas Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da UFV, Sebastião, Alex, João, Vítor, Lucas e Eduardo, pelo auxílio nos experimentos e na coleta de dados.

Ao meu amigo Daniel H. Breda Binoti, pela amizade e por todos os auxílios, principalmente com as análises estatísticas.

Ao meu amigo Felipe Coelho de Souza, pelo convívio e amizade, um exemplo de pessoa para a minha vida.

À Poliana pelo carinho, afeto e paciência em todos os momentos, durante todo o tempo da nossa caminhada juntos.

Aos meus amigos da república 1511 do Posinho, “Os Gatos Escaldados” pelo convívio agradável e por todos os momentos felizes.

Aos meus amigos, Sharlles, Álisson (Grilo), Geraldo, Silvano, Vanessa, Marcelo, Fábio, Vinícius, Roberta, Mayra, Crislene, pela ajuda, pelo companheirismo e pelos conselhos.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

LEANDRO SILVA DE OLIVEIRA, filho de Geraldo Clemente de Oliveira e Carmelita Silva de Oliveira, nasceu em 17 de maio de 1985, em São Paulo, SP.

Em 2000, concluiu o 2^o grau na Escola Estadual “Quinzinho Inácio”, em Senhora de Oliveira, MG.

Em 2009, diplomou-se Engenheiro Florestal pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em março de 2009, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de mestrado, em Ciência Florestal, na área de Concentração em Silvicultura, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, defendendo a dissertação em fevereiro de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6

MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES HÍBRIDOS DE *Eucalyptus globulus*: MULTIPLICAÇÃO E ALONGAMENTO *IN VITRO*

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1. Material experimental	14
2.2. Multiplicação <i>in vitro</i>	15
2.3. Alongamento <i>in vitro</i>	15
2.4. Preparo do meio de cultura e condições ambientais	15
2.5. Avaliações experimentais.....	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1. Multiplicação <i>in vitro</i>	17
3.2. Alongamento <i>in vitro</i>	21
4. CONCLUSÕES	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS E MICROESTACAS DE CLONES DE *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* E DE *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* .

RESUMO	35
ABSTRACT	36
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1. Material experimental	39

2.2. Formação dos jardins clonais	39
2.3. Obtenção e enraizamento de miniestacas e microestacas	41
2.4. Condução e avaliações experimentais.....	41
2.4.1. Efeito da aplicação de AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas	41
2.4.2. Velocidade de enraizamento de miniestacas e microestacas	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1. Efeito da aplicação de AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas .	44
3.2. Velocidade de enraizamento de miniestacas e microestacas	50
4. CONCLUSÕES.....	54
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
3. CONCLUSÕES GERAIS	58

RESUMO

OLIVEIRA, Leandro Silva de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Micropropagação, microestaquia e miniestaquia de clones híbridos de *Eucalyptus globulus***. Orientador: Aloisio Xavier. Coorientadores: Haroldo Nogueira de Paiva e Wagner Campos Otoni.

O presente estudo teve o objetivo de avaliar a micropropagação de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, bem como a microestaquia e miniestaquia desses materiais, analisando-se: (a) a multiplicação e o alongamento *in vitro* na micropropagação; (b) o efeito da aplicação do regulador de crescimento ácido indol-3-butírico (AIB) (0 e 2000 mg L⁻¹) e do tipo de estaca (apical e intermediária) sobre a sobrevivência, enraizamento e vigor das mudas. O microjardim clonal foi constituído de microcepas rejuvenescidas pela micropropagação por meio de subcultivos sucessivos, enquanto o minijardim clonal foi composto por minicepas obtidas pelo enraizamento de miniestacas. O enraizamento das miniestacas e microestacas foi realizado utilizando um período de permanência das estacas na casa de vegetação de 30 dias, com a aclimação em casa de sombra por 10 dias, seguida da transferência para a área de pleno sol, onde procedeu-se a avaliação final aos 60 dias. Os resultados revelaram comportamentos diferenciados dos clones quanto à multiplicação e ao alongamento *in vitro*. As taxas de multiplicação *in vitro* dos clones variaram ao longo dos 25 subcultivos, sem estabilização das mesmas no decorrer do tempo. Os meios de cultura (MS e JADS)

avaliados no alongamento *in vitro*, contribuíram favoravelmente para o alongamento das brotações, assim como AIB em concentrações superiores a 0,25 mg L⁻¹. Portanto, o protocolo desenvolvido mostrou-se eficiente para micropropagação via proliferação de gemas axilares dos clones avaliados. A sobrevivência e a porcentagem de estacas com raízes observadas no fundo do tubete, na saída da casa de vegetação e de sombra não apresentaram diferenças acentuadas nas avaliações realizadas. Em relação ao enraizamento constatou-se, de modo geral, superioridade das estacas apicais em relação às intermediárias. A aplicação do AIB nas miniestacas e microestacas não teve efeito destacado sobre as características avaliadas, dispensando a sua utilização. As avaliações indicaram velocidades diferenciadas entre os materiais genéticos quanto ao processo rizogênico. De forma geral, em razão dos resultados observados, conclui-se que a micropropagação não promoveu rejuvenescimento significativo dos clones de híbridos de *Eucalyptus globulus*, não sendo observada superioridade expressiva das microestacas em relação às miniestacas para as características avaliadas.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Leandro Silva de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Micropropagation, micro-cutting and mini-cutting of hybrid clones of *Eucalyptus globulus***. Adviser: Aloisio Xavier. Co-advisers: Haroldo Nogueira de Paiva and Wagner Campos Otoni.

This study aimed to evaluate the propagation of *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* and *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* clones, especially effects of micropropagation, micro-cutting technique and mini-cutting technique. The following features were analyzed: (a) *in vitro* multiplication and elongation; (b) the effect of IBA (indole-3-butyric acid) at 0 and 2000 mg L⁻¹; and position of the cuttings (apical and intermediate stem) on survival, rooting and plantlet vigor. The micro-clonal hedge consisted of micro-stumps rejuvenated via micropropagation through successive subcultures, whereas the mini-clonal hedge comprised mini-stumps obtained by rooting of mini-cuttings. The rooting of mini-cuttings and micro-cuttings was performed using an initial period of 30 days under greenhouse, acclimatization in the shade house for 10 days followed by transfer to sunshine condition, where the final evaluation was carried out at 60 days. The results for the micropropagation of clones revealed different behavior on the multiplication and elongation *in vitro*. The rates of clonal multiplication varied over the twenty-five subcultures without stabilization in the course of time. Both culture medium (MS and JADS) evaluated for *in vitro* elongation contributed positively to shoot elongation, as well as indole-3-butyric acid (IBA), applied in concentration above 0.25 mg L⁻¹.

Therefore, the protocol developed was efficient for micropropagation by axillary bud proliferation. Survival and the percentage of mini-cuttings and micro-cuttings with roots observed at the bottom of the container, in the exit of the greenhouse and shade house there was not show different responses for these characteristics. Regarding rooting, in general, there was superiority of apical stems cuttings in relation to the intermediate stems. The application of the IBA in the mini-cuttings and micro-cuttings had no effect on the evaluated parameters. The evaluations indicated speed rooting differentiated between the clones in the rhizogenic process. Based on results, micropropagation did not promote significant rejuvenation of the hybrid clones of *Eucalyptus globulus*. In conclusion, micro-cutting technique was superior to mini-cutting technique only for certain parameters evaluated for each clone.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As florestas plantadas possuem grande relevância comercial, despertando interesse quanto à produção de madeira, uma vez que representam importante fonte de biomassa capaz de atender a demanda e a necessidade global de recursos renováveis. Nesse contexto, o Brasil tem destaque no cenário mundial pela produtividade de suas florestas, principalmente do gênero de *Eucalyptus*, sendo os programas de melhoramento genético e de silvicultura clonal uns dos responsáveis pela obtenção de ganhos significativos em produção e de qualidade da madeira (BRACELPA, 2010; GOLLE et al., 2009).

As espécies de *Eucalyptus* são comumente utilizadas no setor florestal, principalmente em razão do rápido crescimento, adaptabilidade às mais variadas condições de solo e de clima, e ainda pela sua alta qualidade tanto para produtos de madeira sólida, quanto para geração de energia e produção de polpa celulósica. Especificamente para o setor de celulose, o interesse se deve aos baixos custos de produção e ao excelente papel produzido quanto à maciez, flexibilidade, opacidade e porosidade, o que o torna apropriado para papéis para impressão e escrita (TRUGILHO et al., 2005).

A globalização foi responsável, em parte, pela mudança nas estratégias de mercado das empresas, as quais, na tendência de adquirir competitividade, passaram a investir em produtividade, com baixos custos de produção e no desenvolvimento de produtos de elevada qualidade. Nesse sentido as empresas de celulose e papel do Brasil tem investido em pesquisas na busca por espécies de *Eucalyptus* que conciliem rápida taxa de crescimento e produção de madeira de alta qualidade ao fim

que se destina, de forma a garantir melhorias na eficiência e competitividade no mercado das empresas do setor (GRATTAPAGLIA, 2007). O desafio ao melhoramento florestal no desenvolvimento de materiais genéticos, que conciliem qualidade da madeira produzida com maior produtividade, tem sido obstáculo ao setor de celulose, uma vez que as espécies de *Eucalyptus* mais produtivas apresentam limitações quanto à qualidade de madeira, enquanto aquelas espécies de melhor qualidade da madeira são pouco adaptadas ao clima das principais regiões nas quais se encontram as principais plantações (ASSIS e MAFIA, 2007).

Dentre as espécies de *Eucalyptus*, o *Eucalyptus globulus* tem despertado interesse em razão de possuir excelente morfologia de fibras para a produção de polpa, comparativamente às outras espécies de *Eucalyptus*, além da redução na demanda de produtos químicos para o branqueamento da polpa, em razão do menor teor de lignina na madeira (DOUGHTY, 2000). No entanto, por se tratar de uma espécie tipicamente de clima temperado, tem apresentado certa restrição quanto à adaptação às regiões em que ocorrem altas temperaturas, nas quais o seu desenvolvimento não tem sido satisfatório sob o ponto de vista produtivo. Alternativamente, a hibridação de *Eucalyptus globulus* com espécies adaptadas às regiões mais quentes tem sido implementada visando o plantio desses materiais genéticos nas regiões de clima tropical.

A hibridação interespecífica tem proporcionado ganhos imediatos e de forma eficiente no melhoramento de espécies de *Eucalyptus*, com resultados diretos e significativos às empresas de base florestal (ASSIS e MAFIA, 2007). Os materiais genéticos híbridos reúnem em si as características tecnológicas da madeira, de tolerância a estresses bióticos e abióticos e de crescimento, desejáveis em indivíduos superiores selecionados.

Os programas de melhoramento florestal têm promovido a hibridação interespecífica do *Eucalyptus globulus* com as espécies de *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus viminalis*, *Eucalyptus gunnii* e *Eucalyptus nitens*, sendo estes clones híbridos obtidos, utilizados comercialmente na região do Mediterrâneo (PARDOS, 2007).

No Brasil, a hibridação interespecífica tem sido obtida principalmente com aquelas mais adaptadas climaticamente, como o *Eucalyptus grandis* e com o *Eucalyptus urophylla* (XAVIER et al., 2007). O cruzamento genético entre estas espécies e o *Eucalyptus globulus* tem gerado híbridos com razoável competência

rizogênica, com boa produtividade e qualidade da madeira, além de serem adaptados às condições climáticas das regiões mais quente do Brasil (ASSIS e MAFIA, 2007). Dessa forma, a indústria de celulose e papel tende a priorizar a utilização de clones híbridos de *Eucalyptus globulus* nessas regiões de clima quente, em razão dos resultados obtidos com esses materiais genéticos. No entanto, os avanços no melhoramento genético e propagação vegetativa de *Eucalyptus globulus* são ainda recentes, embora haja interesse por parte dessas indústrias pela expansão dos plantios (PINTO, 2007).

A silvicultura clonal tem papel relevante nos programas de melhoramento florestal, uma vez que possibilita a propagação dos materiais elite selecionados, com o completo uso do potencial genético destes. Além de permitir a retenção do potencial genético do material elite selecionado, incluindo os componentes não aditivos da variação genética em uma nova geração (ASSIS e MAFIA, 2007; XAVIER et al., 2009).

A estaquia consiste na principal técnica de propagação vegetativa para *Eucalyptus*, sendo a miniestaquia um processo consolidado dentro das empresas florestais brasileiras com fins à produção de mudas clonais dos materiais genéticos adaptados ao clima quente. No entanto, as principais espécies de clima temperado, *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens* (WILLYAMS et al., 1992; WILSON, 1992; BARBOUR e BUTCHER, 1995; TIBBITS et al., 1997) têm apresentado problemas quanto à clonagem, tendo efeito direto tanto na implantação de pomares de sementes (BORRALHO, 1997), na polinização controlada massiva (LEAL e COTTERILL, 1997), bem como na produção em larga escala de mudas clonais.

A propagação vegetativa pela técnica de miniestaquia de algumas espécies apresenta dificuldades devido o efeito de fatores endógenos e exógenos que afetam o potencial de enraizamento destas. Dentre essas espécies, o *Eucalyptus globulus* e seus híbridos têm apresentado restrições à propagação vegetativa pelo enraizamento de estacas, em razão da variabilidade na capacidade rizogênica dos clones, bem como também pela redução do potencial de enraizamento com o envelhecimento das plantas matrizes (WILSON, 1992; WATT et al., 2003). A consequência é o estreitamento da base genética nos programas de melhoramento genético e redução nos ganhos potenciais nas características diretas de importância econômica (MACRAE e COTTERILL, 1997). Dessa forma, a micropropagação tem sido justificada como alternativa para contornar essa dificuldade de propagação por meio

dos métodos convencionais, visto ser uma alternativa recomendável quando existem alto grau de maturação do material genético (GOMES e CANHOTO, 2003).

A micropropagação é indicada para o *Eucalyptus* quando as outras técnicas de propagação vegetativa não apresentam resultados satisfatórios quanto à produção de mudas clonais, limitando assim o rejuvenescimento adequado da árvore selecionada por meio do resgate de brotações basais ou ainda quando há a necessidade de incrementar a produção em curto espaço de tempo com fins comerciais (DUTRA et al., 2009).

O resultado prático da utilização da micropropagação para *Eucalyptus* é a possibilidade de rejuvenescimento de clones selecionados, possibilitando a propagação de espécies e híbridos de alto valor comercial e com restrições ao enraizamento adventício pelas técnicas convencionais de clonagem (DUTRA et al., 2009). Acrescenta-se que recentes pesquisas com biorreatores têm indicado o potencial da automação e o uso da propagação em larga escala com redução dos custos de produção de plantas *in vitro* (CASTRO e GONZÁLES, 2002; REIS et al., 2003; McALISTER et al., 2005).

No desenvolvimento de protocolos de cultivo *in vitro* para superar as deficiências encontradas quanto ao enraizamento no ambiente natural, a proliferação de gemas axilares, dentre as técnicas de micropropagação, tem sido a mais amplamente utilizada em *Eucalyptus* (MANKESSI et al., 2009). O rejuvenescimento e, ou, revigoramento de tecidos adultos pode ser obtido pelos sucessivos subcultivos *in vitro* através da proliferação de gemas axilares, promovendo homogeneização fisiológica dos tecidos, quer em potencial de enraizamento bem como na qualidade do sistema radicular (ASSIS e MAFIA, 2007).

O rejuvenescimento e, ou, revigoramento promovido pela micropropagação é citado para espécies florestais conforme diversos trabalhos na literatura (PIERIK, 1990; HACKETT e MURRAY, 1993; HUANG et al., 1996; VON ADERKAS e BONGA, 2000), tratando alguns de *Eucalyptus* (WARRAG et al., 1990; TRINDADE e PAIS, 1997; SHARMA e RAMAMURTHY, 2000; XAVIER et al., 2001; TITON et al., 2002).

Existe ainda, a necessidade de novos trabalhos para avaliar o rejuvenescimento de clones selecionados, promovido pela micropropagação com vistas a incrementar a sua capacidade de enraizamento adventício e favorecer o processo de clonagem (MANKESSI et al., 2009). Contudo, a expectativa é a ampla

utilização da técnica para a clonagem de materiais genéticos adultos, com restrições quanto ao enraizamento em condições de viveiro (NOURISSIER e MONTEUUIS, 2008).

O rejuvenescimento ou pelo menos o restabelecimento da competência ao enraizamento é obtida com o aumento do número de subcultivos *in vitro* de *Eucalyptus*, em função de reversão gradativa à juvenilidade dos tecidos, sendo que um número mínimo de 12 subcultivos é recomendado para que ocorra incremento no potencial rizogênico (ALFENAS et al., 2009; XAVIER. et al., 2009). No entanto, as particularidades inerentes a cada clone ou espécie, determinadas por fatores genéticos, são responsáveis por variações observadas no cultivo *in vitro*, sendo que a resposta ao rejuvenescimento e, ou, revigoração pode ser diferenciada em relação aos materiais genéticos.

Diversos trabalhos consideram a micropropagação como uma técnica com grande potencial no rejuvenescimento de espécies florestais (GRANT E HAMMATT, 1999; SCHUCH et al., 2008; VON ADERKAS e BONGA, 2000; XAVIER et al., 2009). Clones de *Eucalyptus grandis* apresentaram desempenho superior na microestaquia em relação à miniestaquia, comprovando que o rejuvenescimento foi eficiente em razão de maiores índices de enraizamento (TITON et al., 2002; SANTOS et al., 2005). De maneira semelhante, Xavier et al. (2001), ao comparar miniestaquia e microestaquia de clones híbridos de *Eucalyptus grandis*, concluíram que a microestaquia resultou em melhor desempenho na velocidade de enraizamento e qualidade do sistema radicular.

O *Eucalyptus globulus* apresenta reconhecida importância no melhoramento genético, devido às suas características tecnológicas da madeira para a fabricação de celulose. No entanto, a reconhecida recalcitrância ao enraizamento por parte dessa espécie e seus híbridos, tem justificado as pesquisas no sentido de tornar a sua propagação efetiva em nível comercial.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivos avaliar a resposta de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* em relação à multiplicação e ao alongamento *in vitro*, com vistas ao rejuvenescimento clonal, bem como avaliar o enraizamento de miniestacas e microestacas desses híbridos.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2009. 500p.

ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In. BORÉM, A. (ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: [sn], 2007, p.93-121.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL. **Relatório anual 2009/2010**. São Paulo, SP: BRACELPA, 2009. Relatório.

BARBOUR, E. L.; BUTCHER, T. Field testing vegetative propagation techniques of *Eucalyptus globulus*. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1995, Hobart. **Proceedings...** Hobart: CRCTHF IUFRO, 1995, p. 313-314.

BORRALHO, N. M. G. Seed orchards or cuttings: which is the best? In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, 1997. v. 4, p. 330–336.

