

ANNE CAROLINE GUIEIRO CORREIA

**MICROPROPAGAÇÃO EM BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA E
ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS E MICROESTACAS 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

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C824m
2011

Correia, Anne Caroline Guieiro, 1984-

Micropropagação em biorreatores de imersão temporária e enraizamento de miniestacas e microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus* / Anne Caroline Guieiro Correia.

– Viçosa, MG, 2011.

xi, 62f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Aloisio Xavier.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Propagação in vitro. 2. Eucalipto - Enraizamento. 3. Propagação vegetativa. 4. Plantas - Propagação. 5. Biotecnologia florestal. 6. Clonagem. 7. Florestas. 8. *Eucalyptus globulus*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDO adapt. CDD 634.3232328

ANNE CAROLINE GUIEIRO CORREIA

**MICROPROPAGAÇÃO EM BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA E
ENRAIZAMENTO DE MINIESTACAS E MICROESTACAS 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: 21 de julho de 2011

Prof. Wagner Campos Otoni
(Coorientador)

Prof^ª. Miranda Titon
(Coorientadora)

Pesq. Antonio Marcos Rosado

Prof. Aloisio Xavier
(Orientador)

A meus pais Rubens Ribeiro Correia e Tânia Guieiro Correia, dedico esta dissertação como reconhecimento pelo apoio, incentivo e amor de que eu precisava para hoje estar aqui.

A meu irmão Rômulo Guieiro Correia,
pela força e apoio de sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tanto amor e bondade e pela oportunidade do conhecimento.

Aos meus pais Rubens e Tânia pelo amor, apoio e carinho que me sustentam aonde quer que eu vá.

A meu irmão Rômulo e a meu amor Andreyson por me incentivarem em todos os momentos.

Aos familiares e amigos que, mesmo estando longe, torcem muito por mim.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Engenharia Florestal, pela oportunidade de realização deste treinamento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Capes (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudos.

À Empresa Celulose Nipo-Brasileira S.A. (Cenibra), pelo fornecimento do material genético.

Ao professor Aloisio Xavier, pela oportunidade e orientação.

À professora Miranda Titon e ao professor Wagner Campos Otoni, pelas contribuições para este trabalho.

Aos amigos e professores da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, pelo apoio à realização deste programa de mestrado.

Aos amigos Poliana, Leandro, William, Juliana, Tiago, Cibele, Vicente, Giovanni e Gleidson por ajudarem nos trabalhos e pelos momentos de alegrias que compartilhamos.

Aos amigos Simone, Bruna, Glauciana, Renatinho, Ana Flávia, Gláucio, Maria Fernanda, Rogério, Djair, Flávia e Alexandre.

Aos amigos do laboratório de cultura de tecidos do Bioagro, Ana Cláudia, Cleber, Joseila, Joyce, Lorena, Diego, Marcela, Marcos, Elyabe, Leonardo, Bruno obrigada, por fazerem as horas no laboratório mais alegres.

Aos funcionários do Viveiro Florestal da Universidade Federal de Viçosa, Alex, Sr. Sebastião, Eduardo e Lucas, obrigada, pela amizade e colaboração.

À Ritinha, Alexandre e Alfredo pela paciência em nos atender e eficiência no trabalho.

A todos aqueles que não estão citados aqui, mas que com seu auxílio e colaboração, tornaram possível a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Anne Caroline Guieiro Correia, filha de Rubens Ribeiro Correia e Tânia Guieiro Correia, nasceu em 14 de outubro de 1984, no município de Curvelo, Minas Gerais.

Em 2002, concluiu o 2^o grau na Escola Estadual Bolívar de Freitas, em Curvelo, Minas Gerais.

Em 2004, iniciou o curso de Engenharia Florestal na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, concluído em dezembro de 2008.

Em agosto de 2009, ingressou no mestrado do programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em julho de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
Micropropagação de clones híbridos de <i>Eucalyptus globulus</i> em meio de cultura semissólido e em biorreator de imersão temporária.....	
RESUMO.....	6
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1. Fonte, meio de cultura e condições de cultivo dos explantes	9
2.2. Cultivo em meio sólido x meio líquido.....	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4. CONCLUSÕES	18
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
Influência da razão N(NO ₃ ⁻):N(NH ₄ ⁺) na multiplicação e alongamento <i>in vitro</i> de brotações de clones híbridos de <i>Eucalyptus globulus</i> em biorreator de imersão temporária	
RESUMO.....	21
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1. Fonte, meio de cultura e condições de cultivo dos explantes	23
2.2. Razões de nitrogênio: nitrato (NO ₃ ⁻) e amônio (NH ₄ ⁺)	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
3.1. Razões N(NO ₃ ⁻):N(NH ₄ ⁺) na fase de multiplicação <i>in vitro</i>	26
3.2. Razões N(NO ₃ ⁻):N(NH ₄ ⁺) na fase de alongamento <i>in vitro</i>	30
4. CONCLUSÕES	32
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
Influência do substrato no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones híbridos de <i>Eucalyptus globulus</i>	
RESUMO.....	35
ABSTRACT	35
1. INTRODUÇÃO	36
2. MATERIAL E MÉTODOS	38

2.1. Material experimental	38
2.2. Formação dos jardins clonais	38
2.3. Obtenção, preparo e estaqueamento das miniestacas e microestacas	40
2.4. Avaliações experimentais	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4. CONCLUSÕES	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
Influência da miniestacas e microestacas no enraizamento de clones híbridos de <i>Eucalyptus globulus</i>	49
RESUMO.....	49
ABSTRACT	49
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1. Material experimental	51
2.2. Formação dos jardins clonais	51
2.3. Obtenção, preparo e estaqueamento das miniestacas e microestacas	53
2.4. Avaliações experimentais	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4. CONCLUSÕES	59
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	62

RESUMO

CORREIA, Anne Caroline Guieiro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Micropropagação em biorreatores de imersão temporária e enraizamento de miniestacas e microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus***. Orientador: Aloisio Xavier. Coorientadores: Miranda Titon e Wagner Campos Otoni.