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

DOUGHTY, R.W. **The *Eucalyptus*: a natural and commercial history of the gum tree**. Baltimore, Maryland: John Hopkins University Press, 2000. 237 p.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n.58, p.49-59, 2009.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; BEVILACQUA, C. B. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n.5, p. 1606-1613, 2009.

GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (shining gum). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Washington, v. 39, n. 3, p. 316–321, 2003.

GRANT, N. J.; HAMMATT, N. Increased root and shoot production during micropropagation of cherry and apple rootstocks: effects of subculture frequency. **Tree Physiology**, Victoria, v. 19, p. 899-903, 1999.

GRATTAPAGLIA, D. Aplicações operacionais de marcadores moleculares. In: BORÉM, A. (ed.) **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: [sn], 2007, p. 175-200.

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

HUANG, H. J.; CHEN, Y.; KUO, J.L.; TZENG, C.C.; HUANG, B.L.; CHEN, C.M.; HUANG, L.C. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens in vitro*: changes in isotesterases and isoperoxidases. **Plant and Cell Physiology**, Bethesda, v.37, n.1, p. 77-80, 1996.

LEAL, A. M. C.; COTTERILL, P. P. Mass control-pollination of *Eucalyptus globulus*. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, 1997. v. 4, p. 256–258.

MACRAE, S.; COTTERILL, P. P. Macropropagation and micropropagation of *Eucalyptus globulus*: means of capturing genetic gain. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, 1997. v.4, p. 102–110.

MANKESSI F.; SAYA, A.; BAPTISTE, C.; NOURISSIER-MOUNTOU, S.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of genetically related *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* clones in relation to the time spent in culture. **Trees**, Berlin, v. 23, n. 5, p. 931-940, 2009.

McALISTER, B.; FINNIE, J.; WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA[®]) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (S.A.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Berlin, v. 81, p 347–358, 2005.

NOURISSIER, S.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of two *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus grandis* mature clones. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Washington, v. 44, p. 263-272. 2008.

PARDOS, J. A. Perspectiva fisiológica en la producción y mejora del eucalipto (con énfasis en *Eucalyptus globulus* Labill). **Boletín del CIDEU**, v. 3, p.7-55, 2007.

PIERIK, R.L.M. Rejuvenation and micropropagation. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 7., 1990, Amsterdam. **Proceedings...** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990, p. 91–101.

PINTO, G.; SANTOS, C.; NEVES, L.; ARAÚJO, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 21, n. 3, p. 208-213, 2002.

PINTO, G. C. C. C. **Regeneração de plantas de *Eucalyptus globulus* por embriogênese somática**. 2007. 203p. . Tese (Doutorado em Biologia) – Universidade de Aveiro, Lisboa, Portugal, 2007.

REIS, E.; GUARIENTI, A.; PEDRAZZI, C.; DE SOUZA, M.; ROSA, C.; CARDOSO, G., FRIZZO, S.; FOELKEL, C. Estudo da composição química de madeiras de *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus globulus* spp. *maideni* em diferentes regiões do tronco. In: CONGRESSO ANUAL DA ABCTP, 36, 2003, São Paulo. **Anais...** Associação Brasileira Técnica de Celulose e Papel: ABTCP. São Paulo, 2003. p. 1-8.

SANTOS, A. P.; 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.

SCHUCH, M. W.; DAMIANI, C. R.; SILVA, L. C.; ERIG, A. C. Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar clímax. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 32, n.3, p. 814-820, 2008.

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

TIBBITS, W. N.; WHITE, T. L.; HODGE, G. R.; JOYCE, K. R. Genetic control of rooting of stem cuttings in *Eucalyptus nitens*. **Australian Journal of Botany**, Canberra, v. 45, p.203–210, 1997.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Dinâmica do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**. Viçosa, MG, v. 26, n.6, p. 665-673, 2002.

TRINDADE, H.; PAIS, M.S. In vitro studies on *Eucalyptus globulus* rooting ability. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Washington, v.33, p. 1–5, 1997.

TRUGILHO, P. F.; BIANCHI, M. L.; GOMIDE, J. L.; LIMA, J. T.; MENDES, L. M.; MORI, F. A.; GOMES, D. F. F. Clones de *Eucalyptus* versus a produção de polpa celulósica. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 2, p. 145-155, 2005.

VON ADERKAS, P.; BONGA, J.M. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. **Tree Physiology**, Victoria, v. 20, p. 921–928, 2000.

WARRAG, E.I.; LESNEY, M.S.; ROCKWOOD, D.L. Micropropagation of field tested superior *Eucalyptus grandis* hybrids. **New Forests**, Rotorua, v. 4, p.67–79, 1990.

WATT, M.P.; BERJAK, P.; ANELISWA, M.; BLAKWAY, F. *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.75, p. 233-140, 2003.

WILLYAMS, D.; WHITEMAN, P.; CAMERON, J.; CHANDLER, S. F. Inter- and intra-family variation in rooting capacity in micropropagated *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*. In: SYMPOSIUM ON MASS PRODUCTION TECHNOLOGY FOR GENETICALLY IMPROVED FAST GROWING FOREST TREE SPECIES, Bordeaux, 1992. **Proceedings...** Nangis: AFOCEL, 1992. vol. 2, p. 177–181.

WILSON, P. J.: The development of new clones of *Eucalyptus globulus* and *E. globulus* hybrids by stem cuttings propagation. In: SYMPOSIUM ON MASS PRODUCTION TECHNOLOGY FOR GENETICALLY IMPROVED FAST GROWING FOREST TREE SPECIES, Bordeaux, 1992. **Proceedings...** Nangis: AFOCEL, 1992. v. 1, p. 379–386.

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

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

MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES HÍBRIDOS DE *Eucalyptus globulus*: MULTIPLICAÇÃO E ALONGAMENTO *IN VITRO*

RESUMO: O presente estudo teve como objetivo avaliar a micropropagação de três clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* e de três clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*. Avaliou-se a taxa de multiplicação das brotações na fase de multiplicação *in vitro*, no meio MS suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,01 mg L⁻¹ de ácido α -naflateno acético (ANA). O efeito das concentrações de 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹ de ácido indol-3-butírico (AIB) e dos meios de cultura MS e JADS foram avaliadas no alongamento *in vitro*. Os clones apresentaram variações na taxa de multiplicação ao longo dos 25 subcultivos, com valores médios entre 2,4 a 3,6. Os meios MS e JADS foram eficientes para a obtenção de gemas alongadas *in vitro*, com baixa oxidação das brotações e reduzida hiper-hidricidade. O maior número e comprimento de gemas alongadas para os clones no meio MS foram obtidas entre as concentrações de 0,25 e 1,00 mg L⁻¹ de AIB, enquanto no meio JADS os melhores resultados foram obtidos nas concentrações superiores à 0,56 mg L⁻¹ de AIB.

Palavras-chave: Rejuvenescimento, regulador de crescimento, propagação *in vitro*.

**MICROPROPAGATION OF HYBRID CLONES OF *Eucalyptus globulus*:
MULTIPLICATION AND ELONGATION *IN VITRO***

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the micropropagation of three clones of *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* and three clones of *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*. The multiplication rates of shoot clusters were evaluated throughout micropropagation stage. It was carried out on MS basal media supplemented with 0.5 mg L⁻¹ 6-benzilaminopurine (BAP) and 0.01 mg L⁻¹ naphthalene acetic acid (NAA). The effect of indole-3-butyric acid (IBA) (0; 0.25; 0.50; 0.75 and 1.0 mg L⁻¹) and the MS and JADS media were evaluated on *in vitro* elongation. The clones showed variations in the rate of multiplication during the twenty-five subcultures, with values ranging from 2.4 to 3.6. The MS and JADS medium were effective in inducing shoot elongation, with low oxidation of shoots and low hyper-hydricity. The greater number and length of elongated shoots on MS medium were obtained at concentrations of 0.25 to 1.00 mg L⁻¹ IBA, while for JADS medium the best results were obtained at concentrations higher than 0.56 mg L⁻¹ IBA.

Key words: Rejuvenation, growth regulator, *in vitro* propagation.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a hibridação do *Eucalyptus globulus* com outras espécies desse gênero tem gerado excelentes resultados tanto nas características de qualidade da madeira quanto no crescimento. Entretanto, a clonagem em larga escala destes híbridos, pela técnica de miniestaquia, não tem alcançado resultados satisfatórios quanto ao enraizamento, por se tratar de uma espécie considerada recalcitrante ao enraizamento, apresentando índices inferiores aos desejados na produção de mudas clonais.

Na busca por alternativas para a melhoria do enraizamento no processo de produção de mudas clonais de *Eucalyptus*, a micropropagação via proliferação de gemas axilares, tem sido recomendada como técnica de rejuvenescimento de clones selecionados (GOMES e CANHOTO, 2003; XAVIER et al., 2009). Dessa forma, a micropropagação apresenta-se como uma ferramenta de grande utilidade no setor florestal, em razão de possibilitar a formação e manutenção de microjardins clonais, a partir de clones rejuvenescidos, permitindo a propagação de genótipos de interesse.

De maneira geral, uma resposta positiva à micropropagação, dentre diversos fatores, deve-se a um balanço adequado dos reguladores de crescimento, sendo os mais utilizados, as citocininas e as auxinas (XAVIER et al., 2009). As concentrações desses reguladores de crescimento variam de acordo com o estágio de micropropagação e em função da espécie e do tipo de explante (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Na micropropagação das espécies de *Eucalyptus*, diversos trabalhos de cultivo *in vitro* têm utilizado a citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) e as auxinas ácido α -naftalenoacético (ANA), ácido indolil-3-acético (AIA) e o ácido indol-3-butírico (AIB) nas formulações de meios de cultura para multiplicação e alongamento, (BENNETT et al., 1994; DEL PONTE et al., 2001).

Com relação ao meio de cultura, o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) tem sido um dos mais utilizados para *Eucalyptus* e seus híbridos (SHARMA e RAMAMURTHY, 2000; NUGENT et al., 2001; BILLARD et al., 2005; GLOCKE et al., 2006a). Esse meio apresenta-se concentrações elevadas de nitrogênio, potássio, zinco e cobre comparativamente a outros meios de cultura (LUMSDEN, 1990). No entanto, outros meios de cultura, como JADS (CORREIA, 1993), WHITE (WHITE,

1943), B5 (GAMBORG et al., 1968), QLP (QUOIRIN e LEPOIVRE, 1977) e WPM (LLOYD e McCOWN, 1981) também têm sido empregados. O meio de cultura JADS foi elaborado especificamente para o *Eucalyptus grandis*, sendo também utilizado na micropropagação de espécies do gênero (LIMA e GONÇALVES, 1998; SANTOS et al., 2004; ANDRADE et al., 2006; BRAVO et al. 2008).

Dentre as etapas da micropropagação, em virtude da metodologia adotada para a proliferação das gemas axilares, bem como das respostas dos explantes, uma fase de alongamento *in vitro* é necessária para a obtenção de brotações com tamanho adequado para a fase de enraizamento destas, o qual tem sido realizado *ex vitro* (XAVIER et al., 2009).

Para *Eucalyptus*, a micropropagação com fins de rejuvenescimento e, ou, revigoramento clonal, é dependente do número de subcultivos *in vitro*, meios de cultura e balanço hormonal necessários para alcançar respostas satisfatórias quanto à reatividade das gemas, sendo a restauração da competência rizogênica, em geral, obtida de forma significativa a partir do 12º subcultivo. Entretanto, vale salientar que esse rejuvenescimento é progressivo e parcial, bem como dependente da espécie e idade ontogenética do material vegetativo utilizado na micropropagação (XAVIER et al., 2009).

A micropropagação de *Eucalyptus globulus* tem sido feita através das técnicas de embriogênese somática (PINTO et al., 2002; NUGENT et al., 2001; PINTO, 2007; PINTO et al., 2008), organogênese (SERRANO et al., 1996; BANDYOPADHYAY et al., 1999; GLOKE et al., 2006a;) e proliferação de gemas axilares (CALDERÓN-BALTIERRA, 1994; BENNETT et al., 1994; TRINDADE e PAIS, 1997; DEL PONTE et al., 2001; BENNETT et al., 2003; CALDERÓN-BALTIERRA et al., 2004; SOTELO e MONZA, 2007).

Trindade e Pais (1997) estabeleceram a partir de gemas epicórmicas, a micropropagação de material adulto de *Eucalyptus globulus*. Esses autores obtiveram incremento nos percentuais de enraizamento ao longo da fase de multiplicação *in vitro*, em razão do rejuvenescimento das brotações. Sotelo e Monza (2007) definiram um protocolo de micropropagação de clones adultos de *Eucalyptus globulus* sub. *maidenii*, também por meio de gemas epicórmicas, observando que apenas 5 de 58 clones avaliados apresentaram boa resposta à multiplicação *in vitro*, indicando que esta variação é decorrente do genótipo e do grau de maturação dos explantes.

A micropropagação de *Eucalyptus globulus* também foi estabelecida por Bennett et al. (1994) utilizando brotações basais de árvores adultas, obtendo respostas diferenciadas dos clones estudados quanto ao enraizamento *in vitro* devido o efeito de diferentes citocininas no meio de cultura de multiplicação.

Dentro deste contexto, em vista da necessidade de adequação de um protocolo de micropropagação, para clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, com vistas ao rejuvenescimento e, ou, revigoramento clonal, o presente trabalho teve como objetivos: (i) avaliar a taxa de multiplicação das brotações nos sucessivos subcultivos e (ii) avaliar a resposta dos clones quanto ao alongamento *in vitro* em diferentes concentrações de AIB, bem como nos meios de cultura MS e JADS.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material experimental

Os materiais experimentais utilizados nesse trabalho foram provenientes da fase de multiplicação de três clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C01, C04 e C16) e três clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26, C29 e C30), oriundos da empresa Celulose Nipo-Brasileira S.A. (CENIBRA), localizada no município de Belo Oriente, Minas Gerais. Esses clones foram obtidos pela hibridação interespecífica, realizada em programa de melhoramento estabelecido pela empresa, com a utilização de pólen de *Eucalyptus globulus*, procedente do Instituto Raiz, de Portugal, e como genitores femininos, genótipos superiores de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis* da própria empresa.

A partir de minicepas estabelecidas em minijardim clonal, sob sistema semi-hidropônico de canaletão de areia, no Viveiro de Pesquisas Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, coletaram-se as brotações para o estabelecimento *in vitro* dos referidos clones, pela micropropagação via proliferação de gemas axilares. A partir dessas brotações coletadas, segmentos nodais foram confeccionados, desinfestados e inoculados, como explantes iniciais, em meio de cultura composto pelos sais básicos de MS, vitaminas de White (WHITE, 1943) adicionado de 0,5 mg L⁻¹ de BAP (Sigma Co.),

0,1 mg L⁻¹ de ANA (Sigma Co.), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma Co.), 800 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP-30 - Synth Ltda), 30 g L⁻¹ de sacarose (Synth Ltda) e 7 g L⁻¹ de ágar Merck® (*Agar-agar granulated, purified and free for microbiology* – Merck KGaA, Germany), constituindo assim a fase inicial da micropropagação.

2.2. Multiplicação *in vitro*

Uma vez estabelecidos, os explantes foram subcultivados em meio de cultura MS suplementados com vitaminas White (WHITE, 1943), 0,5 mg L⁻¹ de BAP, 0,01 mg L⁻¹ de ANA, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP-30, 30 g L⁻¹ de sacarose e 7 g L⁻¹ de ágar Merck®.

A fase de multiplicação *in vitro* teve por objetivo o rejuvenescimento e, ou, revigoramento clonal. Procedeu-se a transferência das brotações multiplicadas para um novo meio de cultura de igual composição, a cada 30 dias, isolando-se tufos de brotações padronizados com duas a três brotações maiores do que 2 mm e com bom vigor vegetativo.

2.3. Alongamento *in vitro*

As brotações contendo 3 a 4 gemas obtidas na fase de multiplicação *in vitro*, dos clones C01, C04, C16, C26, C29 e C30, foram cultivados em tubos de ensaio 15 cm x 2,5 cm, durante 30 dias, em 10 mL do meio de cultura MS suplementado com 0,3 mg L⁻¹ de BAP, 0,01 mg L⁻¹ de AIB, 800 mg L⁻¹ de PVP-30, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar Merck®.

A partir das brotações obtidas, essas foram inoculadas em dois meios de cultura (MS e JADS), utilizando frascos de 7 cm x 6 cm com 40 mL dos meios contendo 20 g L⁻¹ de sacarose, ambos suplementados com 0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg L⁻¹ de AIB e 0,05 mg L⁻¹ de BAP. Adicionou-se aos meios de cultura 800 mg L⁻¹ de PVP30, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 7 g L⁻¹ de ágar Merck®.

2.4. Preparo do meio de cultura e condições ambientais de incubação

Os meios de cultura, foram preparados utilizando água desionizada e o pH ajustado para 5,8 ± 0,05 com NaOH (0,1 M) e HCl (0,1 M), antes da autoclavagem e

da adição do ágar. A autoclavagem do meio de cultura foi realizada à temperatura de 121° C e pressão de aproximadamente 1 kgf cm⁻², durante 15 minutos.

Os reguladores de crescimento BAP e ANA foram adicionados ao meio de cultura antes da autoclavagem. As condições de cultivo *in vitro*, desde a fase de estabelecimento até o alongamento *in vitro*, foram em sala de cultura com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de 80 μmol m⁻²s⁻¹, fornecidas por lâmpadas fluorescentes branca-frias.

2.5. Avaliações experimentais

Na fase de multiplicação foi avaliada a taxa de multiplicação (número de tufos de brotações produzidos por explante) em cada subcultivo, por um período de 25 subcultivos. Além disso, no último subcultivo (25º) quantificou-se a produção média de brotações dos clones avaliados. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 4 repetições compostas cada uma de 4 tubos de ensaio.

Na fase de alongamento, decorridos 35 dias, foram avaliados o vigor, a hiper-hidricidade, a oxidação, o número e comprimento das brotações (gemas axilares maiores que 1,0 cm). A oxidação das brotações foi avaliada indiretamente por meio da avaliação do escurecimento do meio de cultura.

As avaliações de vigor, oxidação e hiper-hidricidade das brotações foram feitas de acordo com uma escala de notas: vigor das brotações (1 = Baixo: senescência e morte dos explantes; 2 = Médio: ausência de crescimento dos explantes; 3 = Bom: explantes alongados - comprimento ≤ 1 cm; 4 = Ótimo: brotações relativamente alongadas - comprimento entre 1 e 2 cm; 5 = Excelente: brotações alongadas - comprimento ≥ 2 cm), hiper-hidricidade das brotações (0 = Nula: sem hiper-hidricidade; 1 = Baixa: presença de calos nas folhas; 2 = Média: presença de muitos calos nas folhas; 3 = Alta: presença de calos nas folhas e nos entrenós dos explantes; 4 = Total: ocasionando a morte dos explantes), oxidação das brotações (0 = Nula: sem oxidação; 1 = Baixa: reduzida oxidação na base dos explantes; 2 = Média: alta oxidação na base dos explantes; 3 = Alta: oxidação completa das brotações (meio de cultura com tom acinzentado); 4 = Total: oxidação completa das brotações (meio de cultura com tom enegrecido).

O delineamento estatístico utilizado para o experimento de alongamento *in vitro* foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 6x5x2, testando-se 6 clones, 5 concentrações de AIB e 2 meios de cultura, com 6 repetições compostas de 6 explantes por unidade experimental. O experimento foi repetido uma vez, sendo as médias dos tratamentos utilizadas para a realização das análises estatísticas e ajustes das equações de regressão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Multiplicação *in vitro*

Os resultados demonstraram uma variação na taxa de multiplicação ao longo dos subcultivos para todos os clones (Figura 1), dificultando distinguir um ponto específico de tempo no qual ocorra estabilização das culturas no meio de multiplicação. Bennett et al. (1994) afirmam que essa estabilização das brotações no cultivo *in vitro* é importante para que o posterior enraizamento das gemas alongadas seja feito com sucesso. Segundo esses autores a duração desse período de estabilização é variável de acordo com a espécie e a idade do material de origem.

As variações das respostas observadas com o tempo de cultivo *in vitro* podem ser devido, em parte, às condições de cultivo. De acordo com Mankessi et al. (2009), a exposição excessiva, através de regimes de subcultivos de longo prazo, com inadequadas concentrações dos componentes do meio, pode resultar em elevação das concentrações ideais de determinadas substâncias dentro dos tecidos vegetais, refletindo no desempenho da cultura como na obtenção de baixas taxas de multiplicação. Essa situação é especialmente aplicável ao regulador de crescimento BAP, uma citocinina sintética mais estável e menos suscetível à degradação por citocinina oxidases, do que seus homólogos naturais (GEORGE, 2008).

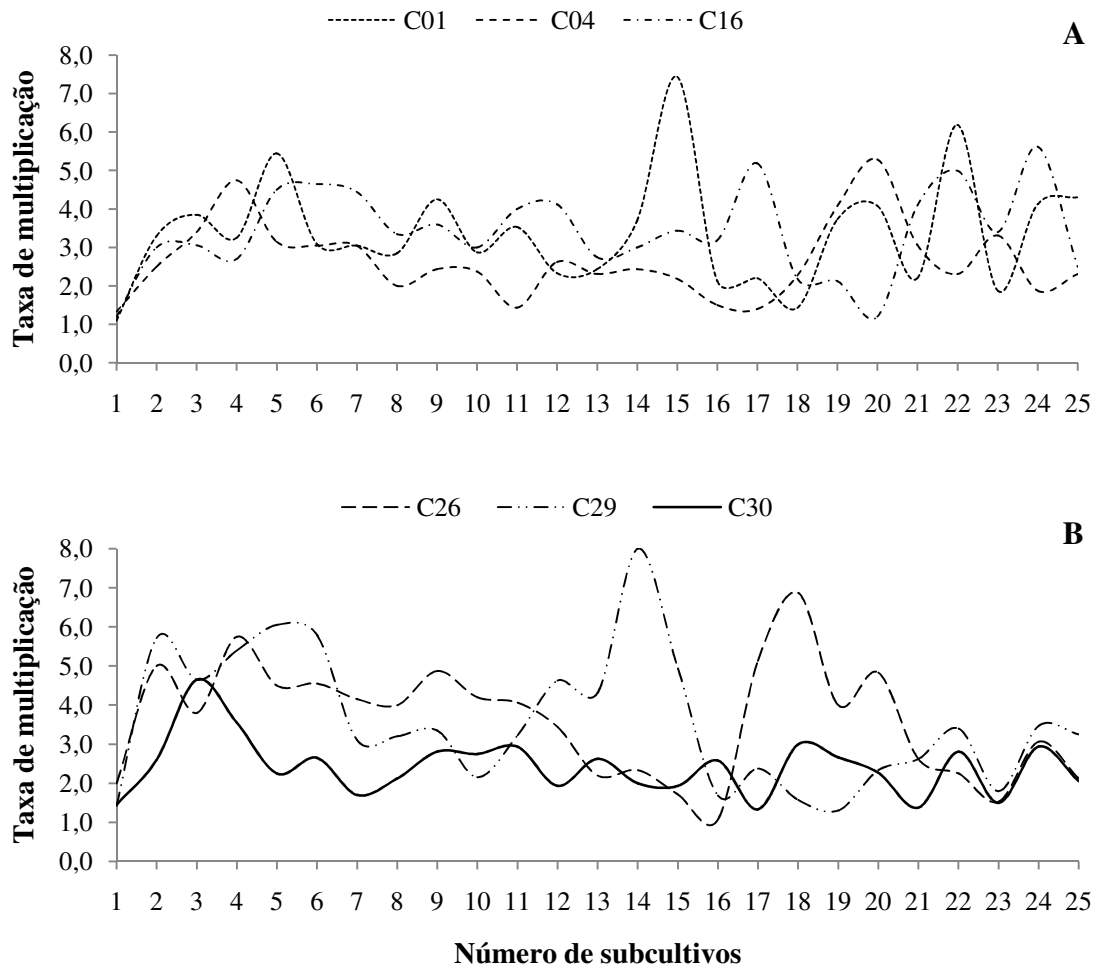


Figura 1- Número médio de tufos de brotações produzidas por explante em cada subcultivo (taxa de multiplicação) dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C01, C04 e C16) (A) e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26, C29 e C30) (B), em meio MS na fase de multiplicação *in vitro*, em 25 subcultivos.

O incremento no enraizamento de gemas alongadas na micropropagação, normalmente é obtido conforme prolongam-se os subcultivos, devido ao rejuvenescimento ocorrido nos explantes (TRINDADE e PAIS, 1997). O efeito rejuvenescedor dos repetidos subcultivos, em meio enriquecido com BAP, já foi relatado para diferentes espécies arbóreas micropropagadas (HACKETT, 1987; PIERIK 1990; VON ADERKAS e BONGA, 2000), dentre essas para *Eucalyptus* (WARRAG et al., 1990; TRINDADE e PAIS, 1997; SHARMA e RAMAMURTHY, 2000; MANKESSI et al., 2009). Contudo o período de tempo necessário para o rejuvenescimento de cada clone tem sido variável.

Os clones não apresentaram diferenças acentuadas quanto à produção média de tufos de brotações ao longo dos subcultivos considerados (Figura 2 e 3A). Esses

resultados foram superiores aos encontrados por Gomes e Canhoto (2003) na proliferação de gemas de *Eucalyptus nitens*, os quais obtiveram apenas 2,25 brotos por explantes. Entretanto, outros trabalhos obtiveram maiores médias no número de brotações, como Joshi et al. (2003) utilizando 1 mg L⁻¹ de BAP e 1 mg L⁻¹ de ANA obtiveram 20 a 25 brotações por explante em *Eucalyptus tereticornis* x *E. grandis*. Resultados similares utilizando-se meio MS suplementado com ANA e BAP (ambos a 1 mg L⁻¹) foram encontrados para *Eucalyptus tereticornis* x *E. camaldulensis* (BISHT et al., 1999) e *Eucalyptus tereticornis* (SHARMA e RAMAMURTHY, 2000).

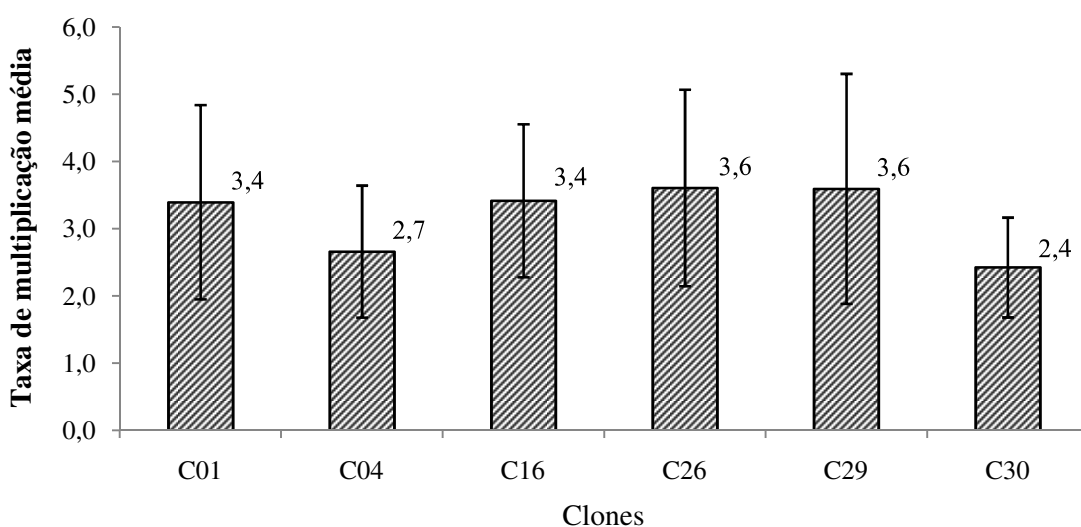


Figura 2- Número médio de tufo de brotações produzidas por explante em 25 subcultivos (taxa de multiplicação média) pelos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C01, C04 e C16) e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26, C29 e C30), em meio MS na fase de multiplicação *in vitro*. Barras verticais indicam os desvios padrão das médias.

De acordo com Sotelo e Monza (2007), o AIB promove uma maior taxa de multiplicação das brotações de *Eucalyptus globulus*, enquanto o ANA e AIA retardam o crescimento, podendo em certos casos ocasionar a morte das brotações. Esses autores obtiveram maior número de brotações após 5 subcultivos na fase de multiplicação *in vitro*, em meio de cultura suplementado com 0,2 mg L⁻¹ de BAP e 0,02 mg L⁻¹ de AIB.

Gómez et al. (2007) afirmam que os subcultivos sucessivos de explantes de *Eucalyptus globulus* em meio de cultura suplementado com citocininas e auxinas induz um decréscimo na produção de brotações. Assim, o resultado do experimento para a multiplicação *in vitro* pode estar relacionado ao balanço de citocininas e

auxinas no meio de cultura, visto esse balanço ser bastante variável em função da espécie e do tipo de explante utilizado.

Dessa forma, diversas variáveis podem ter influenciado no desenvolvimento dos clones na fase de multiplicação, entre as quais, a frequência dos subcultivos, o tamanho dos explantes subcultivados, os cuidados no procedimento de repicagem e a resposta do genótipo à micropropagação, explicando em parte os resultados obtidos para os clones nessa experimentação realizada.

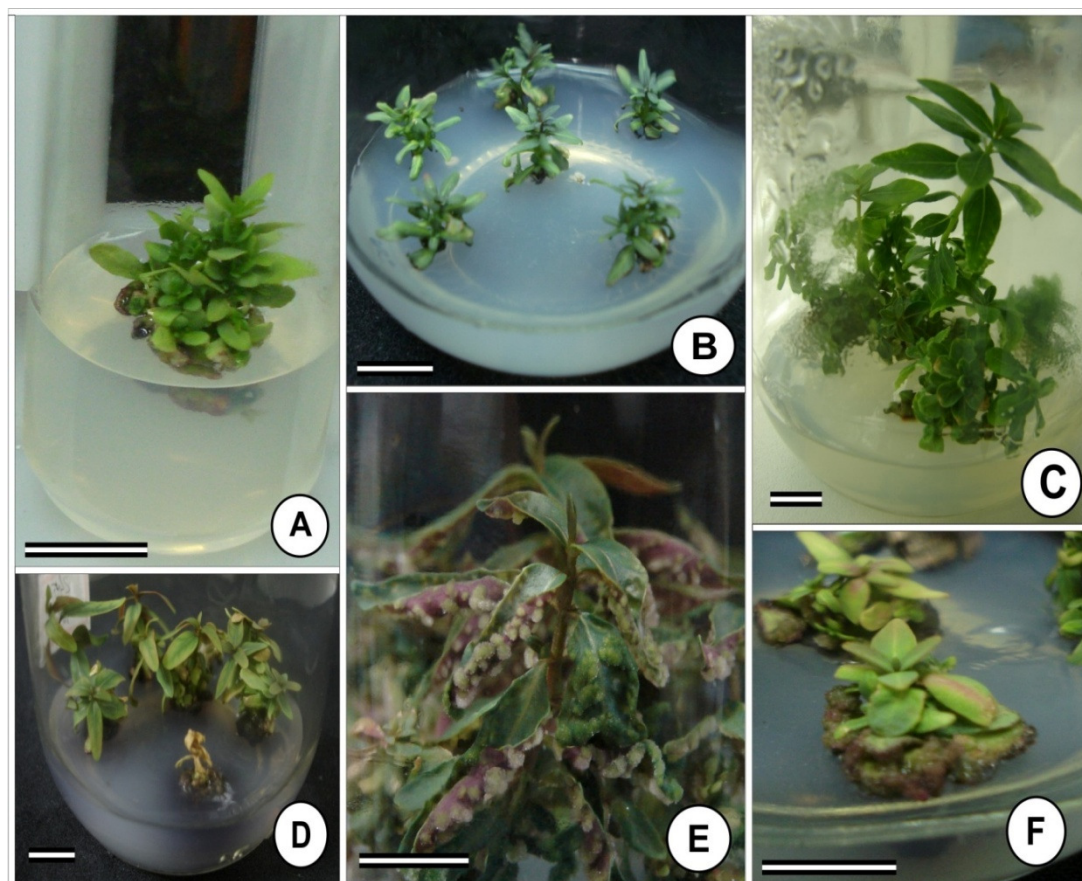


Figura 3 - Detalhe das brotações micropropagadas de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. (A) tufo de brotação clone C30 na fase de multiplicação *in vitro*. Barra = 10 mm; (B) brotações do clone C01 no tratamento com 0 mg L⁻¹ de AIB. Barra = 10 mm; (C) brotação alongada do clone C16 no tratamento com 0,5 mg L⁻¹ de AIB, em meio MS. Barra = 10 mm; (D) enegrecimento do meio de cultura com explantes do clone C16 no alongamento *in vitro* em meio JADS. Barra = 10 mm; (E) presença de calos foliares no clone C26 no alongamento *in vitro*. Barra = 10 mm; e (F) calejamento da base da brotação do clone C04 no tratamento com 1 mg L⁻¹ de AIB. Barra = 10 mm.

3.2. Alongamento *in vitro*

Houve interação significativa pelo teste F ($p < 0,05$), entre os fatores testados, para as características do vigor, hiper-hidricidade, número e comprimento das brotações alongadas por explante e oxidação do meio de cultura (Tabela 1), indicando a diversidade de resposta dos clones em relação ao meio de cultivo e aos tratamentos com AIB, o que reforça o efeito do material genético quanto à propagação vegetativa.

Tabela 1 – Análise de variância das características de vigor, oxidação do meio de cultura, hiper-hidricidade, comprimento das brotações (CB) e número de brotações alongadas por explante (NB) na fase de alongamento *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C01, C04 e C16) e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26, C29 e C30).

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios				
		Vigor ¹	Oxidação ¹	Hiper – hidricidade ²	CB (cm)	NB
Clone (C)	5	0,434*	0,888*	1,617*	6,361*	43,604*
Meios de Cultura (M)	1	0,718*	1,047*	0,487*	3,483*	85,839*
Tratamentos (T)	4	0,716*	3,160*	0,420*	17,278*	59,404*
C x M	5	0,140*	0,367*	0,593*	3,086*	15,941*
C x T	20	0,069*	0,109*	0,098*	1,291*	7,753*
M x T	4	0,218*	0,214*	0,068*	4,004*	19,873*
C x M x T	20	0,041*	0,060*	0,079*	1,409*	2,702*
Resíduo	300	0,017	0,019	0,024	0,442	1,547
Média Geral	-	1,780	1,680	1,430	1,130	1,810
CV _{exp} (%)	-	7,32	8,20	10,72	58,83	68,72

*: significativo a 5% de probabilidade pelo teste F; ⁽¹⁾ dados transformados por $\sqrt{x+0,5}$; ⁽²⁾ dados transformados por $\ln(x + 0,5)$; GL = graus de liberdade; CV_{exp} = coeficiente de variação experimental.

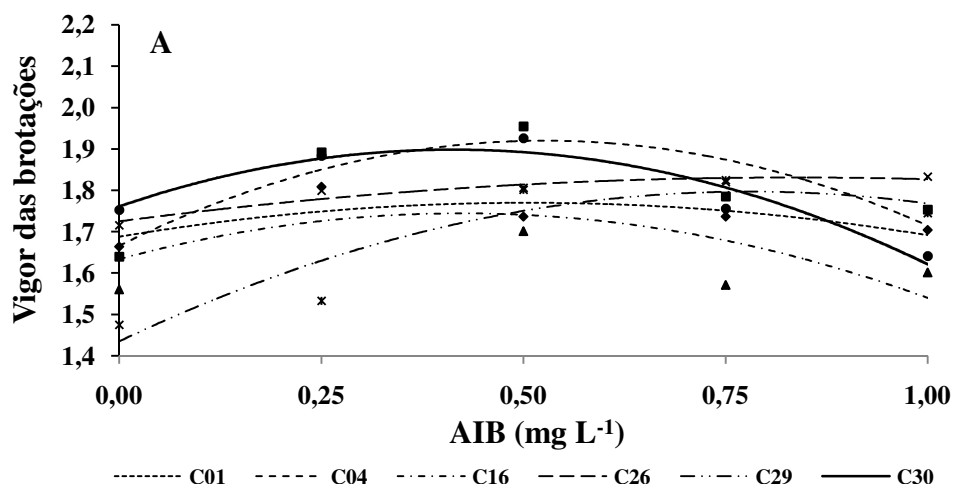
Os clones apresentaram comportamento polinomial de segundo grau para o vigor vegetativo das brotações no meio MS e JADS (Figura 4). No entanto, no meio MS os pontos críticos para o vigor das brotações variaram de 0,36 a 0,80 mg L⁻¹, enquanto no meio JADS, os pontos críticos foram superiores a 0,60 mg L⁻¹.

Os valores estimados de vigor das brotações no meio JADS foram superiores a 1,9, exceção para o clone C16 cujo valor foi de 1,7. Por outro lado, no meio MS os valores estimados ficaram entre 1,8 e 1,9.