O presente trabalho teve como objetivos avaliar a micropropagação através do uso de biorreatores de imersão temporária RITA[®] nas fases de multiplicação e alongamento *in vitro*, bem como a miniestaquia e a microestaquia no enraizamento de clones *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. Na fase de multiplicação e alongamento avaliou-se o cultivo em sistema líquido (biorreator RITA[®]) e semissólido (potes plásticos e tubos de ensaio), além das diferentes razões entre as fontes de nitrogênio (nitrato/amônio) no crescimento e produtividade dos explantes. Foram verificados também a influência das técnicas de propagação (miniestaquia e microestaquia), diferentes substratos e tipos de estacas (apical com e sem redução foliar e intermediária) no enraizamento de quatro clones de *Eucalyptus globulus*. Constatou-se que o biorreator de imersão temporária RITA[®] e os potes plásticos apresentaram os melhores resultados no crescimento dos explantes. Não houve diferença entre as razões de nitrogênio nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺) (1:1, 2:1 e 3:1) utilizadas na fase de multiplicação e alongamento, exceto para o clone C16, que, na fase de multiplicação, obteve maior crescimento e produtividade na razão 2:1(NO₃⁻):(NH₄⁺). De forma geral, as culturas apresentaram alto grau de hiper-hidricidade, sendo esta desordem um fator limitante nas condições deste estudo para a micropropagação em biorreator de imersão temporária RITA[®]. Não foi observada

superioridade expressiva das microestacas em relação às miniestacas e houve efeito dos diferentes substratos apenas para algumas características. Constatou-se, de modo geral, superioridade das estacas apicais (sem redução e com redução foliar) em relação às intermediárias.

ABSTRACT

CORREIA, Anne Caroline Guieiro, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Micropropagation temporary immersion bioreactor and rooting of mini and micro-cuttings hybrid clones of *Eucalyptus globulus***. Advisor: Aloísio Xavier. Co-advisors: Miranda Titon e Wagner Campos Otoni.

This study aimed to evaluate the micropropagation through temporary immersion bioreactors RITA[®] multiplication and elongation in vitro, as well as mini-cuttings and microcutting the rooting of clones *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* and *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*. In the multiplication phase and stretching evaluated the cultivation liquid system (bioreactor RITA[®]) and semi-solid (plastic bottles and test tubes), and the ratios between the different sources of nitrogen (nitrate / ammonium) on growth and productivity explants. the influence of propagation techniques, (micro and mini-cuttings), different types of cuttings and substrates (with and without apical and middle leaf reduction) in the rooting of clones hybrid *Eucalyptus globulus* clones. It was found that the bioreactor of temporary immersion RITA[®] and plastic pots showed the best results in the growth of explants. There was no difference between the reasons for nitrate nitrogen (NO₃⁻) and ammonium (NH₄⁺) (1:1, 2:1 and 3:1) used in the multiplication phase and elongation, except for clone C16 in the phase of multiplication obtained greater growth and productivity in the ratio 2:1 (NO₃⁻): (NH₄⁺). Overall cultures had a high degree of hyper-hydro, which is a disorder limiting factor in this study conditions for micropropagation in bioreactor of temporary immersion RITA[®]. There was no significant superiority of micro-cuttings regarding mini-cuttings and was no effect of different substrates for only a

few features. In overall, the of apical cuttings (without reduction and reduced leaf) was superiority in relation the intermediate.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A expansão da área plantada com o gênero *Eucalyptus* deve-se principalmente ao rápido crescimento em ciclo de curta rotação e à alta produtividade florestal, assim como à expansão e direcionamento de novos investimentos por parte de empresas de segmentos que utilizam sua madeira como matéria-prima em processos industriais. De acordo com a ABRAF (2011), as expansões previstas no segmento de celulose e papel têm sido a alavanca do crescimento nas áreas plantadas.

A grande diversidade de espécies do gênero tem permitido que muitas delas sejam utilizadas como fonte de matéria-prima na produção de papel e celulose; no entanto, o *Eucalyptus globulus*, em comparação com as demais espécies, apresenta características anatômicas, físicas e químicas da madeira excelentes para a produção de polpa, principalmente devido ao alto rendimento obtido em celulose e à necessidade de menores quantidades de produtos químicos para seu branqueamento pelo menor conteúdo de lignina (CARDOSO, 2002; PINTO, 2007; XAVIER *et al.*, 2007a; ALFENAS *et al.*, 2009).

Inicialmente, no sul do Brasil, houve interesse na propagação de *Eucalyptus globulus* por miniestaquia, entretanto, em razão dos excelentes resultados obtidos com híbridos de *Eucalyptus globulus*, tanto em qualidade da madeira quanto em crescimento em relação à espécie pura, a opção por esses híbridos tendeu a prevalecer (ALFENAS *et al.*, 2009). Quanto ao processo de propagação clonal, a literatura tem indicado o *Eucalyptus globulus* como de difícil enraizamento, apresentando índices inferiores aos desejados em programas de produção de mudas clonais por miniestaquia.