Nos dois meios de cultura não foi possível determinar uma única concentração ótima de AIB para obter brotações com o máximo de vigor vegetativo

para todos os clones. No entanto, é importante salientar que para todos os clones, notou-se que na ausência de AIB, as brotações apresentaram crescimento reduzido, constatando-se muitas vezes a morte de explantes (Figura 3B).

$$\begin{array}{ll}
 \text{YC01} = 1,6837 + 0,3583 \text{ AIB} - 0,3543 \text{ AIB}^2 & R^2 = 0,74 \\
 \text{YC16} = 1,589 + 1,316 \text{ AIB} - 1,8400 \text{ AIB}^2 & R^2 = 0,87 \\
 \text{YC29} = 1,4311 + 0,9229 \text{ AIB} - 0,5829 \text{ AIB}^2 & R^2 = 0,93 \\
 \text{YC04} = 1,6671 + 0,9469 \text{ AIB} - 0,9029 \text{ AIB}^2 & R^2 = 0,88 \\
 \text{YC26} = 1,7280 + 0,2560 \text{ AIB} - 0,16 \text{ AIB}^2 & R^2 = 0,96 \\
 \text{YC30} = 1,7571 + 0,6869 \text{ AIB} - 0,8229 \text{ AIB}^2 & R^2 = 0,96
 \end{array}$$



$$\begin{array}{ll}
 \text{YC01} = 1,4994 + 0,5966 \text{ AIB} - 0,0689 \text{ AIB}^2 & R^2 = 0,95 \\
 \text{YC16} = 1,5817 + 0,1783 \text{ AIB} - 0,1143 \text{ AIB}^2 & R^2 = 0,80 \\
 \text{YC29} = 1,5869 + 1,0651 \text{ AIB} - 0,6171 \text{ AIB}^2 & R^2 = 0,96 \\
 \text{YC04} = 1,7011 + 1,1829 \text{ AIB} - 0,9829 \text{ AIB}^2 & R^2 = 0,84 \\
 \text{YC26} = 1,5777 + 1,0543 \text{ AIB} - 0,8343 \text{ AIB}^2 & R^2 = 0,99 \\
 \text{YC30} = 1,6997 + 0,9343 \text{ AIB} - 0,5143 \text{ AIB}^2 & R^2 = 0,97
 \end{array}$$

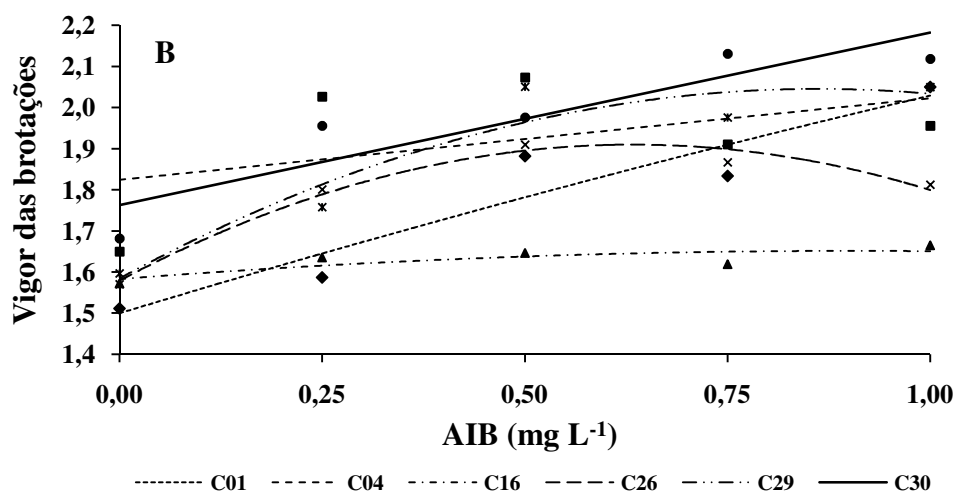
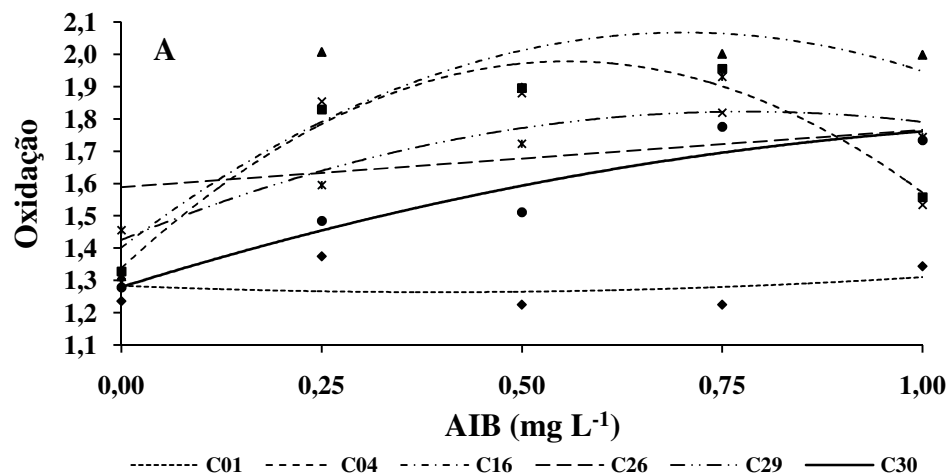


Figura 4- Vigor das brotações de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C01, C04 e C16) e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26, C29 e C30), em meio MS (A) e JADS (B), aos 35 dias após a inoculação, em função dos tratamentos com AIB.

Em relação à oxidação das brotações observou-se também um comportamento polinomial de segundo grau, em ambos meios de cultura (Figura 5). Em termos gerais, os pontos críticos das concentrações de AIB foram maiores no meio JADS, com valores estimados acima de 0,68 mg L⁻¹. A exceção foi o clone

C30, para o qual estimou-se um ponto crítico de 1,31 mg L⁻¹ no meio MS e 0,69 mg L⁻¹ para o JADS.

YC01 = 1,2615 + 0,3060AIB - 0,52 AIB ²	R ² = 0,64	YC04 = 1,3394 + 2,3046 AIB - 2,0686 AIB ²	R ² = 0,98
YC16 = 1,4 + 1,908 AIB - 1,36AIB ²	R ² = 0,89	YC26 = 1,3371 + 2,1949 AIB - 2,0229 AIB ²	R ² = 0,97
YC29 = 1,4306 + 1,0074 AIB - 0,6514 AIB ²	R ² = 0,92	YC30 = 1,2789 + 0,7771 AIB - 0,2971 AIB ²	R ² = 0,95



YC01 = 1,2746 + 0,9514 AIB - 0,3314 AIB ²	R ² = 0,98	YC04 = 1,2751 + 1,7829 AIB - 1,3029 AIB ²	R ² = 0,96
YC16 = 1,3474 + 1,6566 AIB - 1,1086 AIB ²	R ² = 0,91	YC26 = 1,4846 + 1,1354 AIB - 0,6514 AIB ²	R ² = 0,93
YC29 = 1,3149 + 1,7011 AIB - 1,0171 AIB ²	R ² = 0,99	YC30 = 1,4897 + 1,4903 AIB - 1,0743 AIB ²	R ² = 0,70

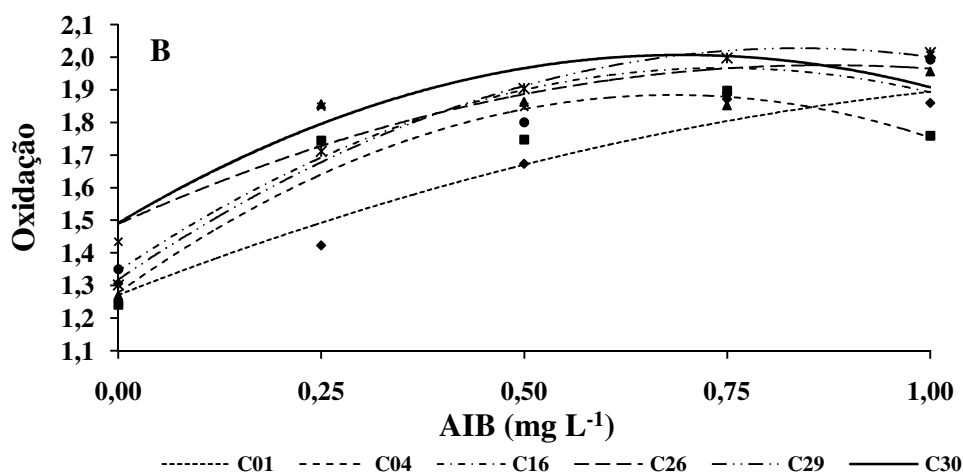


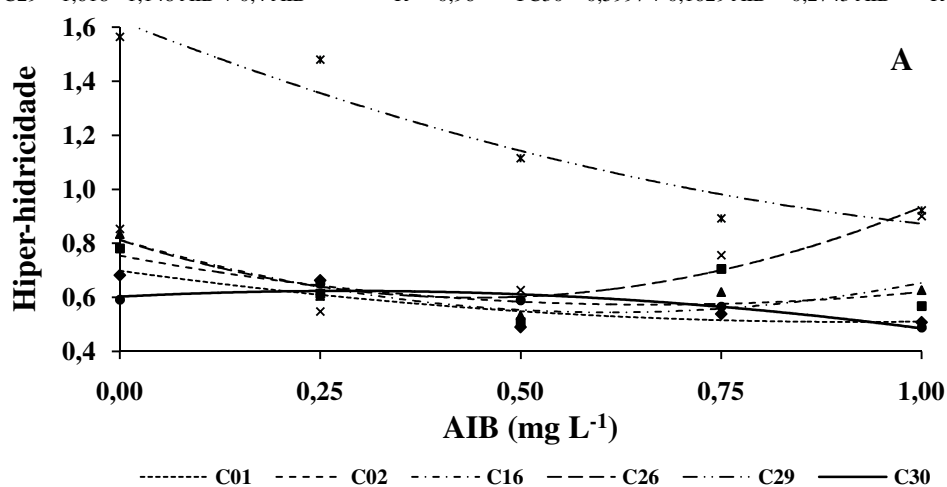
Figura 5- Oxidação das brotações de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C01, C04 e C16) e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26, C29 e C30), em meio MS (A) e JADS (B), aos 35 dias após a inoculação, em função dos tratamentos com AIB.

Nas maiores concentrações de regulador de crescimento houve maior oxidação das brotações, conforme observado, de maneira mais clara, para os clones cultivados em meio JADS. Entretanto, nesse estudo a oxidação das brotações parece não ter sido decorrente da composição mineral desse, uma vez que o meio JADS apresenta menores concentrações de nutrientes em relação ao MS e a oxidação é menor em meios de cultura com baixas concentrações de sais inorgânicos (Pasqual et

al., 1997). Portanto, o resultado observado pode estar mais relacionado ao regulador de crescimento. O acúmulo de fenóis em torno das brotações pode ter modificado a sua absorção de nutrientes (SILVA et al., 2010), principalmente do meio JADS, que por ser mais diluído que o MS, ocasionou maior deficiência nutricional das brotações, induzindo maior grau de estresse, maior produção de fenóis e consequentemente maior oxidação das brotações.

No que diz respeito à ocorrência de hiper-hidricidade nos clones, verificou-se comportamento quadrático aos 35 dias, para ambos meios de cultura (Figura 6).

$YC01 = 0,687 - 0,1573 AIB - 0,0267 AIB^2$	$R^2 = 0,99$	$YC04 = 0,7514 - 0,5394 AIB + 0,4114 AIB^2$	$R^2 = 0,64$
$YC16 = 0,8094 - 0,8834 AIB + 0,7314 AIB^2$	$R^2 = 0,93$	$YC26 = 0,8089 - 0,9389 AIB + 1,0629 AIB^2$	$R^2 = 0,91$
$YC29 = 1,618 - 1,148 AIB + 0,4 AIB^2$	$R^2 = 0,96$	$YC30 = 0,5997 + 0,1629 AIB - 0,2743 AIB^2$	$R^2 = 0,95$



$YC01 = 0,6671 + 0,7709 AIB - 0,7429 AIB^2$	$R^2 = 0,90$	$YC04 = 0,4734 + 0,5246 AIB - 0,5486 AIB^2$	$R^2 = 0,64$
$YC16 = 0,5263 + 0,1577 AIB - 0,2057 AIB^2$	$R^2 = 0,66$	$YC26 = 0,9963 - 0,8383 AIB + 0,5143 AIB^2$	$R^2 = 0,92$
$YC29 = 0,9583 - 0,4783 AIB + 0,1943 AIB^2$	$R^2 = 0,98$	$YC30 = 0,7126 - 0,6126 AIB + 0,3886 AIB^2$	$R^2 = 0,96$

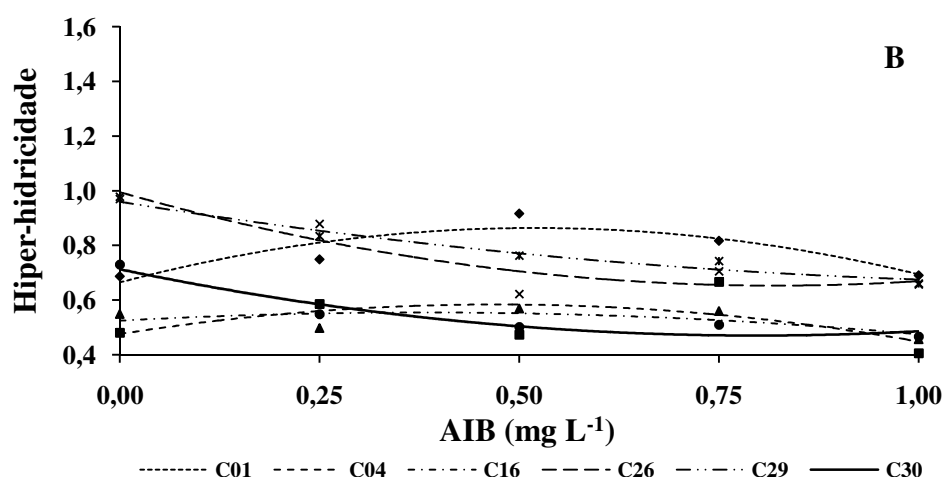


Figura 6- Hiper-hidricidade das brotações de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C01, C04 e C16) e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26, C29 e C30), em meio MS (A) e JADS (B), aos 35 dias após a inoculação, em função dos tratamentos com AIB.

De maneira geral, a hiper-hidricidade das brotações foi baixa para os clones em ambos meios de cultura. Apenas o clone C29 apresentou maiores valores médio de hiper-hidricidade no meio de cultura MS (Figura 6A). Esse clone apresentou brotações hiper-hídricas com a formação de grande número de calos na face abaxial das folhas, os quais acarretam em sérias limitações à sobrevivência *ex vitro* em viveiro das brotações alongadas (Figura 3E). O resultado reflete e reforça a especificidade de comportamento dos materiais genéticos quanto à micropropagação nos diferentes meios de cultura, e a necessidade de adequação das condições de cultivo *in vitro* para contornar esse problema.

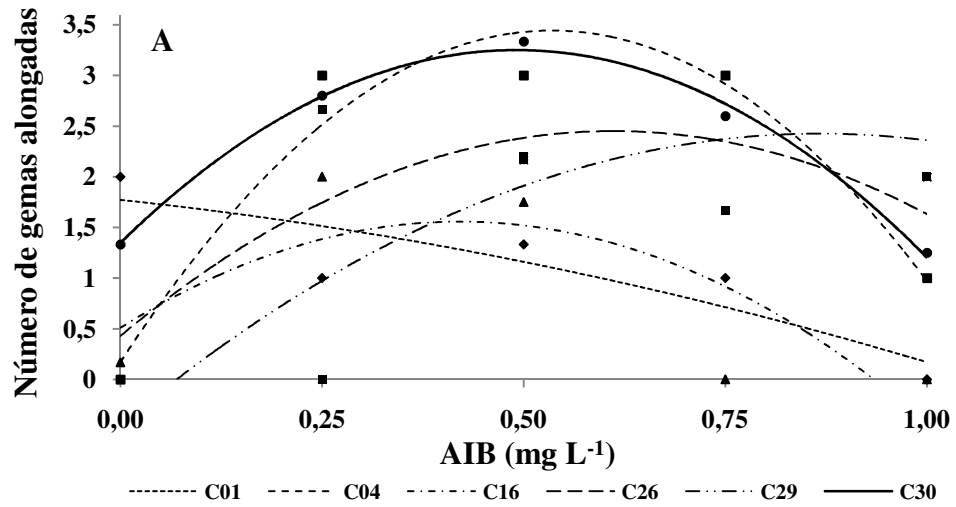
A hiper-hidricidade em brotações micropropagadas pode ser ocasionada por uma série de fatores que são responsáveis por ocasionar estresses em nível celular (GASPAR et al., 2002; XAVIER et al., 2009). Estes fatores podem ser de ordem ambiental, assim como de características fisiológicas, em resposta às mudanças no metabolismo e desenvolvimento da cultura. Isso poderia explicar a ocorrência dos diferentes resultados em relação à hiper-hidricidade das brotações no presente estudo.

Em relação ao alongamento *in vitro* verificou-se um comportamento polinomial de segundo grau para todos os clones aos 35 dias (Figuras 7 e 8). Porém, não houve tendência idêntica de resposta quanto ao número e comprimento das brotações alongadas para todos os clones em resposta às concentrações de AIB testadas.

Os clones C04, C16, C26 e C30, no meio de cultura MS, apresentaram pontos críticos para o número médio de brotações alongadas entre 0,47 a 0,61 mg L⁻¹ de AIB, correspondendo a uma estimativa de 3,4, 1,6, 2,5 e 3,3 brotos alongados por explante respectivamente (Figuras 7A e 3C). Por outro lado, os clones C01 e C29 apresentaram comportamento diferente aos demais clones, sendo estimado maior número de brotações alongadas para o clone C01 em baixas concentrações de AIB, enquanto o inverso foi constatado para o clone C29.