Embora a miniestaquia seja uma das técnicas mais utilizadas atualmente no enraizamento de estacas pelas empresas florestais na propagação clonal de *Eucalyptus* (CUNHA *et al.*, 2008), ainda faltam conhecimento e domínio sobre o controle da formação de raízes adventícias nas estacas, bem como sobre o processo de maturação, tornando-a inviável em muitos casos. Devido às dificuldades de enraizamento de certos clones através da estaquia, principalmente no que envolve material adulto, à adoção de técnicas de reversão ao estado juvenil, como a micropropagação, vem sendo adotada na tentativa de restaurar a sua competência ao enraizamento (TITON, 2001; BORGES, 2009; OLIVEIRA, 2011).

A micropropagação ou a propagação vegetativa *in vitro* apresenta diversas aplicações na área florestal, entre elas: a conservação de germoplasma *in vitro*; o rejuvenescimento de clones e a obtenção de sementes sintéticas (embriões somáticos); atua na limpeza clonal para obtenção de culturas livres de patógenos; constitui base para biotecnologias como, por exemplo, a transformação genética, além de acelerar os programas de melhoramento, pela multiplicação de clones superiores visando à produção de mudas (XAVIER *et al.*, 2007b; XAVIER *et al.*, 2009).

Novos sistemas de micropropagação têm sido desenvolvidos na obtenção de melhorias do processo de produção vegetal *in vitro*, com o objetivo de potencializar os benefícios da micropropagação e mitigar suas dificuldades, tornando esta técnica mais simples e menos dispendiosa (LORENZO *et al.*, 1998, PENCHEL *et al.*, 2007). Entre os novos sistemas surgidos, de interesse de profissionais na automatização e na aplicação de tecnologias em escala comercial na cultura de tecidos (PENCHEL *et al.*, 2007), encontra-se o sistema de biorreatores.

Os biorreatores podem ser empregados no cultivo sob imersão temporária ou permanente, utilizados para micropropagação clonal e massal de plantas de cultura de células, tecidos, sementes ou órgãos vegetais (TEIXEIRA, 2002) em solução nutritiva líquida, tendo como propósito fundamental, facilitar o trabalho rotineiro e melhorar as condições ambientais e assépticas para as culturas, produzindo-as em larga escala. Conforme Ziv *et al.* (2003), a tecnologia proporcionada por este sistema de cultivo oferece uma maior rapidez no processo de produção de mudas e eficiência em relação aos demais métodos

convencionalmente utilizados. Paralelamente, há uma redução nos custos do processo, cuja função básica é promover condições ótimas de crescimento por meio da regulação de fatores químicos e/ou físicos. Murch et al (2004) ainda relatam que os biorreatores proporcionam melhor oxigenação e nutrição das culturas através do meio de cultura líquido, diminuição da hiper-hidricidade, melhoria da qualidade dos propágulos e consequente sobrevivência durante a aclimatização.

Desta maneira, este trabalho propõe estudar a micropropagação de clones híbridos de *Eucalyptus globulus* utilizando o sistema de biorreatores de imersão temporária RITA[®], bem como avaliar a eficiência da propagação clonal desses híbridos, pela microestaquia e miniestaquia. Como objetivos específicos, têm-se: 1) avaliar a multiplicação *in vitro* nos sistemas de cultivo semissólido (potes plásticos e tubos de ensaio) e em biorreatores de imersão temporária RITA[®]; 2) avaliar a influência das diferentes razões entre as fontes de nitrogênio nitrato e amônio no meio de cultura MS em biorreatores de imersão temporária RITA[®]; 3) verificar a influência de diferentes substratos e técnicas de propagação, miniestaquia e microestaquia, na produção de mudas; e 4) verificar a influência do tipo de estaca, com folha inteira ou reduzida, no 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**. Viçosa: UFV, 3^a ed. 2009. 500p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2010. Brasília, ABRAF, 2011.130p.

BORGES, S. R. **Micropropagação e enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus***. 2009. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CARDOSO, G. V. **Otimização do cozimento kraft para produção de celulose a partir de madeiras de *Eucalyptus globulus* com diferentes teores de lignina**. 2002. 147 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

CUNHA, A. C. M. C. M.; WENDLING, I.; JÚNIOR, L. S. Miniestaquia em sistema de hidroponia e em tubetes de corticeira-do-mato. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 18, n. 1, p. 85-92, 2008.

LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B. L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BARROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 54, p. 197-200, 1998.

MURCH, S.J.; LIU, C.; ROMERO, R.M.; SAXENA, P.K. In vitro culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.78, p.63–68, 2004.

OLIVEIRA, L. S. Micropropagação, microestaquia e miniestaquia de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. 2011. 71p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: Borém, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: UFV, 2007. cap. 4, p. 75-92.

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

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 24, p. 36-41, 2002.

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

XAVIER, A.; OTONI, W.C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: UFV, 2007b. cap. 3, p. 55-74.

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

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

ZIV, M.; CHEN, J. VISHNEVETSKY, J. Propagation of Plants in Bioreactors: Prospects and Limitations. In: ECONOMOU, A.S.; READ, P.E. (Eds) Proc 1^a IS on Accl. & Estab. Microprop. Plants, **Acta Horticulturae**. v. 616, p.85-93, 2003.

Micropropagação de clones híbridos de *Eucalyptus globulus* em meio de cultura semissólido e em biorreator de imersão temporária

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo avaliar a micropropagação de clones híbridos de *Eucalyptus globulus* em meio de cultura semissólido e em biorreator de imersão temporária na fase de multiplicação. Foram estudados três tipos de sistemas de cultivo *in vitro* (biorreator RITA[®], tubos de ensaio e potes plásticos) e quatro clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. O crescimento e o desenvolvimento dos explantes foram avaliados por meio da contagem do número de brotos por explante, massa fresca por explante, massa seca dos brotos por explante e o grau de hiper-hidricidade. Constatou-se que o biorreator de imersão temporária RITA[®] e os potes plásticos promoveram os maiores ganhos em número de brotos e massa fresca por explante, sendo observado alto grau de hiper-hidricidade, principalmente nesse tipo de sistema de cultivo utilizado.