Resultado semelhante foi observado por Brondani et al. (2009), que obteve brotações alongadas de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii* em meio de cultura ½MS. No entanto, o meio de cultura foi suplementado com ANA, sendo estimada a concentração de 0,49 mg L⁻¹ para obtenção do maior número de brotações alongadas com comprimento médio de 2,4 cm, aos 60 dias após a inoculação.

$$\begin{array}{ll}
 \text{YC01} = 1,7611 - 0,9491 \cdot \text{AIB} + 0,5829 \cdot \text{AIB}^2 & R^2 = 0,94 \\
 \text{YC16} = 0,2146 + 7,2114 \cdot \text{AIB} - 7,6114 \cdot \text{AIB}^2 & R^2 = 0,94 \\
 \text{YC29} = -0,4431 + 6,6171 \cdot \text{AIB} - 3,8171 \cdot \text{AIB}^2 & R^2 = 0,88 \\
 \text{YC04} = 0,1714 + 12,2286 \cdot \text{AIB} - 11,429 \cdot \text{AIB}^2 & R^2 = 0,97 \\
 \text{YC26} = 0,4106 + 6,7954 \cdot \text{AIB} - 5,5314 \cdot \text{AIB}^2 & R^2 = 0,80 \\
 \text{YC30} = 1,1974 + 8,4846 \cdot \text{AIB} - 8,5486 \cdot \text{AIB}^2 & R^2 = 0,99
 \end{array}$$



$$\begin{array}{ll}
 \text{YC01} = 1,8494 + 0,4686 \cdot \text{AIB} - 0,9372 \cdot \text{AIB}^2 & R^2 = 0,89 \\
 \text{YC16} = 0,07 + 6,74 \cdot \text{AIB} - 6,88 \cdot \text{AIB}^2 & R^2 = 0,97 \\
 \text{YC29} = -0,1989 + 3,4429 \cdot \text{AIB} - 1,2229 \cdot \text{AIB}^2 & R^2 = 0,90 \\
 \text{YC04} = 0,2503 + 3,9537 \cdot \text{AIB} - 2,6857 \cdot \text{AIB}^2 & R^2 = 0,85 \\
 \text{YC26} = 0,2297 + 6,3223 \cdot \text{AIB} - 5,3943 \cdot \text{AIB}^2 & R^2 = 0,90 \\
 \text{YC30} = 1,194 + 3,528 \cdot \text{AIB} - 3,68 \cdot \text{AIB}^2 & R^2 = 0,90
 \end{array}$$

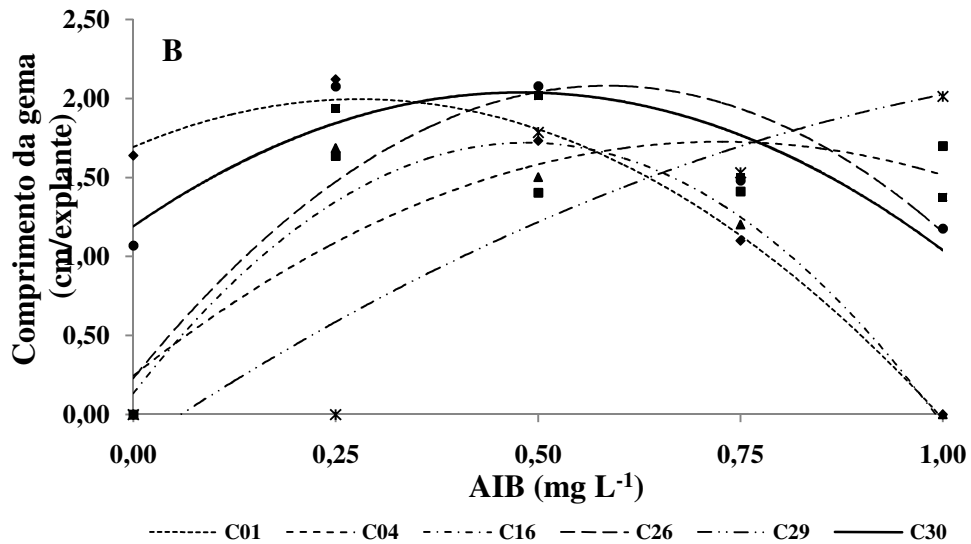
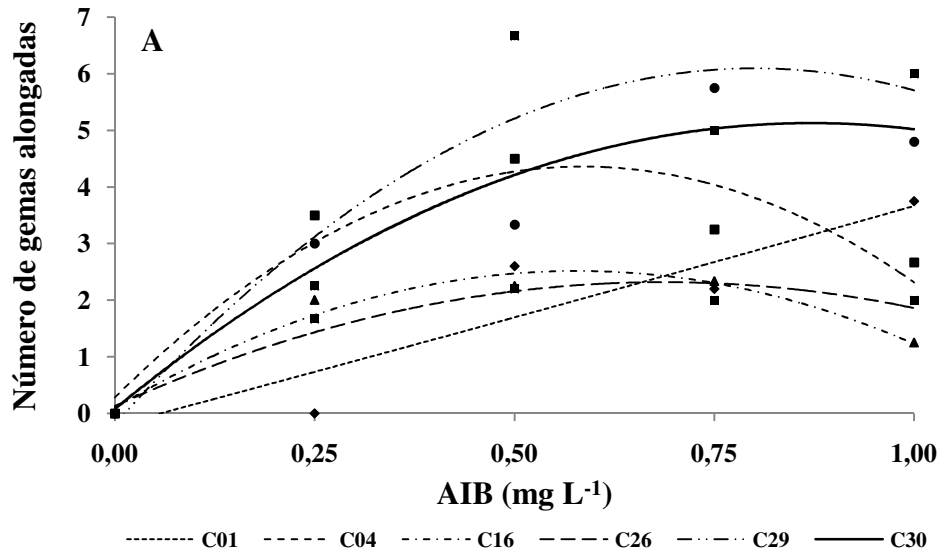


Figura 7- Número médio (A) e comprimento médio (B) das brotações alongadas por explante dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C01, C04 e C16) e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26, C29 e C30), em meio MS, aos 35 dias após a inoculação, em função dos tratamentos com AIB.

YC01 = - 0,2106 + 3,7606*AIB - 0,1714*AIB ² R ² = 0,92	YC04 = 0,2903 + 13,8097*AIB - 11,806*AIB ² R ² = 0,94
YC16 = 0,0929 + 8,8097*AIB - 7,8057*AIB ² R ² = 0,99	YC26 = 0,1703 + 6,4337*AIB - 4,7657*AIB ² R ² = 0,96
YC29 = - 0,4803 + 20,1143*AIB - 13,714*AIB ² R ² = 0,93	YC30 = 0,0671 + 11,6589*AIB - 6,6629*AIB ² R ² = 0,96



YC01 = - 0,1891 + 3,0531*AIB - 1,1771*AIB ² R ² = 0,92	YC04 = 0,1274 + 8,6246*AIB - 7,1886*AIB ² R ² = 0,96
YC16 = 0,0877 + 5,6063*AIB - 3,8743*AIB ² R ² = 0,98	YC26 = 0,0514 + 4,1589*AIB - 3,0629*AIB ² R ² = 0,98
YC29 = 0,0629 + 4,7691*AIB - 3,1771*AIB ² R ² = 0,99	YC30 = 0,2549 + 4,3971*AIB - 1,6571*AIB ² R ² = 0,95

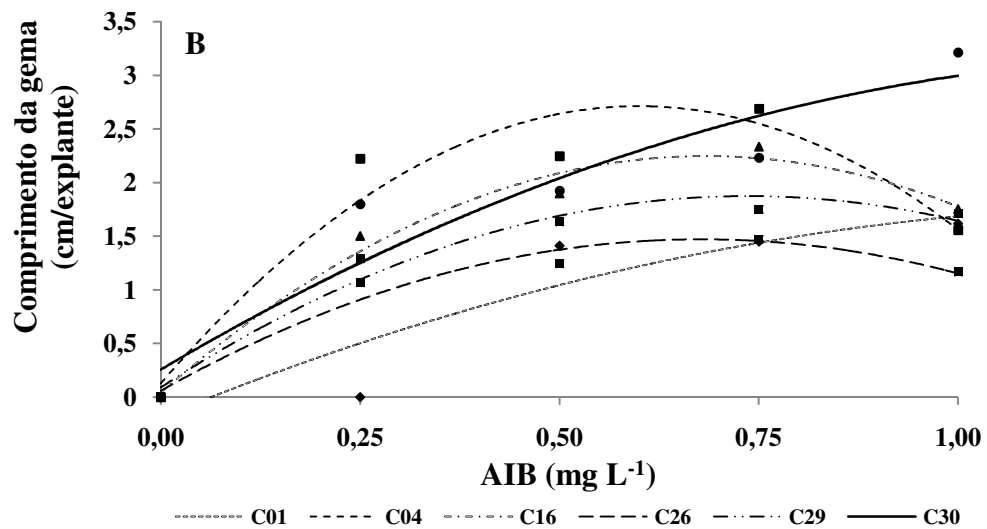


Figura 8- Número médio (A) e comprimento médio (B) de brotações alongadas por explante dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C01, C04 e C16) e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26, C29 e C30), em meio JADS, aos 35 dias após a inoculação, em função dos tratamentos com AIB.

Em relação ao comprimento das brotações alongadas em meio MS, os clones C01 e C29 apresentaram resultados bastante divergentes aos observados para os demais clones. Enquanto para o clone C01 foi estimado o ponto crítico de 0,25 mg L⁻¹ de AIB, para o clone C29 esse valor foi de 1 mg L⁻¹ (Figura 7B). Em relação aos demais clones, os pontos críticos entre 0,48 e 0,74 mg L⁻¹ de AIB foram responsáveis

em promover o maior alongamento das gemas. As estimativas de comprimento das gemas alongadas para os clones C04 e C16 foram de 1,7 cm e de 2 cm para os clones C26, C29 e C30. Em meio MS as concentrações de AIB, em torno de 1 mg L⁻¹, promoveram a indução de calos na base dos explantes, que conseqüentemente ocasionaram oxidação do meio de cultura, comprometendo o efetivo alongamento desses explantes (Figura 3F).

Os clones apresentaram comportamento diferenciado quanto ao número e comprimento das brotações alongadas no meio de cultura JADS. Esse resultado variou tanto em relação aos clones como em função dos tratamentos com AIB (Figura 8). De modo geral, os pontos críticos das concentrações de AIB para número e comprimento das brotações alongadas por explante foram maiores no meio JADS, comparativamente ao MS. As exceções observadas foram para o clone C29, para os dois parâmetros avaliados, e o clone C04 para o comprimento das brotações (Figura 8 B).

Os clones C29 e C30 apresentaram estimativa de 6,9 e 5,2 brotações alongadas por explante, para o meio de cultura JADS, sendo esses valores bem superiores aos obtidos em meio MS. Esta diferença observada, possivelmente deve-se à composição do meio de cultura JADS ser mais adequada ao alongamento desses clones.

O alongamento *in vitro* tem sido obtido com sucesso para *Eucalyptus* utilizando diversas combinações e proporções de reguladores de crescimento, bem como diferentes formulações de meios de cultura. Além disso, outras metodologias como o uso de carvão ativado no meio de multiplicação, ou a permanência das culturas no escuro por alguns dias, pode contribuir para alongar brotações de *Eucalyptus* (CALDERÓN-BALTIERRA,1994; SHARMA e RAMAMURTHY, 2000; GLOCKE et al., 2006b).

A presença de AIB no meio de cultura, suplementado com BAP, favoreceu o alongamento das brotações dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. De maneira semelhante, Santos et al. (2004) obtiveram melhores resultados para alongamento *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* utilizando 0,1 mg L⁻¹ de AIB e 0,1 mg L⁻¹ de BAP, após 30 dias de cultivo em meio de cultura JADS. Já Sotelo e Monza (2007) para *Eucalyptus globulus* sub. *maidenii* o tratamento com 0,1 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de AIB foi o que melhor promoveu o alongamento das brotações.

A resposta positiva do meio JADS, comparativamente ao MS, pode ser devido à maior concentração iônica total desse último meio de cultura, afetando assim o alongamento das brotações. Além disso, o meio JADS possui uma composição nutricional definida para *Eucalyptus grandis*, o que pressupõe que esse meio tenha a nutrição mineral mais próxima ao adequado para a micropropagação de outras espécies do gênero.

As diferenças observadas entre os meios de cultura, não somente é devido à composição mineral de cada um em específico, mas também resultado das complexas interações dos nutrientes minerais, dos reguladores de crescimento, do agente gelificante, os mecanismos de absorção e os requerimentos nutricionais dos explantes. Além do mais, acrescentam-se os fatores ambientais, como luz, temperatura e tipo de recipiente utilizado para o cultivo *in vitro* (GLOCKE et al., 2006b).

A opção pelo enraizamento *in vitro* ou *ex vitro* de um material micropropagado é dependente, não apenas em relação ao número e comprimento das brotações alongadas obtidas, mas também da qualidade da parte aérea obtida na fase do alongamento *in vitro* (SANTOS et al., 2004). De maneira geral, pode-se observar que as brotações dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* apresentaram adequado alongamento *in vitro* (1,5 a 3,4 e 1,7 a 2,1 cm de comprimento para o meio de cultura JADS e MS, respectivamente). Isso beneficiou a formação de microestacas com bom padrão de tamanho para permitir o enraizamento *ex vitro*, de forma similar ao relatado por Xavier e Comério (1996).

Desta forma, considerando o número de gemas alongadas dos clones em ambos os meios de cultura, os resultados demonstraram a viabilidade da utilização do AIB no alongamento *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. Novos estudos buscando definir melhores ajustes para a micropropagação de híbridos de *Eucalyptus globulus* são imprescindíveis para maximizar os resultados, aqui obtidos.

O protocolo ajustado mostrou-se eficiente para a micropropagação de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*, porém havendo a necessidade de se adequar a concentração do regulador, bem como dos meios de cultura de forma mais específica para os materiais genéticos.

4. CONCLUSÕES

Os clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* apresentaram variações nas taxas de multiplicação ao longo dos 25 subcultivos, com valores entre 2,4 e 3,6 tufos de brotações.

Os meios de cultura MS e JADS foram eficientes para obtenção de gemas vigorosas alongadas *in vitro*, com baixa oxidação do meio de cultura e reduzida hiper-hidricidade. As concentrações entre 0,25 a 1,00 mg L⁻¹ de AIB e superiores à 0,56 mg L⁻¹ de AIB promoveram o maior número e comprimento de gemas alongadas para os clones nos meios MS e JADS, respectivamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, W. F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.

BANDYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSSEN, G.; HAMILL, D. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important eucalypt species – *Eucalyptus nitens* e *E. globulus*. **Plant Science**, Washington, v. 140, p. 189-198, 1999.

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

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**, Praga, v.47, p.355-360, 2003.

BILLARD, C. E.; LALLANA, V. H. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. **Ciência, Docencia y Tecnología**, n. 30, p. 199-216, 2005.

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

BRAVO, C. D. V.; GONÇALVES, A. N.; DIAS, C. T. S.; VENCOVSKY, R. Controle genético da regeneração *in vitro* em progênies de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2181-2185, 2008.

BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**. Viçosa, n. 33, n. 1, p. 11-19, 2009. 118p.

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

CALDERÓN-BALTIERRA, X.; MONTENEGRO, G.; GARCIA, E. Ontogeny of *in vitro* rooting processes in *Eucalyptus globulus*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**. Washington, v.40, n.5, p. 499–503, 2004.

CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação *Eucalyptus* spp. *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido**. 1993. 113p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba, SP, 1993.

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.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, Burlington, v. 50, p. 151-158, 1968.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J. F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology: application to plant tissues cultures. **Plant Growth Regulation**, Saint Paul, v. 37, n. 3, p. 263-285, 2002.

GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure - Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G.-J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3. ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 1-28.

GLOCKE, P.; DELAPORTE, K.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* cv. 'Urrbrae Gem'. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Washington, v. 42, p. 139-143, 2006b.

GLOCKE, P.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Effects of auxins on organogenesis and somatic embryogenesis from juvenile explants of *Eucalyptus erythronema*, *E. stricklandii*, and two inter-specific hybrids. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**. Dundee, v. 81, n. 6, p. 1009-1014, 2006a.

GOMES, F.; CANHOTO, J.M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (shining gum). **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**. Washington, v.39, p. 316–321; 2003.

GOMÉZ, C.; RÍOS, D.; SÁNCHEZ-OLATE, M. Efecto del subcultivo sucesivo sobre la caulogénesis adventicia de *Eucalyptus globulus*. **Bosque**. Valdivia, v. 28, n. 1, p. 13-17, 2007.

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

HACKETT, W. P. Juvenility and maturity. In: BONGA, J. M., DURZAN, D. J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1987. v.1, p.216-231.

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.

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

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, v. 30, p. 421-327, 1981.

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.

MANKESSI, F.; SAYA, A.; BAPTISTE, C.; NOURISSIER-MOUNTOU, S.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of genetically related *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* clones in relation to the time spent in culture. **Trees**, Berlin, v. 23, n.5, p: 931-940, 2009.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

NUGENT, G.; CHANDLER, S. F.; WHITEMAN, P.; STEVENSON, T. W. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus* Labill. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Washington, v. 37, p. 388-391, 2001.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicação**. Lavras: UFLA, 1997, 159 p.

PIERIK, R.L.M. Rejuvenation and micropropagation. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 7., 1990, Amsterdam. **Proceedings...** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990, p. 91-101.

PINTO G.; SANTOS C, NEVES L, ARAÚJO C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.21, n.3, p.208-213, 2002.

PINTO, G. C. C. C. **Regeneração de plantas de *Eucalyptus globulus* por embriogênese somática**. 2007. 203p. Tese (Doutorado em Biologia) – Universidade de Aveiro, Portugal, 2007.

PINTO, G.; SILVA, S.; PARK, Y.-S.; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, p. 79-88, 2008.

QUOIRIN, M., LEPOIVRE, P. Étude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, Belgium, v.78, p.437-442, 1977.

SANTOS, D. C.; WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; FRACARO, L. C. **Alongamento *in vitro* de *Eucalyptus urophylla***. Colombo: CNPF/EMBRAPA, 2004. 4 p. (Comunicado Técnico, 120).

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

SERRANO, L.; ROCHANGE, F.; SEMBLAT, J. P.; MARQUE, C. TEULIÈRES, C.; BOUDET, A. M. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.47, n. 295, p.285-290, 1996.

SILVA, P. P.; CONTIM, L. A. S.; FREITAS, D. V.; ARIDE, P. H. R.; SANTOS, A. L. W. Estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de sumaúma (*Ceiba pentandra* L. Gaertn). **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 6, p. 437-443, 2010.

SOTELO, M.; MONZA, J. Micropropagation of *Eucalyptus maidenii* elite trees. **Agrociencia** Montevideo, v. 9, n. 6, p. 81-89, 2007.

TRINDADE, H.; PAIS, M.S. *In vitro* studies on *Eucalyptus globulus* rooting ability. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Washington, v. 33, p. 1–5, 1997.

VON ADERKAS, P.; BONGA, J. M. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. **Tree Physiology**, Victoria, v. 20, p. 921–928, 2000.

WARRAG, E. I.; LESNEY, M. S.; ROCKWOOD, D. L. Micropropagation of field tested superior *Eucalyptus grandis* hybrids. **New Forests**, Rotorua, v.4, p. 67–79, 1990.

WHITE, P. R. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. **American Journal of Botany**, New York, v.30, p.33-36, 1943.