Palavras-chave: Biotecnologia, meio cultura líquido, propagação *in vitro*.

Micropropagation of hybrid clones of *Eucalyptus globulus* in culture semissólido medium and in temporary immersion bioreactor

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the micropropagation of hybrid clones of *Eucalyptus globulus* in culture semissólido and bioreactor of temporary immersion in the multiplication phase. Three types of *in vitro* culture system (RITA[®] bioreactor, test tubes and plastic bowls) and four hybrid clones of *Eucalyptus globulus*. Growth and development of explants was evaluated by counting the number of shoots per explant, fresh weight per explant, number of dry mass of shoots per explant and the degree of hyper-hydricity. It was found that the bioreactor of temporary immersion RITA[®] plastic pots and promoted the greatest gains in number of shoots and fresh mass per explant, being observed a high degree of hyper-hydricity, regardless of the type of culture system used.

Keywords: biotechnology, liquid culture medium, *in vitro* propagation.

1. INTRODUÇÃO

A propagação clonal está presente na maioria das empresas florestais, a qual foi desenvolvida estrategicamente na busca por melhoria na produtividade e qualidade das florestas. Entre as técnicas de propagação vegetativa que evoluíram da estaquia convencional, destacam-se a miniestaquia e a microestaquia, que proporcionaram benefícios no processo de produção de mudas. Também a micropropagação tem se destacado pelo seu maior potencial de produzir mudas livres de patógenos (XAVIER *et al.*, 2009) quando comparada a outros métodos, além de ser uma alternativa recomendável quando existe alto grau de maturação do material genético (GOMES e CANHOTO, 2003). Segundo Dutra *et al.* (2009), a micropropagação é indicada 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 necessidade de incrementar a produção em curto espaço de tempo com fins comerciais.

Entre os sistemas de micropropagação que vêm sendo desenvolvidos para melhoria do processo de produção de mudas *in vitro*, focando a redução dos custos, estão os sistemas de biorreatores (LORENZO *et al.*, 1998). Esses biorreatores são equipamentos utilizados para micropropagação clonal sob imersão temporária ou permanente de células, gemas, tecidos, órgãos (como as gemas) ou embriões vegetais, tendo como objetivo final a produção de mudas em larga escala (TEIXEIRA, 2002). São eficazes, pois consistem em um sistema com certo grau de automação, possibilitando redução de mão-de-obra e alta produção na multiplicação de plantas (PENCHEL *et al.*, 2007).

Uma das principais vantagens de utilizar biorreatores no cultivo *in vitro* de plantas em relação ao sistema convencional semissólido se deve principalmente ao uso do meio nutritivo líquido visto que proporciona incremento em produtividade e eficiência do processo de propagação (CALDAS *et al.*, 1998; LEMOS *et al.*, 2001; ETIENNE *et al.*, 2006; PENCHEL *et al.*, 2007), é de rápido preparo e de baixo custo, permite maior homogeneidade do meio (CALDAS *et al.*, 1998), aumenta absorção de nutrientes e, conseqüentemente, melhora o aproveitamento do meio (LEMOS *et al.*, 2001). Existem vários biorreatores de

imersão temporária, sendo um dos mais conhecidos o sistema RITA[®] desenvolvido por Teisson et al. (1995). Este sistema é composto por um frasco com dois compartimentos, um superior, que contém os explantes, e outro inferior onde fica armazenado o meio de cultura líquido. A frequência e a duração da imersão são controladas pela aplicação programada de ar comprimido no compartimento inferior.

A propagação em larga escala por meio de biorreatores tem sido relatada com sucesso em algumas espécies lenhosas. Scheidt (2008), estudando diferentes sistemas de cultivo para *Melaleuca alternifolia* Cheel, concluiu que, após 21 dias de cultivo *in vitro*, a espécie apresentou maior acúmulo de biomassa no sistema de cultivo de imersão por bolhas quando comparado com o sistema de recipiente de imersão temporária automatizada e com o sistema tradicional (ágar). Este mesmo autor, comparando diferentes sistemas de cultivo para *Eucalyptus saligna* Smith, obteve melhores resultados para acúmulo de biomassa no biorreator de imersão por bolhas na fase de multiplicação quando comparado aos demais sistemas de cultivo. Oliveira (2009), estudando *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na fase de multiplicação *in vitro*, obteve maior ganho em massa fresca e produtividades dos explantes no biorreator RITA[®] aos 35 dias de cultivo quando comparado ao sistema de cultivo semissólido.

A busca por melhores resultados na propagação de determinados materiais genéticos de difícil enraizamento, como, por exemplo, o *Eucalyptus globulus* e seus híbridos, tem justificado as pesquisas no sentido de tornar sua propagação efetiva em nível comercial devido ao grande interesse por parte das empresas de celulose e papel nos atributos concernentes à espécie quanto à excelente morfologia de fibras para a produção de polpa, além da redução na demanda de produtos químicos utilizados no branqueamento da celulose em razão do menor teor de lignina na madeira (DOUGHTY, 2000). Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a multiplicação *in vitro* de gemas de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* em sistema de cultivo semissólido (potes plásticos e tubos de ensaio) e em biorreatores de imersão temporária RITA[®].