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

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

**ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS E MICROESTACAS DE CLONES
DE *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* E DE *Eucalyptus grandis* x *E. globulus***

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do regulador de crescimento ácido indol-3-butírico (AIB) no enraizamento de miniestacas e microestacas apicais e intermediárias, assim como a velocidade de enraizamento em casa de vegetação de dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e dois de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. As avaliações do efeito da aplicação de AIB foram realizadas nas saídas da casa de vegetação (30 dias) e de sombra (40 dias) e na fase de crescimento a pleno sol aos 60 dias após o estaqueamento. A avaliação da velocidade de enraizamento foi realizada no decorrer de 35 dias de permanência das estacas na casa de vegetação. O AIB não teve efeito proeminente sobre a sobrevivência, enraizamento e vigor das miniestacas e microestacas. As estacas apicais foram superiores em relação às intermediárias, com maior predisposição ao enraizamento. A velocidade de enraizamento das microestacas e miniestacas foi variável entre os clones. Os resultados indicaram que o enraizamento das microestacas em relação às miniestacas foi diferenciado para os clones, não havendo superioridade expressiva da microestaquia comparativamente à miniestaquia para as características avaliadas.

Palavras-chave: Microestaquia, miniestaquia, regulador de crescimento.

**ROOTING OF MINI-CUTTINGS AND MICRO-CUTTINGS OF HYBRIDS
OF *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* AND *Eucalyptus grandis* x *E. globulus***

ABSTRACT: This study aimed evaluate the effect of indol-3-butyric acid (IBA) on rooting of apical stem and intermediate stem mini-cuttings and micro-cuttings, as well as the speed of rooting in the greenhouse of two clones of *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* and two of *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. The evaluations were realized on the exit of the greenhouse (30 days) and shade house (40 days) and also in the phase of growth in sunshine condition 60 days. The IBA had not prominent effect on survival, rooting and vigor of the mini-cuttings and micro-cutting. The speed of rooting of mini-cuttings and micro-cuttings was variable among clones. The apical cuttings were more prone to rooting as compare with the intermediate ones. Micro-cutting technique was superior to mini-cutting only for certain parameters evaluated for each clone.

Key words: Micro-cutting technique, mini-cutting technique, growth regulator.

1 - INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus globulus* apresenta características tecnológicas da madeira, como maior rendimento em celulose e menor teor de lignina, que o torna muito atrativo para fins de produção de celulose e papel. No entanto, essa espécie é típica de clima temperado, limitando o seu plantio comercial nas regiões mais quentes do Brasil.

Programas de melhoramento genético visando à hibridação de *Eucalyptus globulus* com *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* representam um grande potencial para as indústrias do setor celulósico, obtendo-se clones híbridos adaptados às condições climáticas tropicais, com boa produtividade e qualidade tecnológica da madeira (FONSECA et al., 2010).

Atualmente, a miniestaquia constitui-se na principal técnica de propagação clonal de *Eucalyptus*, utilizada pelas empresas do setor florestal, a qual, muitas vezes, apresenta resultados tão eficientes quanto os da microestaquia para produção de mudas clonais (WENDLING et al., 2000). Atualmente, o interesse crescente pelo *Eucalyptus globulus* e seus híbridos tem incentivado pesquisas em propagação vegetativa, visando contornar problemas relacionados à recalcitrância ao enraizamento, em razão de baixos percentuais de enraizamento e a formação de um sistema radicular de baixa qualidade desses materiais genéticos pela miniestaquia (BENNET et al., 1994; MARQUES et al., 1999; CALDERÓN-BALTIERRA et al., 2004).

O potencial de enraizamento dos clones em relação à propagação vegetativa por meio da miniestaquia é decorrente da variabilidade genética quanto ao potencial rizogênico dos clones, bem como dependente da juvenilidade das plantas matrizes (WATT et al., 2003). Dessa forma, o rejuvenescimento promovido pela micropropagação tem sido relatado como eficiente para reverter, ainda que parcialmente, o envelhecimento ontogenético observado para *Eucalyptus*, principalmente em relação àqueles clones com maiores dificuldades de enraizamento (XAVIER et al., 2009).

O rejuvenescimento clonal de *Eucalyptus* pela micropropagação tem sido empregado de forma mais direta na propagação pela microestaquia (TITON, 2005). A técnica de microestaquia para clones de *Eucalyptus urophylla*, e seus híbridos com *Eucalyptus grandis*, possibilitou consideráveis ganhos, principalmente quanto ao

aumento dos percentuais e qualidade de enraizamento, bem como na redução do tempo para a formação da muda (ASSIS et al., 1992; XAVIER e COMÉRIO, 1996).

Titon et al. (2002) constataram o desempenho superior da microestaquia em relação à miniestaquia para clones de *Eucalyptus grandis*, evidenciando que o rejuvenescimento foi eficiente, resultando em maior enraizamento. O melhor desempenho para velocidade de enraizamento e qualidade do sistema radicular promovido pela microestaquia, em comparação à miniestaquia, também foi comprovado para clones híbridos de *Eucalyptus grandis* (Xavier et al., 2001).

Entretanto, a variabilidade observada em relação ao enraizamento dos materiais genéticos não está relacionada apenas ao genótipo propagado, uma vez que outros fatores endógenos e exógenos afetam diretamente o seu potencial rizogênico (DÍAZ et al., 2009). A otimização do período de permanência das estacas na casa de vegetação é um dos pontos críticos para o sucesso da produção de mudas clonais, devido às diferenças na velocidade de enraizamento dos clones (CALDERÓN-BALTIERRA et al., 2004; FERREIRA et al., 2004; MELO, 2009).

O *Eucalyptus globulus* e seus híbridos têm apresentado restrições na propagação vegetativa pelo enraizamento de estacas, em razão da variabilidade da habilidade rizogênica dos clones, bem como pela redução do potencial de enraizamento com o envelhecimento das plantas matrizes (WATT et al., 2003). Nesse caso específico de espécies e híbridos considerados recalcitrantes como o *Eucalyptus globulus*, estudos sobre a velocidade de enraizamento colaboram para reduzir os custos de produção, por meio da otimização de uso das instalações e redução nas perdas de miniestacas e microestacas.

Nesse contexto, o presente estudo objetivou avaliar a eficiência do regulador de crescimento AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas apicais e intermediárias, bem como a velocidade de enraizamento em casa de vegetação de dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e de dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material experimental

O material genético utilizado nesse estudo foi constituído por dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C04 e C16) e dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26 e C30), oriundos da empresa Celulose Nipo-Brasileira (CENIBRA), localizada no município de Belo Oriente, Minas Gerais.

A produção de mudas micropropagadas, para a obtenção do material experimental da microestaquia, foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Viveiro de Pesquisas Florestais do Departamento de Engenharia Florestal, ambos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, no período de março de 2008 a março de 2010.

As avaliações referentes à determinação do tempo ótimo de permanência em casa de vegetação e do efeito da aplicação do regulador de crescimento AIB no enraizamento das microestacas e das miniestacas, em condições experimentais, foram realizadas no Viveiro de Pesquisas Florestais do Departamento de Engenharia Florestal localizado no campus da Universidade Federal de Viçosa – UFV, no município de Viçosa, Minas Gerais, no período de outubro a dezembro de 2010.

2.2. Formação dos jardins clonais

Os jardins clonais foram estabelecidos, a partir de material vegetativo de microestacas e miniestacas, no Viveiro de Pesquisas Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa.

Conforme as técnicas de miniestaquia e microestaquia, descritas em Alfenas et al. (2009) e Xavier et al. (2009), o jardim clonal foi constituído de minicepas e microcepas plantadas sob um mesmo sistema semi-hidropônico de canaletão de areia, em casa de vegetação com as laterais abertas, sendo a cobertura de plástico transparente de polietileno.

O microjardim clonal foi formado a partir de mudas provenientes de material micropropagado, através da proliferação de gemas axilares. O meio de cultura utilizado foi composto pelos sais básicos de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962),

vitaminas de White (WHITE, 1943), acrescidos de 100 mg L⁻¹ mio-inositol (Sigma Co.), 800 mg L⁻¹ polivinilpirrolidona (PVP30 - Synth Ltda), 30 g L⁻¹ de sacarose (Synth Ltda) e 7 g L⁻¹ de ágar Merck® (*Agar-agar granulated, purified and free for microbiology* – Merck KgaA, Germany). Na fase de multiplicação *in vitro* suplementou-se o meio de cultura com 0,05 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP – Sigma Co.) e 0,02 mg L⁻¹ de ácido α -naftalenoacético (ANA – Sigma Co.). Já na fase alongamento *in vitro* o meio de cultura foi acrescentado 0,5 mg L⁻¹ de ácido indol-3-butírico (AIB - Sigma Co.) e 0,05 mg L⁻¹ de BAP (Sigma Co.).

A fase de multiplicação *in vitro* foi constituída de sucessivos subcultivos em meio de cultura adequado à multiplicação dos explantes, tendo por finalidade obter o rejuvenescimento e, ou revigoramento clonal. O número de subcultivos realizados variou entre os clones, em função das respostas das gemas à multiplicação *in vitro*, sendo: C04 = 15, C16 = 18, C26 = 14 e C30 = 14.

Após esta fase, procedeu-se a transferência das gemas para o meio adequado ao alongamento, onde permaneceram por 30 dias. As brotações alongadas *in vitro* foram resgatadas e transferidas para potes plásticos, contendo substrato (50% de vemiculita + 50% de Bioplant®), envoltos por sacos plásticos (12 x 25 cm). Posteriormente, essas microestacas foram transferidas para casa de vegetação climatizada (temperatura de 20 a 30 °C e umidade relativa do ar \geq 80%), sendo transplantadas em tubetes plásticos de 55 cm³ de capacidade, contendo substrato comercial Bioplant®, permanecendo neste local por 30 dias.

As mudas enraizadas foram transferidas para aclimação em casa de sombra, com sombrite 50%, até atingirem 10 a 12 cm de tamanho, sendo posteriormente transplantadas para o jardim clonal, no espaçamento de 10 cm x 10 cm. Após 20 dias procedeu-se a poda do ápice das mudas a uma altura de 10 cm da base para formação do microjardim clonal.

O minijardim clonal foi constituído de minicepas, obtidas pelo enraizamento de miniestacas oriundas das brotações de plantas propagadas pelo método da miniestaquia. As miniestacas enraizadas foram transplantadas para o minijardim clonal, no espaçamento de 10 cm x 10 cm e ao atingirem cerca de 10 cm de tamanho tiveram seus ápices podados.

O sistema de manejo e nutrição adotados foi idêntico para as minicepas e microcepas utilizando-se o mesmo canaletão de areia para formar o mini e

microjardim clonal sendo, portanto, seguido o mesmo padrão de condução para ambos.

O sistema de fertirrigação adotado consistiu no fornecimento às plantas de solução nutritiva por gotejamento, distribuída quatro vezes ao dia, numa vazão total diária de 4 L m^{-2} . A solução nutritiva foi composta de nitrato de cálcio ($0,920 \text{ g L}^{-1}$), cloreto de potássio ($0,240 \text{ g L}^{-1}$), nitrato de potássio ($0,140 \text{ g L}^{-1}$), monoamônio fosfato ($0,096 \text{ g L}^{-1}$), sulfato de magnésio ($0,364 \text{ g L}^{-1}$), hidróferro ($0,040 \text{ g L}^{-1}$), ácido bórico ($2,800 \text{ mg L}^{-1}$), sulfato de zinco ($0,480 \text{ mg L}^{-1}$), sulfato de manganês ($1,120 \text{ mg L}^{-1}$), sulfato de cobre ($0,100 \text{ mg L}^{-1}$) e molibdato de sódio ($0,040 \text{ mg L}^{-1}$). A condutividade elétrica da solução nutritiva foi mantida em $2,0 \text{ mS m}^{-2}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.3. Obtenção e enraizamento de miniestacas e microestacas

Miniestacas e microestacas apicais e intermediárias foram coletadas no minijardim e microjardim clonal e acondicionadas em caixas de isopor contendo água, visando manter as condições de vigor e turgescência do material vegetativo. As miniestacas e microestacas apicais foram preparadas com tamanho de 10 cm contendo de dois a três pares de folhas, enquanto as intermediárias medindo 5 cm com um par de folhas, reduzidas à metade de sua dimensão original. As miniestacas e microestacas denominadas intermediárias foram obtidas da porção intermediária do ramo que deu origem a miniestaca ou microestaca apical.

No enraizamento de miniestacas ou microestacas, utilizaram-se como recipientes tubetes plásticos de 55 cm^3 de capacidade, contendo o substrato comercial MecPlant[®]. A nutrição mineral de base utilizada no substrato foi composta de superfosfato simples ($8,00 \text{ kg m}^{-3}$), sulfato de amônio ($0,69 \text{ kg m}^{-3}$), cloreto de potássio ($0,21 \text{ kg m}^{-3}$), sulfato de zinco ($13,9 \text{ g m}^{-3}$), sulfato de cobre ($13,9 \text{ g m}^{-3}$), sulfato de manganês ($13,9 \text{ g m}^{-3}$) e ácido bórico ($27,8 \text{ g m}^{-3}$).

2.4. Condução e avaliações experimentais

2.4.1. Efeito da aplicação de AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas

O experimento foi conduzido no delineamento estatístico de blocos ao acaso, em arranjo fatorial $2 \times 2 \times 2 \times 4$, constituído de dois tipos de miniestacas e

microestacas (apicais e intermediárias), duas doses de AIB (0 e 2000 mg L⁻¹), duas técnicas de propagação vegetativa (miniestaquia e microestaquia) e quatro clones (C04, C16, C26 e C30), com quatro repetições, compostas por 8 miniestacas ou microestacas.

As miniestacas ou microestacas apicais e intermediárias foram tratadas com o regulador de crescimento AIB (Sigma Co.) nas concentrações de 0 e 2000 mg L⁻¹, na formulação líquida, dissolvido em hidróxido de potássio (KOH) a 1 mol L⁻¹ e diluídos em água deionizada. As miniestacas ou microestacas tiveram suas bases (1 cm) mergulhadas na solução de AIB por um período de 10 segundos, antes de serem estaqueadas no substrato. O período compreendido entre a coleta das miniestacas ou microestacas e o seu estaqueamento no substrato, na casa de vegetação, foi sempre inferior a 30 minutos.

As microestacas e miniestacas permaneceram em casa de vegetação climatizada (umidade relativa do ar \geq 80% e temperatura entre 20 e 30 °C) com permanência de 30 dias, e, posteriormente, foram transferidas para casa de sombra (permanência de 10 dias para aclimação) e, finalmente, a pleno sol até completarem 60 dias de idade. Realizou-se uma adubação de cobertura aplicando-se 2 mL por muda de fosfato monoamônico (2,0 g L⁻¹), na saída de casa de vegetação. Na saída da casa de sombra aplicou-se 5 mL por muda do formulado NPK (10-05-30) (6 g L⁻¹). A aplicação da adubação de cobertura foi realizada por meio de uma seringa dosadora automática Hoppner[®], com capacidade volumétrica de 50 ml.

As características avaliadas na saída da casa de vegetação (30 dias) e da casa de sombra (40 dias) foram a porcentagem de sobrevivência e de miniestacas e microestacas com raízes observadas no fundo do tubete. Após 60 dias avaliou-se novamente as porcentagens de sobrevivência e de miniestacas e microestacas com raízes observadas no fundo do tubete, e também o número de raízes por miniestaca ou microestaca enraizada, o diâmetro do colo, a altura e o peso da matéria seca da parte aérea e sistema radicular das miniestacas e microestacas.

Para efeito das avaliações, foram consideradas enraizadas e vivas as miniestacas e microestacas com raízes maiores ou iguais a 0,5 cm e com emissão de brotações e; para a contagem do número de raízes, foram consideradas as raízes emitidas diretamente da base das miniestacas ou microestacas.

2.4.2. Velocidade de enraizamento de miniestacas e microestacas

As avaliações de velocidade de enraizamento das miniestacas e microestacas foram feitas, a cada 7 dias, a contar da data de estaqueamento até o 35º dia, sendo que durante todo este período as estacas permaneceram em casa de vegetação. O trabalho foi realizado no período de 15 de outubro a 21 de novembro de 2011.

Conforme metodologia definida por Melo (2009), nas datas de avaliação foi quantificada: a porcentagem de miniestacas e microestacas com algum grau de modificação, a porcentagem de miniestacas e microestacas enraizadas (raízes maiores ou iguais a 0,5 cm) e a porcentagem de miniestacas e microestacas com raízes maiores que 10 cm de comprimento (estacas com raízes observadas no fundo do tubete). Consideraram-se miniestacas e microestacas modificadas aquelas que apresentaram modificações aparentes e que possuíssem uma predisposição ao enraizamento propriamente dito, tais como presença de pontos translúcidos, intumescimento da base da estaca, formação de calo e pontos de iniciação de raízes.

O experimento foi conduzido no delineamento estatístico de blocos ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 4, constituído de duas técnicas de propagação vegetativa (miniestaquia e microestaquia) e quatro clones (C04, C16, C26 e C30), sendo cada bloco constituído por quatro repetições compostas por 8 miniestacas ou microestacas. Para cada data de avaliação foram avaliadas quatro repetições por clone.

Adicionalmente a estas avaliações descritas acima, foi feita avaliação qualitativa do comportamento das miniestacas e microestacas de cada clone durante o período em estudo. Nesta avaliação, características como a presença de reações de oxidação na base, formação de calos e tombamento de miniestacas e microestacas durante o processo de enraizamento foram observados.

Os dados obtidos referentes à porcentagem de estacas com algum grau de modificação foram utilizados para o ajuste da melhor função que representasse a distribuição dos dados. Por outro lado aqueles obtidos para porcentagem de estacas enraizadas e porcentagem de estacas com raízes maiores que 10 cm foram utilizados para o ajuste da função logística $Y = \alpha (1 + \beta e^{-\gamma T})^{-1}$, em que: Y = porcentagem de enraizamento ou porcentagem de estacas com raízes maiores que 10 cm e T = número de dias após o estaqueamento. As equações foram obtidas através dos programas CurveExpert 1.3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito da aplicação de AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas

A sobrevivência das miniestacas e microestacas na saída da casa de vegetação foram em média superiores a 86%, para os quatro clones avaliados, sendo observado um único valor de 65% para o clone C30 em relação à utilização de AIB (Tabela 1). Esses resultados encontrados foram superiores aos encontrados por Paim et al. (2005), que registraram 55% de sobrevivência de miniestacas de *Eucalyptus globulus* x *E. maidenii* na saída da casa de vegetação. Rosa (2006) obteve percentuais médios de sobrevivência de miniestacas de *Eucalyptus dunnii* inferiores a 70%. Entretanto, Borges (2009) encontrou para miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus* percentuais de sobrevivência acima de 90%, assim como Brondani (2008) obteve sobrevivência superior a 83% para miniestacas de três clones de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii*.

Na saída da casa de sombra, houve redução no percentual de sobrevivência das miniestacas e microestacas, comparado à saída da casa de vegetação, contudo, não existiu diferença entre os tratamentos (tipo de estaca e AIB) para os clones nessa característica avaliada (Tabela 1). De acordo com Brondani (2008) as oscilações ambientais, tanto hídricas como de luminosidade durante o período de aclimação na casa de sombra provavelmente sejam as responsáveis pelo estresse nas estacas resultando em posterior mortalidade dessas.

O percentual de sobrevivência na saída da casa de vegetação embora não represente um resultado concreto do enraizamento das estacas é relevante, pois demonstra, em parte, a eficiência do controle das condições ambientais (umidade e temperatura) na casa de vegetação bem como o vigor das miniestacas e microestacas utilizadas (TITON et al., 2002).

Na saída da casa de vegetação, a constatação da saída de raízes pela base do tubete das estacas apicais foi superior às intermediárias apenas para o clone C04. Já na saída da casa de sombra, as estacas apicais dos clones C04 e C26 foram superiores às intermediárias. Além disso, as estacas do clone C04 tratadas com 2000 mg L⁻¹ de AIB foram superiores àquelas que não receberam a aplicação de AIB (Tabela 1).

Os clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* apresentam valores inferiores a 62,5 % para raízes observadas no fundo do

tubete na saída da casa de sombra, exceção para microestacas apicais do clone C26 tratadas com 2000 mg L⁻¹ de AIB com 81, 3% de raízes observadas no fundo do tubete (Tabela 1).

Tabela 1 – Sobrevivência (SOB) e raízes observadas no fundo do tubete (RFT) de miniestacas (Mini) e microestacas (Micro) apicais (AP) e intermediárias (INT), na saída da casa de vegetação (30 dias) e da casa de sombra (40 dias) dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C04 e C16) e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26 e C30), em função do tratamento com AIB (0 e 2000 mg L⁻¹).

Clone	Técnica	Tipo	AIB	Casa de vegetação		Casa de sombra	
				SOB (%)	RFT (%)	SOB (%)	RFT (%)
C04	Mini	AP	0	93,8 Aa	12,5 Aa	84,4 Aa	28,1 Ab
			2000	87,5 Aa	31,3 Aa	87,5 Aa	62,5 Aa
		INT	0	93,8 Aa	9,38 Ba	81,3 Aa	18,8 Bb
	2000		90,6 Aa	0,00 Ba	78,1 Aa	28,8 Ba	
	Micro	AP	0	84,4 Aa	21,9 Aa	78,1 Aa	40,6 Ab
			2000	84,4 Aa	43,8 Aa	84,4 Aa	59,4 Aa
INT		0	84,4 Aa	12,5 Ba	78,1 Aa	18,8 Bb	
			2000	96,9 Aa	12,5 Ba	81,3 Aa	37,5 Ba
C16	Mini	AP	0	87,5 Aa	25,0 Aa	68,8 Aa	34,4 Aa
			2000	65,6 Aa	21,9 Aa	62,5 Aa	43,8 Aa
		INT	0	93,8 Aa	28,1 Aa	75,0 Aa	37,5 Aa
	2000		75,0 Aa	18,8 Aa	56,3 Aa	37,5 Aa	
	Micro	AP	0	78,1 Aa	37,5 Aa	71,9 Aa	53,1 Aa
			2000	93,8 Aa	34,4 Aa	62,5 Aa	53,1 Aa
INT		0	93,8 Aa	34,4 Aa	93,8 Aa	46,9 Aa	
			2000	65,6 Aa	31,3 Aa	65,6 Aa	43,8 Aa
C26	Mini	AP	0	87,5 Aa	9,38 Aa	81,3 Aa	62,5 Aa
			2000	93,8 Aa	25,0 Aa	93,8 Aa	40,6 Aa
		INT	0	90,6 Aa	18,8 Aa	71,9 Aa	31,3 Ba
	2000		93,8 Aa	6,25 Aa	78,1 Aa	25,0 Ba	
	Micro	AP	0	84,4 Aa	25,0 Aa	84,4 Aa	62,5 Aa
			2000	84,4 Aa	25,0 Aa	78,1 Aa	81,3 Aa
INT		0	90,6 Aa	15,6 Aa	87,5 Aa	37,5 Ba	
			2000	90,6 Aa	12,5 Aa	78,1 Aa	31,3 Ba
C30	Mini	AP	0	87,5 Aa	6,25 Aa	81,3 Aa	34,4 Aa
			2000	71,9 Ab	15,6 Aa	71,9 Aa	34,4 Aa
		INT	0	87,5 Aa	6,25 Aa	71,9 Aa	31,3 Aa
	2000		78,1 Ab	3,13 Aa	78,1 Aa	18,8 Aa	
	Micro	AP	0	90,6 Aa	21,9 Aa	84,4 Aa	43,8 Aa
			2000	78,1 Ab	21,9 Aa	78,1 Aa	34,4 Aa
INT		0	87,5 Aa	25,0 Aa	87,5 Aa	46,9 Aa	
			2000	78,1 Ab	9,38 Aa	78,1 Aa	31,3 Aa

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula, entre tratamentos com AIB e dentro de um mesmo tipo de estaca, e as seguidas de uma mesma letra maiúscula, entre tipos de estaca dentro do mesmo tratamento com AIB, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os materiais genéticos, considerados recalcitrantes ao enraizamento, normalmente necessitam de um período maior de permanência na casa de vegetação, onde há maior controle da umidade relativa do ar e temperatura, tendo assim condições mais favoráveis ao enraizamento. Portanto, caso ocorra a transferência antecipada para a casa de sombra de mudas com um sistema radicular insuficiente para suportar seu crescimento, essas não sobrevivem em razão do menor controle ambiental nesse local. Rosa (2006) evidenciou esse fato para miniestacas de *Eucalyptus dunni* que não apresentavam sistema radicular completo ao serem transferidas para a casa de sombra, as quais secavam rapidamente, em razão das mudanças nas condições ambientais.

O crescimento a pleno sol é a etapa de formação da muda, na qual as mudas já apresentam sistema radicular bem desenvolvido, ocorrendo a degeneração daquelas estacas com um sistema radicular incompleto. Dessa forma, houve redução na sobrevivência das miniestacas e microestacas quando transferidas para a fase de crescimento em pleno sol, indicando que muitas estacas ainda não possuíam sistema radicular adequado que assegurasse o desenvolvimento da muda (Tabela 2).

As miniestacas e microestacas apicais do clone C04 apresentaram percentuais de enraizamento superiores às intermediárias. Por outro lado, o enraizamento das microestacas dos clones C16 e C30 foi superior ao das miniestacas (Tabela 2).

O rejuvenescimento clonal pela micropropagação é avaliado principalmente através dos percentuais de enraizamento das estacas dos materiais genéticos, bem como pela velocidade do processo de rizogênese. A literatura reporta trabalhos com *Eucalyptus grandis* e seus híbridos que demonstraram a superioridade da microestaquia em relação à miniestaquia (XAVIER et al., 2001; TITON et al., 2002).

A provável explicação para a ausência de diferença entre a miniestaquia e a microestaquia para os clones C04 e C26 pode ser devido às minicepas utilizadas possuírem um grau de juvenilidade suficiente para apresentar bom vigor vegetativo, refletido diretamente no enraizamento das miniestacas. Por outro lado, é possível que o número de subcultivos, na fase de multiplicação *in vitro* da micropropagação dos clones em estudo, não tenha sido suficiente para promover rejuvenescimento significativo dos materiais genéticos de maneira a assegurar um acréscimo maior para o enraizamento.

Tabela 2 – Enraizamento (ENR), raízes observadas no fundo do tubete (RFT), número de raízes (NR), diâmetro de colo (DC), altura e peso da matéria seca da parte aérea (PA) e do sistema radicular (PR) de miniestacas (Mini) e microestacas (Micro) apicais (AP) e intermediárias (INT), em condições de pleno sol, dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C04 e C16) e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26 e C30) aos 60 dias, em função do tratamento com regulador de crescimento AIB (0 e 2000 mg L⁻¹).

Clone	AIB	Tipo	Técnica	Crescimento a pleno sol						
				ENR (%)	RFT (%)	NR	DC (mm)	ALTURA (cm)	PA (g)	PR (g)
C04	0	AP	Mini	78,1 Aa	46,9 Aa	2,2 Ab	4,2 Ab	10,3 Aa	1,82 Aa	0,73 Aa
			Micro	84,4 Aa	62,5 Aa	2,6 Aa	5,0 Aa	10,9 Aa	2,08 Aa	0,83 Aa
		INT	Mini	68,8 Ba	18,8 Ba	1,4 Bb	3,5 Bb	5,68 Ba	0,66 Ba	0,55 Ba
			Micro	68,8 Ba	34,4 Ba	1,9 Ba	4,6 Ba	4,49 Ba	0,69 Ba	0,55 Ba
	2000	AP	Mini	78,1 Aa	40,6 Aa	1,9 Ab	5,0 Ab	10,3 Aa	2,13 Aa	0,57 Aa
			Micro	84,4 Aa	68,8 Aa	2,4 Aa	6,4 Aa	11,7 Aa	2,31 Aa	0,53 Aa
		INT	Mini	71,9 Ba	18,8 Ba	1,4 Bb	4,6 Bb	5,37 Ba	0,92 Ba	0,18 Ba
			Micro	78,1 Ba	37,5 Ba	1,8 Ba	5,1 Ba	5,77 Ba	0,93 Ba	0,25 Ba
C16	0	AP	Mini	65,6 Ab	37,5 Aa	2,5 Aa	6,2 Aa	12,6 Ab	2,73 Aa	0,97 Aa
			Micro	90,6 Aa	43,8 Aa	3,2 Aa	5,4 Aa	15,0 Aa	2,96 Aa	0,69 Aa
		INT	Mini	75,0 Ab	37,5 Aa	1,8 Ba	8,0 Aa	6,39 Bb	1,82 Ba	0,42 Aa
			Micro	90,6 Aa	46,9 Aa	2,0 Ba	7,2 Aa	9,36 Ba	2,39 Ba	0,48 Aa
	2000	AP	Mini	53,1 Ab	53,1 Aa	1,8 Aa	6,2 Aa	12,6 Ab	2,40 Aa	0,33 Aa
			Micro	62,5 Aa	56,3 Aa	2,4 Aa	5,4 Aa	14,0 Aa	2,17 Aa	0,57 Aa
		INT	Mini	46,9 Ab	46,9 Aa	1,4 Ba	4,9 Aa	6,80 Bb	1,32 Ba	0,45 Aa
			Micro	62,5 Aa	50,0 Aa	2,0 Ba	4,9 Aa	7,80 Ba	0,90 Ba	0,21 Aa
C26	0	AP	Mini	78,1 Aa	81,3 Aa	2,3 Aa	4,5 Aa	12,8 Ab	1,94 Aa	0,96 Aa
			Micro	87,5 Aa	87,5 Aa	2,2 Aa	5,9 Ab	13,5 Aa	2,66 Aa	0,66 Aa
		INT	Mini	62,5 Aa	46,9 Ba	1,9 Ba	4,0 Aa	5,95 Bb	1,14 Ba	0,56 Ba
			Micro	87,5 Aa	46,9 Ba	1,9 Ba	5,1 Ab	7,36 Ba	1,52 Ba	0,23 Ba
	2000	AP	Mini	87,5 Aa	62,5 Aa	2,7 Aa	5,0 Ab	10,9 Ab	2,42 Aa	0,66 Aa
			Micro	75,0 Aa	50,0 Aa	2,2 Aa	5,9 Aa	13,7 Aa	2,15 Aa	0,56 Aa
		INT	Mini	75,0 Aa	40,6 Ba	1,3 Ba	4,9 Aa	5,74 Bb	0,59 Ba	0,29 Ba
			Micro	68,8 Aa	37,5 Ba	1,5 Ba	5,8 Ab	6,05 Ba	0,87 Ba	0,20 Ba
C30	0	AP	Mini	75,0 Ab	34,4 Ab	2,5 Ab	5,6 Aa	11,8 Ab	1,02 Ab	0,43 Ab
			Micro	81,3 Aa	59,4 Aa	3,4 Aa	7,2 Aa	12,6 Aa	1,89 Aa	0,60 Aa
		INT	Mini	62,5 Ab	25,0 Ab	2,1 Ab	6,9 Aa	7,18 Bb	1,68 Ab	0,18 Bb
			Micro	81,3 Aa	46,8 Aa	3,0 Aa	7,1 Aa	8,66 Ba	1,81 Aa	0,39 Ba
	2000	AP	Mini	53,1 Ab	34,4 Ab	2,0 Ab	6,9 Aa	11,0 Ab	0,88 Ab	0,35 Ab
			Micro	59,4 Aa	59,3 Aa	2,9 Aa	6,2 Aa	13,9 Aa	1,92 Aa	0,54 Aa
		INT	Mini	46,9 Ab	31,3 Ab	1,1 Ab	6,6 Aa	6,25 Bb	0,89 Ab	0,23 Bb
			Micro	59,4 Aa	59,3 Aa	2,8 Aa	5,5 Aa	7,15 Ba	1,68 Aa	0,91 Ba

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula entre técnicas de propagação (Mini e Micro) e dentro de um mesmo tipo de estaca (apical e intermediária) e as seguidas de uma letra maiúscula entre tipo de estaca (apical e intermediária) dentro da mesma técnica de propagação (Mini e Micro) não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A porcentagem de estacas com raízes observadas no fundo do tubete aos 60 dias revelou que as miniestacas e microestacas apicais dos clones C04 e C26 diferiram das intermediárias com relação a esta característica. Já as microestacas do clone C30 tiveram maior percentual de raízes observadas no fundo do tubete (Tabela 2). Os percentuais de raízes emitidas no fundo do tubete confirmam a menor velocidade de enraizamento dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, comparado aos clones de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis*. Esta observação é mais destacada para as estacas intermediárias, nas quais os percentuais para esta característica foram inferiores a 60%.

Os clones C04 e C30 apresentaram valores superiores quanto ao número de raízes para as microestacas em relação às miniestacas, variando de 1,6 a 2,9 (Tabela 2). As estacas apicais foram superiores em relação às intermediárias para o clone C16. Esses resultados provavelmente se devem à aquisição de maior juvenilidade por parte das microestacas, sendo que para as estacas apicais, além do incremento nos percentuais de enraizamento com o aumento de juvenilidade dos propágulos, nota-se maior vigor radicular e conseguinte benefício no aumento do número de raízes (WENDLING e XAVIER, 2005a).

As estacas apicais, em geral, apresentaram maior predisposição ao enraizamento em comparação às intermediárias, devido a maior juvenilidade destes propágulos, havendo a formação mais rápida de raízes e de mudas com o sistema radicular bem mais estruturado, refletindo em maior crescimento tanto em altura como em diâmetro do colo. Essa afirmativa foi confirmada pelos resultados superiores de diâmetro do colo das estacas apicais em relação às intermediárias do clone C04 e também para a altura das microestacas dos clones C16, C26 e C30 (Tabela 2).

Os resultados para as médias de peso de matéria seca da parte aérea demonstraram que as microestacas do clone C30, foram superiores em relação às miniestacas. Por outro lado, para o peso da matéria seca de raízes constatou-se que as estacas apicais foram superiores em relação às intermediárias para os clones C04, C26 e C30. As microestacas do clone C30 foram superiores às miniestacas para o peso da matéria seca de raízes (Tabela 2). Estes resultados provavelmente devem-se a maior juvenilidade das microestacas promovida pelo rejuvenescimento *in vitro*, refletindo em maior vigor das microestacas e aumento direto no peso da matéria seca (TITON et al., 2002).

De maneira geral, com relação às características de número de raízes, diâmetro do colo, altura e peso da matéria seca das miniestacas e microestacas, concluiu-se que a aplicação de AIB mostrou-se desnecessária para o clone C16, fato demonstrado pelos menores percentuais de enraizamento quando houve tratamento das estacas com 2000 mg L⁻¹ deste regulador de crescimento. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Borges (2009), trabalhando com miniestacas do mesmo clone tratadas com 2000 mg L⁻¹ de AIB, o qual obteve melhores resultados quando não se utilizou o regulador de crescimento.

A diversidade de resposta dos clones em relação à utilização de AIB pode estar associada a condições de maturação do material, diferenças do material genético e condições ambientais, entre outros fatores (TITON et al., 2002).

Dentre as auxinas, o AIB tem apresentado maior eficiência no enraizamento de estacas de *Eucalyptus* (XAVIER et al., 2009). No entanto, a utilização do regulador de crescimento bem como as concentrações ótimas a serem utilizadas é específica a cada situação. Alguns trabalhos apresentam que a utilização de AIB no enraizamento de miniestacas não tem mostrado efeitos significativos para espécies de *Eucalyptus* e seus híbridos (XAVIER et al., 2001; SOUZA JUNIOR e WENDLING, 2003; WENDLING e XAVIER, 2005b).

Por outro lado, Almeida et al. (2007) constatou maior percentual de enraizamento de miniestacas em concentrações mais elevadas de AIB para clones de *Eucalyptus cloeziana* com menor capacidade de enraizamento, indicando que a aplicação de AIB promove estímulo à rizogênese. Resultados também favoráveis à aplicação de AIB foram encontrados por Brondani (2008), no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii*.

As miniestacas e microestacas apicais apresentaram de modo geral melhores resultados que as intermediárias. Segundo Xavier et al. (2009), a estaca apical possui grau de maturação fisiológica e de lignificação menor do que a intermediária, portanto sendo mais propensa à formação de raízes. Acrescenta-se que as auxinas são sintetizadas principalmente em regiões de crescimento ativo, como gemas terminais e primórdios foliares, o que contribuiria para a elevação dos níveis endógenos desse fitorregulador nas estacas apicais, refletindo em maior potencial de enraizamento (BORGES, 2009).

Em termos gerais, a maioria dos valores obtidos para o clone C30 foi superior na microestaquia. Os resultados indicaram a maior habilidade de enraizamento das

microestacas em relação às miniestacas. Fato constatado através dos maiores percentuais de enraizamento, estacas com raízes observadas no fundo do tubete, número de raízes, altura e peso da matéria seca da parte aérea e do sistema radicular. Esta evidência pressupõe uma maior dificuldade de propagação do clone C30 por meio da miniestaquia, sendo esta a provável explicação para as maiores diferenças observada entre o enraizamento de microestacas e miniestacas desse clone.

A aplicabilidade da micropropagação para as espécies de *Eucalyptus* e seus híbridos, principalmente aquelas com maior dificuldade de enraizamento, está no fato do rejuvenescimento obtido por esta técnica possibilitar a elevação dos índices e a qualidade do enraizamento destes materiais genéticos.

De acordo com Xavier et al. (2009), resultados satisfatórios para o enraizamento via microestaquia de *Eucalyptus* tem sido obtidos após 10 e 12 subcultivos pela micropropagação para clones de *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus grandis* e seus híbridos. No entanto, para os clones híbridos *Eucalyptus globulus* avaliados no presente estudo, cujos números de subcultivos *in vitro* variaram de 14 a 18, não se observou diferença destacada entre a miniestaquia e a microestaquia.