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fonte, meio de cultura e condições de cultivo dos explantes

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pertencente à Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

O material vegetal utilizado nesse trabalho foi proveniente de dois clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* (C01 e C16) e de dois clones de *Eucalyptus grandis* X *E. globulus* (C26 e C29), obtidos em fase de multiplicação *in vitro* pela proliferação de gemas axilares em meio de cultura semissólido (Quadro 1). As brotações foram preparadas e inoculadas, sob condições assépticas, em tubos de ensaio de 15 cm x 2,5 cm, contendo 10 ml do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescidos de 800 mgL⁻¹ PVP30 (Polivinilpirrolidona – Synth Ltda), 100 mg. L⁻¹ mio-inositol, 30 g L⁻¹ sacarose e a relação de 0,5 mg L⁻¹ benzilaminopurina (BAP) e 0,01 mg L⁻¹ ácido naftalenoacético (ANA). O pH foi ajustado para 5,8 com KOH (1N) e HCl (1N) antes da adição do ágar e da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 15 minutos. O material vegetal foi estabelecido em prateleiras em sala de cultura a 25° C (± 2° C), fotoperíodo de 16 horas de luz e luminosidade de 80 µmol.m⁻².s⁻¹, fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas durante 14 dias.

Quadro 1 – Clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* X *E. globulus* e seus genitores femininos e masculinos, utilizados nesse estudo.

Clones	Genitor Feminino	Genitor Masculino
	<i>Eucalyptus urophylla</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
C01	U03	G02
C16	U14	G07
	<i>Eucalyptus grandis</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
C26	M17	G07
C29	M18	G11

2.2 Cultivo em meio semissólido x meio líquido

Foram testados três tipos de recipientes constituídos pelos tubos de ensaio, potes plásticos de polipropileno de volume 500ml (Copobras) e biorreator de imersão temporária RITA[®] (Vitropic S/A).

O meio de cultura utilizado foi o MS, contendo 100 mg. L⁻¹ de mio-inositol (Sigma Co.), 800 mg.L⁻¹ de PVP30 (Polivinilpirrolidona – Synth Ltda), 30 g.L⁻¹ de sacarose (Synth Ltda), 0,34 mg.L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina – Sigma[®]), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma[®]), no meio líquido, e 8g.L⁻¹ de ágar brasileiro para o meio semissólido. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C e 1 kg cm⁻¹, por 15 minutos. O meio de cultura foi autoclavado diretamente dentro dos recipientes.

Utilizou-se o volume de 10 mL de meio nos tubos de ensaio e 250 mL de meio para os potes plásticos e biorreator RITA[®]. A frequência de imersão utilizada para o sistema de biorreator foi de três horas por um período de dez segundos e como suporte de apoio para os explantes, utilizou-se papel filtro qualitativo (N^o 1 - Qualy[®]).

O material vegetal foi acondicionado em sala de crescimento a 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 80 μmol m⁻² s⁻¹, fornecidas por tubos fluorescentes branco-frios.

Em cada tubo de ensaio foi colocado um explante no interior do recipiente e nos potes plástico e biorreatores foram colocados três explantes por clone, sendo os materiais genéticos separados no biorreator por papel cartão (Figura 1).



Figura 1 - Brotos apicais dos clones utilizados como explantes iniciais no cultivo em biorreatores de imersão temporária RITA[®] separados por divisória feita de papel cartão.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado no esquema fatorial 3x4, sendo constituído por três tipos de recipientes (tubos de ensaio, pote plástico e biorreator RITA[®]) e quatro clones híbridos de *Eucalyptus globulus* (C01, C16, C26 e C29), composto por três repetições para cada tratamento e três explantes por repetição, avaliados aos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo.

Foram feitas avaliações quanto ao número de brotos por explante, massa fresca dos explantes, massa seca do número de brotos por explante e o grau de hiper-hidricidade. A massa de matéria seca foi medida após a secagem em estufa por sete dias a 55°C. O grau de hiper-hidricidade ao final do período de cultivo foi obtido pela análise visual do explante, atribuindo valores de 0 a 5, em que 0 equivale a não existir hiper-hidricidade e 5 significa alta hiper-hidricidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à taxa de multiplicação dos explantes de clones híbridos de *Eucalyptus globulus* variaram entre os sistemas de cultivo *in vitro* avaliados (Figura 2). O sistema de biorreatores RITA[®] apresentou os maiores valores para os clones C16 e C29, com cerca de 19,8 e 29,3 brotos por explante aos 35 dias de cultivo, respectivamente (Figura 3). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Oliveira (2009), que, ao comparar cultivo em meio líquido e semissólido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na fase de multiplicação *in vitro*, obteve maior ganho em massa fresca e produtividades dos explantes no biorreator RITA[®] aos 35 dias de cultivo. McAlister *et al.* (2005) também encontraram resultados promissores no cultivo de clones de *Eucalyptus* em sistema RITA[®]. Estes autores obtiveram resultados superiores aos encontrados no cultivo em ágar, com maior taxa de multiplicação, além de o sistema RITA[®] promover grande proliferação de brotos dos 14 aos 18 dias, enquanto no sistema ágar, a multiplicação foi alcançada somente dos 25 aos 28 dias de cultivo.

Entretanto, para os clones C01 e C26 avaliados neste estudo, obteve-se baixo número de brotos por explante em todos os sistemas de cultivo utilizados, indicando comportamento diferenciado entre os materiais genéticos.

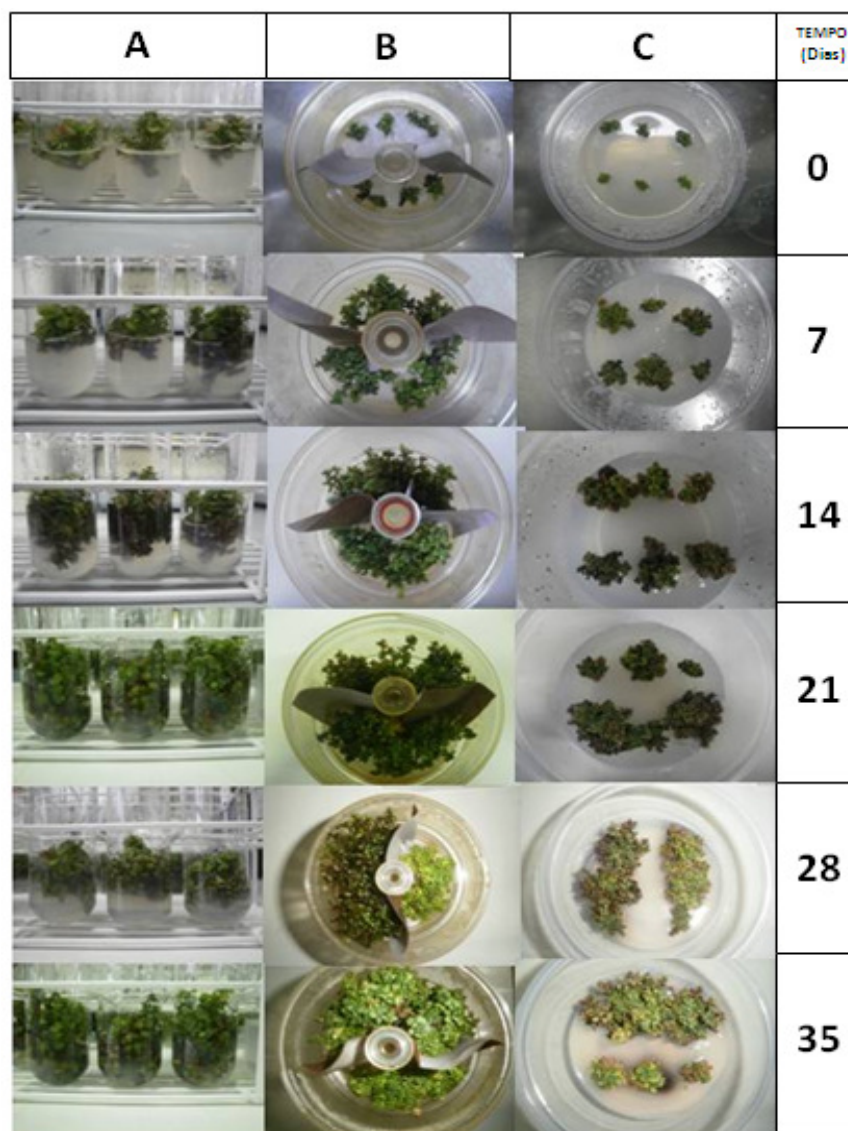


Figura 2 - Cultivo de clones híbridos de *Eucalyptus globulus* (C01 e C16) em tubos de ensaio (A), biorreator RITA[®] (B) e potes plásticos (C), aos 0, 7, 14, 21, 28, e 35 dias de cultivo.

Um fator que favorece o crescimento dos explantes nos biorreatores é a constante renovação do ar durante o período de transferência da solução nutritiva, eliminando os possíveis gases prejudiciais produzidos pelo metabolismo das plantas, que normalmente se acumulam, e pelo maior contato do explante com o meio de cultura, aumentando a absorção de nutrientes e assim melhor aproveitamento do meio (LEMOS et al., 2001).

Apesar de os materiais genéticos estatisticamente apresentarem comportamento quadrático, o período de cultivo utilizado neste estudo não foi suficiente para determinar o momento da queda na taxa de crescimento e produtividade dos explantes para algumas variáveis.