Entretanto, as respostas intrínsecas de cada material genético à propagação vegetativa podem não refletir de maneira idêntica o rejuvenescimento promovido pela micropropagação. Segundo Mankessi et al. (2009) flutuações na capacidade rizogênica é capaz de ocorrer mesmo entre genótipos estreitamente aparentados, de acordo com um determinismo endógeno. A variabilidade na rizogênese entre os genótipos são intrinsecamente relacionados a ritmos endógenos da planta e não por meio de um controle genético (McCOWN, 2000). Portanto, a interação entre citocinina e auxina na etapa de multiplicação *in vitro* e suas respectivas concentrações atuam em diferentes níveis endógenos afetando diversas rotas metabólicas, explicando assim as diferenças encontradas para os materiais genéticos estudados quanto ao rejuvenescimento promovido pela micropropagação.

3.2. Velocidade de enraizamento de miniestacas e microestacas

De acordo com a distribuição dos dados de porcentagem de estacas com algum grau de modificação, o modelo que melhor representou a distribuição dos dados foi do tipo $Y = (a+bT)/(1+cT+dT^2)$ (Figura 1), em que Y = porcentual de miniestacas modificadas e T = número de dias após o estaqueamento. As curvas

ajustadas para os clones permitiram distinguir respostas variadas quanto à velocidade de enraizamento, tanto na miniestaquia como na microestaquia (Figura 1). As avaliações demonstraram que os clones C04 e C30 quando propagados via miniestaquia, comparativamente à microestaquia, necessitaram de maior número de dias para atingir maior porcentagem de miniestacas com a base modificada.

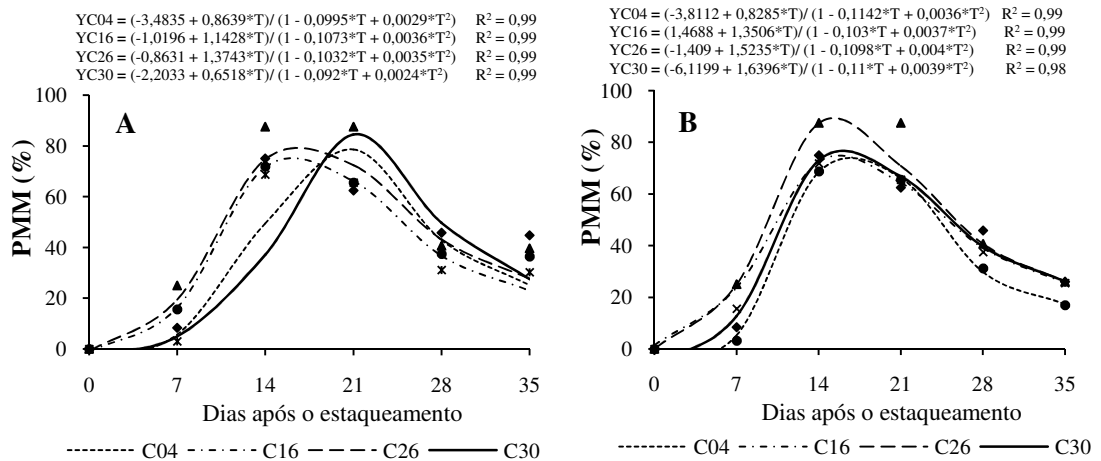


Figura 1 - Porcentagem de miniestacas (A) e microestacas (B) modificadas (PMM), em dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C04 e C16) e dois de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C26 e C30), em função do tempo após o estaqueamento.

Com relação aos dados de enraizamento (Figura 2) e porcentagem de miniestacas e microestacas com raízes maiores que 10 cm (Figura 3), o modelo logístico apresentou o melhor ajuste para os quatro clones híbridos de *Eucalyptus globulus*.

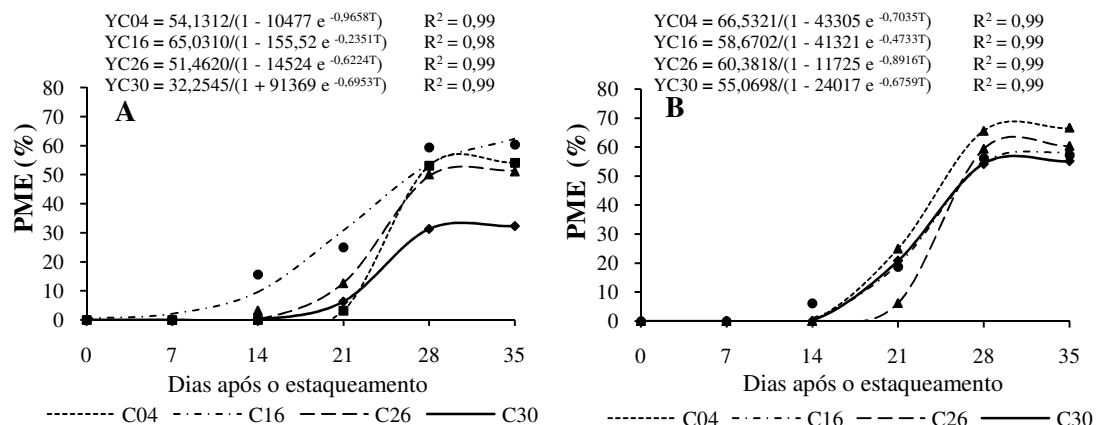


Figura 2 - Porcentagem de miniestacas (A) e microestacas (B) enraizadas (PME), em dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C04 e C16) e dois de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C26 e C30), em função do tempo após o estaqueamento.

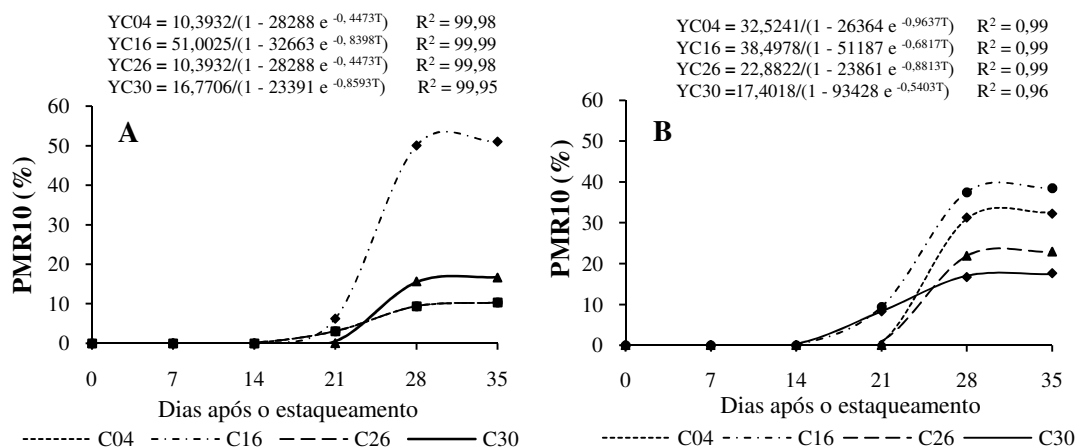


Figura 3 - Porcentagem de miniestacas (A) e microestacas (B) com raízes maiores que 10 cm (PMM10), em dois clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C04 e C16) e dois de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C26 e C30), em função do tempo após o estaqueamento.

As peculiaridades quanto à velocidade de enraizamento também foram observadas em relação à porcentagem de miniestacas e microestacas enraizadas. O clone C16 apresentou a mais rápida e maior porcentagem de enraizamento das miniestacas aos 35 dias (Figura 2A), tendo em torno de 10% das miniestacas enraizadas, aos 14 dias e aos 35 dias cerca de 62%. Resultado diferente ao encontrado por Goulart (2007) a qual observou que a formação endógena de primórdios radiculares e a formação de calos em miniestacas apicais de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, foram observadas com até 12 dias de idade.

Os resultados referentes à microestaquia diferiram da miniestaquia, sendo observados maiores percentuais de enraizamento para todos os clones, com exceção para o clone C16. O clone C04 apresentou para as microestacas, o maior PME com 66,5%, sendo acompanhado pelos clones C26 e C16 com 60% e 55% de enraizamento, respectivamente (Figura 2B).

Os clones propagados por meio da miniestaquia tiveram um baixo percentual de miniestacas com raízes com tamanho superior a 10 cm, exceto o clone C16 que apresentou 51% das miniestacas com raízes maiores que 10 cm, aos 35 dias após o estaqueamento (Figura 4). Já os clones C04 e C26 apresentaram baixos percentuais (10%) de miniestacas com raízes maiores que 10 cm (Figura 3).

A diferença mais acentuada foi observada para o clone C30, em relação à miniestaquia para a microestaquia. A partir do 14º dia já se constatava a presença de raízes adventícias em algumas microestacas, enquanto nas miniestacas havia apenas

um calejamento em sua base (Figura 4). O resultado encontrado é semelhante ao encontrado no experimento de enraizamento de miniestacas e microestacas em relação à utilização do regulador de crescimento AIB, no qual observou um maior percentual de enraizamento das microestacas (Tabela 2). Este resultado em parte é explicado pelo rejuvenescimento e, ou, revigoramento promovido pela micropropagação.

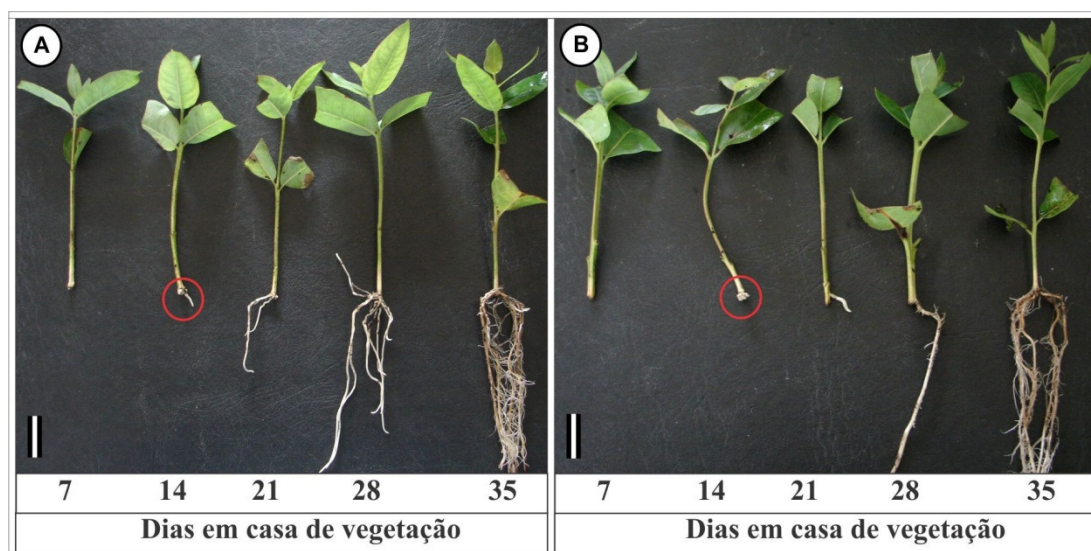


Figura 4 – Velocidade de enraizamento de microestacas (A) e miniestacas (B) apicais do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C30) no decorrer de 35 dias de permanência em casa de vegetação. Barra = 2 cm.

Com base nas observações feitas na avaliação, as microestacas apresentaram menor oxidação da base das estacas bem como baixo percentual de calejamento sendo constatada a emergência da maioria das raízes diretamente das estacas, sem a formação de calo. Estas evidências poderiam ser decorrentes do maior vigor vegetativo por parte das microestacas, explicando, assim, a melhor resposta ao enraizamento observado para os propágulos oriundos da microestaquia.

A rizogênese em estacas apresenta diversas respostas em função da interação de vários fatores, como o material genético (WENDLING et al., 2000; TITON et al., 2002; WENDLING e XAVIER, 2005b), aplicação de regulador de crescimento (ALMEIDA et al., 2007), época do ano, temperatura, luminosidade, fotoperíodo, juvenildade (ZUFFELLATO-RIBAS e RODRIGUES, 2001; ASSIS e MAFIA, 2007; ALFENAS et al., 2009), dentre outros.

O material genético afeta diretamente a capacidade e a velocidade de enraizamento das estacas. Mankessi et al. (2009) avaliando o enraizamento *in vitro*

de dois clones meio irmãos híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, com a mesma idade, constataram acentuadas diferenças na capacidade de enraizamento. Portanto, o *Eucalyptus globulus* e seus híbridos, considerados recalcitrantes ao enraizamento, necessitam de um tempo maior para a formação de raízes, em comparação aos híbridos de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis*, justificando assim a permanência das miniestacas na casa de vegetação por um período de tempo maior.

Entretanto, apesar de um aumento no período de permanência em casa de vegetação implicar diretamente no aumento nos percentuais de enraizamento de clones com maior dificuldade de enraizamento, haverá aumento do período para obtenção de uma muda com qualidade suficiente para plantio, em comparação às mudas de clones de *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus grandis* e seus híbridos. Portanto, a microestaquia justifica-se em virtude da maior velocidade de enraizamento observada para as microestacas, obtendo-se ganhos em produtividade e redução nos custos de produção.

Desta forma, o conhecimento da velocidade do enraizamento das miniestacas e microestacas viabiliza a otimização do uso das estruturas de propagação, visto estas serem retiradas no momento mais adequado. Contudo, estudos como este devem ser realizados, avaliando-se o estaqueamento em diferentes épocas do ano uma vez que os fatores climáticos têm influência direta no processo rizogênico, podendo ocorrer variações em relação ao enraizamento.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- 1) O regulador de crescimento (AIB) não proporcionou efeito relevante para o enraizamento das miniestacas e microestacas.
- 2) De forma geral, as estacas apicais foram superiores em relação às intermediárias, apresentando maior predisposição ao enraizamento.
- 3) Não foi observada superioridade expressiva da microestaquia em relação à miniestaquia para as características avaliadas.
- 4) As avaliações de velocidade de enraizamento das microestacas e miniestacas indicaram diferenças entre os clones quanto ao processo rizogênico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2009. 500p.

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

ASSIS, T. F., ROSA, O. P., GONÇALVES, S. I. Propagação por microestaquia. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7., 1992, Nova Prata. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 1992. p. 824-836.

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

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

BORGES, S. R. **Micropropagação e enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*** 2009. 72f. . Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

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

CALDERÓN-BALTIERRA, X.; MONTENEGRO G.; GARCIA, E. Ontogeny of *in vitro* rooting processes in *Eucalyptus globulus*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Washington, v. 40, n. 5, p. 499–503, 2004.

DÍAZ, K.; VALIENTE, C.; MARTÍNEZ, M.; CASTILLO, M.; SANFUENTES, E. Root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, p.867–873, 2009.

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

FONSECA, S. M.; RESENDE, M.D.V.; ALFENAS, A.C.; GUIMARÃES, L.M.S.; ASSIS, T.F.; GRATTAPAGLIA, D. **Manual prático de melhoramento genético do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2010. 200p.

GOULART, P. B. **Influência do acondicionamento, antioxidantes, auxinas e seus cofatores no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla***. 2007. 115f. . Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

MANKESSI, F.; SAYA, A.; BAPTISTE, C.; NOURISSIER-MOUNTOU, S.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of genetically related *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* clones in relation to the time spent in culture. **Trees**, Berlin, v. 23, n.5, p: 931-940, 2009.

MARQUES, C.M.; VASQUEZ-KOOL, J.; CAROCHA, V.; FERREIRA, J.C.; O'MALLEY, D. M.; LIU, B.H.; SEDEROFF, R. Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 99, p.936–946, 1999.

McCOWN, B. H. Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance: recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: dealing with genetic predeterminism. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Washington, v. 36, p. 149–154, 2000.

MELO, L. A. **Armazenamento, aplicação de antioxidantes e otimização do tempo em casa de vegetação no enraizamento de miniestacas de híbridos de *Eucalyptus grandis*** 2009. 58f. . Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

PAIM, D.C.; RUEDELL, C.M.; SCHWAMBACH, J.; FETT NETO, A.G. Physiological characterization of adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* x *maidenii* minicuttings. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 10., 2005, Recife. **Anais...** Campinas: SBFV, 2005, p.34-37.

ROSA, L. S. da **Adubação nitrogenada e substratos na miniestaquia de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2006. 89p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006.

SOUZA JUNIOR, L.; WENDLING, I. Propagação vegetativa de *Eucalyptus dunnii* via miniestaquia de material juvenil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 46, p. 21-30, 2003.

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

TITON, M. **Indução de embriogênese somática em *Eucalyptus grandis***. Viçosa, MG: UFV. 2005. 106f. . Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

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

WENDLING, I.; XAVIER, A.; GOMES, J. M.; PIRES, I. E.; ANDRADE, H.B. Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 24, n.2, p.181-186, 2000.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência da miniestaquia seriada no vigor radicular de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v.29, n.5, p.681-689, 2005a.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no enraizamento e vigor de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 921-930, 2005b.

WHITE, P. R. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. **American Journal of Botany**, New York, v.30, p.33-36, 1943.

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

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

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

ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; RODRIGUES, J. D. Relações entre época do ano e diferentes concentrações de ácido indol butírico no enraizamento de estacas de *Eucalyptus grandis*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 42, p. 71-80, 2001.

3. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos para os clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* permitem concluir:

- 1) O meio de cultura MS apresentou resultados satisfatórios na fase de multiplicação *in vitro*, no entanto, houve uma variação dos clones na taxa de multiplicação ao longo dos subcultivos. Na fase de alongamento *in vitro*, os meios de cultura MS e JADS favoreceram o alongamento das gemas, bem como o regulador de crescimento AIB. De modo geral, as concentrações entre 0,25 e 1,00 mg L⁻¹ de AIB foram favoráveis para a obtenção de maior número e comprimento de gemas alongadas.
- 2) No enraizamento, os clones apresentaram respostas diferenciadas quanto à miniestaquia e microestaquia. O tratamento das estacas com AIB, não resultou em incremento nos percentuais de enraizamento. Por outro lado, as estacas apicais mostraram mais responsivas quanto ao enraizamento. A velocidade do processo rizogênico de miniestacas e microestacas diferiu entre os materiais genéticos. De modo geral, não foi observada superioridade expressiva da microestaquia em relação à miniestaquia para as características avaliadas.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a metodologia ajustada no presente estudo, quanto à micropropagação, foi eficiente para atender aos objetivos propostos para as fases de multiplicação e alongamento *in vitro*. Pode-se concluir, também, que o número de subcultivos durante a micropropagação não foi suficiente para promover um adequado rejuvenescimento dos clones, pela constatação dos resultados obtidos para a microestaquia e miniestaquia.