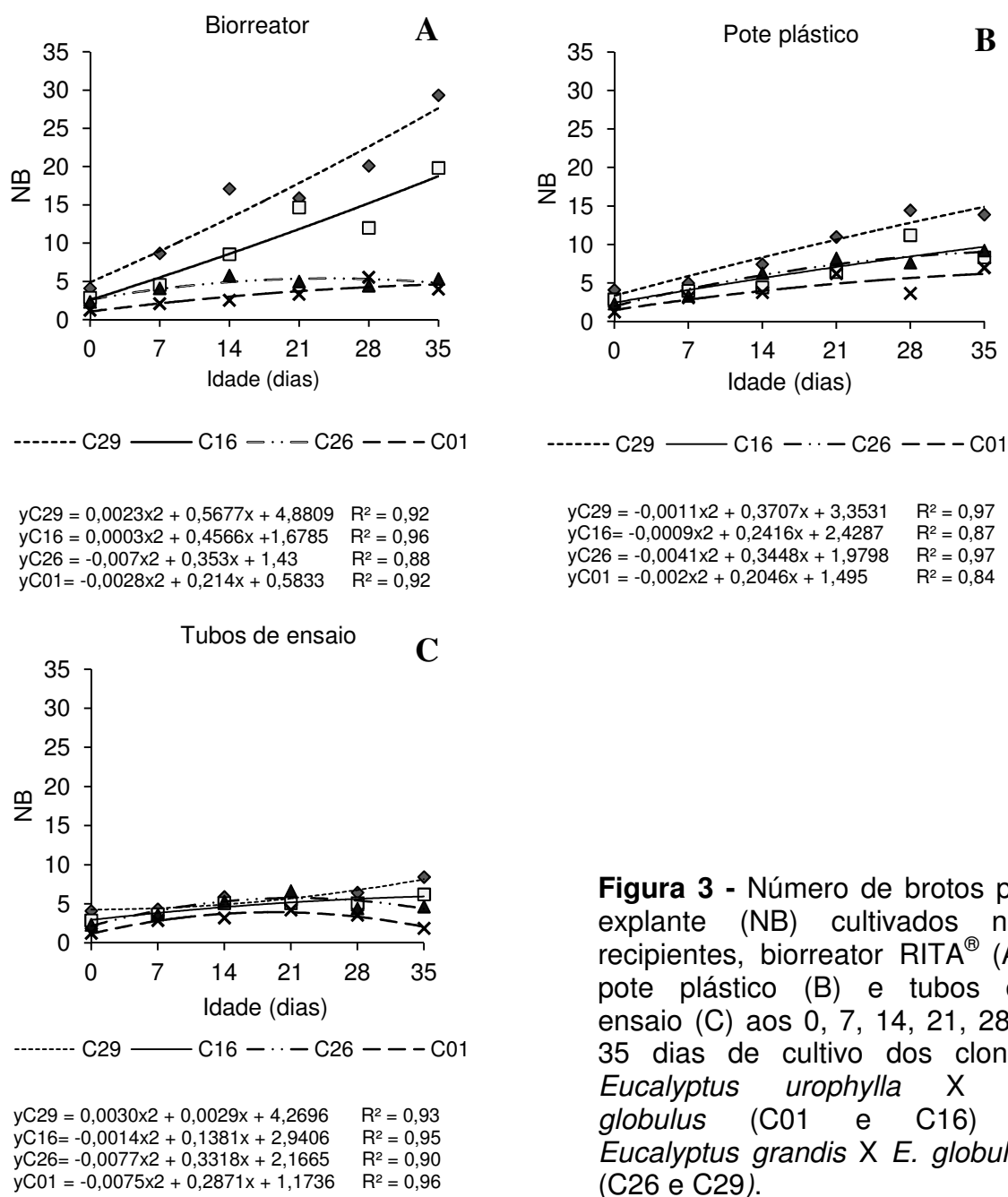


Figura 3 - Número de brotos por explante (NB) cultivados nos recipientes, biorreator RITA[®] (A), pote plástico (B) e tubos de ensaio (C) aos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo dos clones *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* (C01 e C16) e *Eucalyptus grandis* X *E. globulus* (C26 e C29).

Em geral, os tratamentos estudados não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para a característica massa fresca por explante e massa seca dos brotos alongados por explante, no entanto, ao comparar os clones com os tipos de recipientes, independentemente do período de cultivo, o C29 apresentou estatisticamente menores médias de massa fresca nos tubos de ensaio (Figura 4), não sendo observado este comportamento para os demais clones. Para a característica massa seca do número de brotos, o biorreator RITA[®] e os potes plásticos proporcionaram maiores ganho para os clones C16 e C29 (Figura 5).

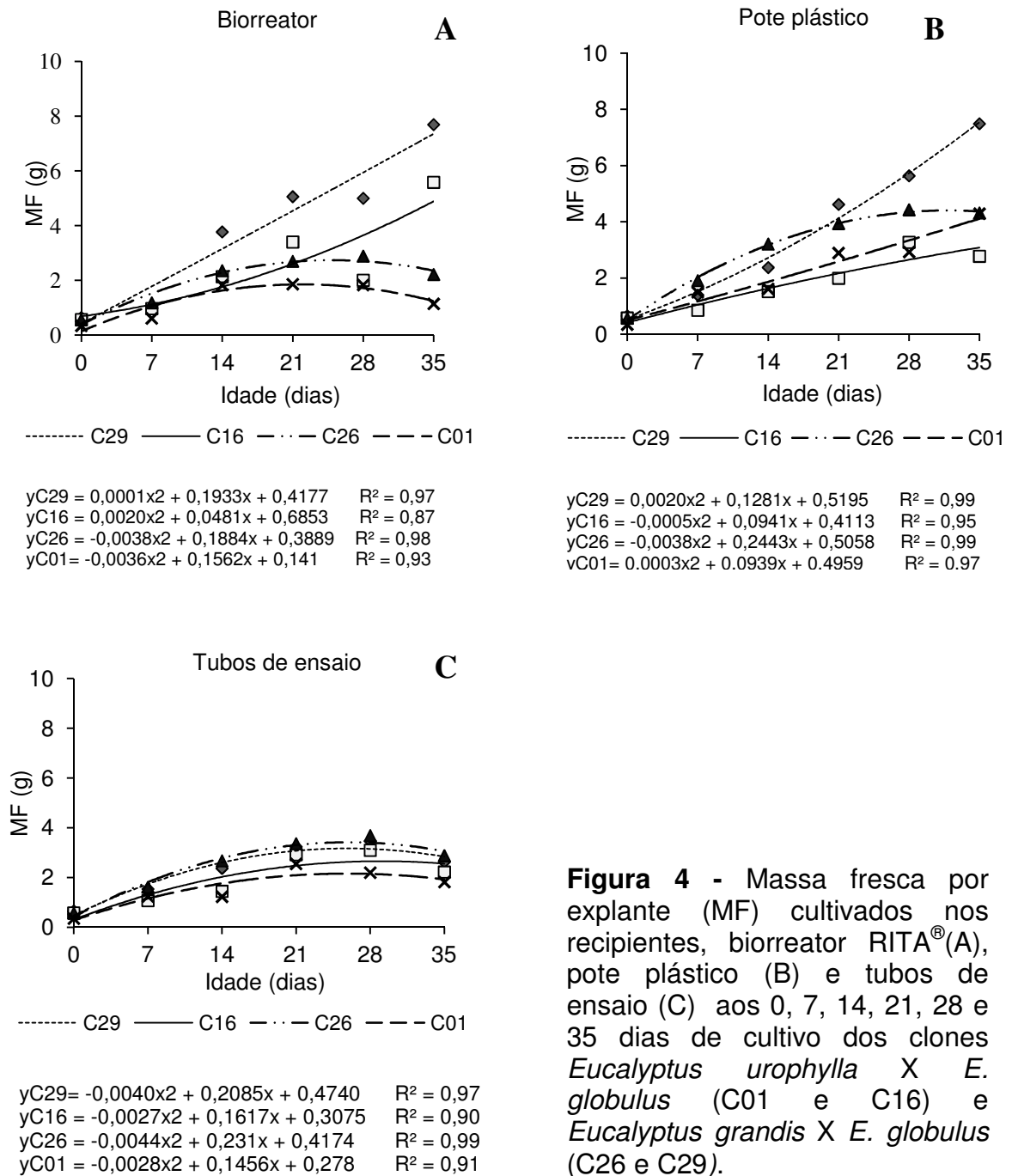


Figura 4 - Massa fresca por explante (MF) cultivados nos recipientes, biorreator RITA[®](A), pote plástico (B) e tubos de ensaio (C) aos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo dos clones *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* (C01 e C16) e *Eucalyptus grandis* X *E. globulus* (C26 e C29).

Entretanto, Oliveira (2009) obteve maiores médias de ganho em massa fresca e número final de brotos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* no biorreator BIT[®] e potes plásticos, quando comparado ao biorreator RITA[®].

A diferença encontrada pode ser atribuída à especificidade nutricional do meio de cultura com a espécie, progênie e/ou clone, ao tamanho dos explantes utilizados, e ainda, de acordo com Correia *et al.* (1995) aos fatores ambientais de crescimento como aeração no meio de cultura e controle de seu fluxo, sendo que

o termoperíodo, a qualidade e intensidade de luz e fotoperíodo podem estar influenciando o crescimento e desenvolvimento das gemas.

Segundo Etienne e Berthouly (2002) o volume dos frascos também interfere no desenvolvimento das plântulas, geralmente, quanto maior o volume dos recipientes, melhor é o crescimento e multiplicação dos explantes.

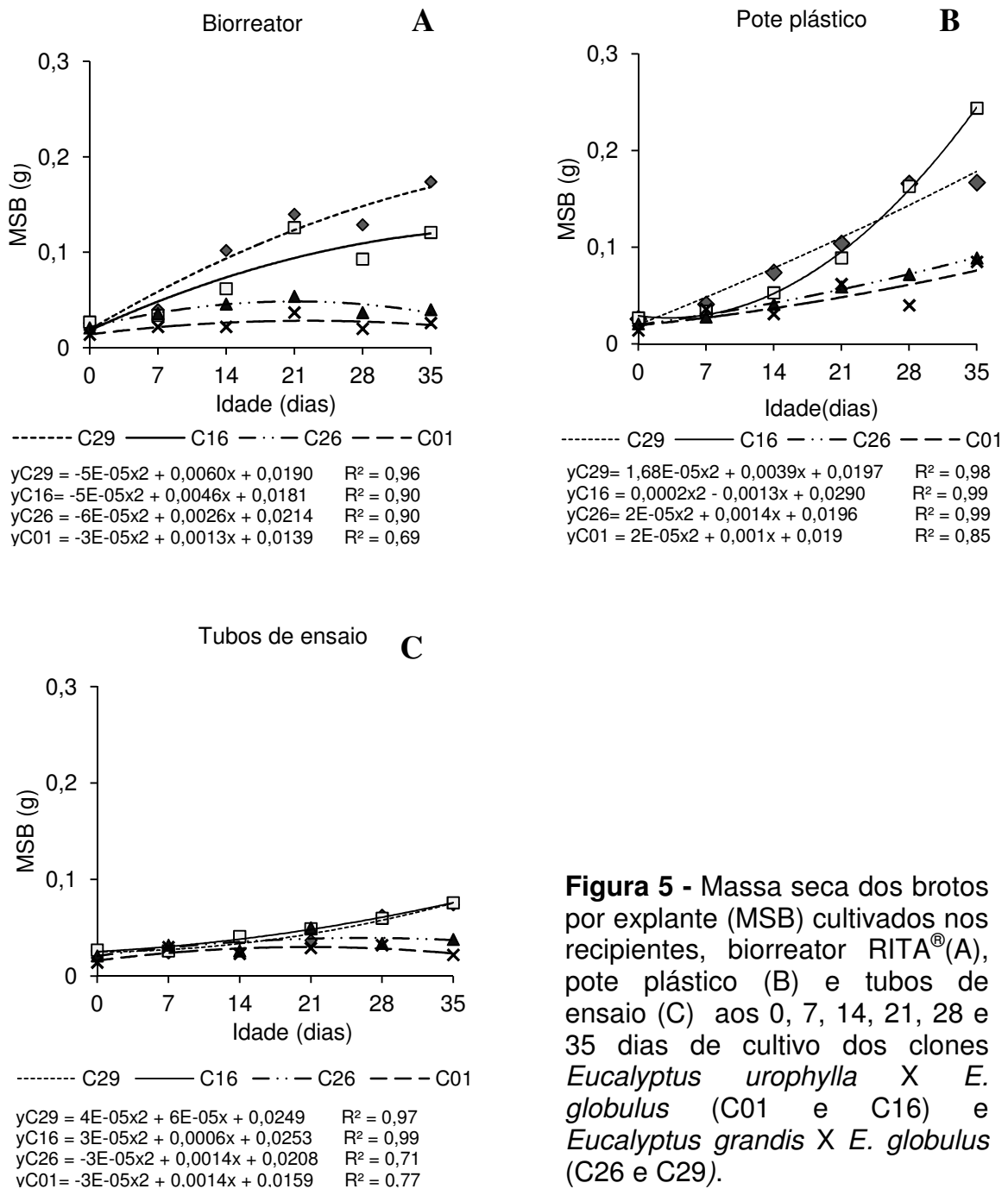
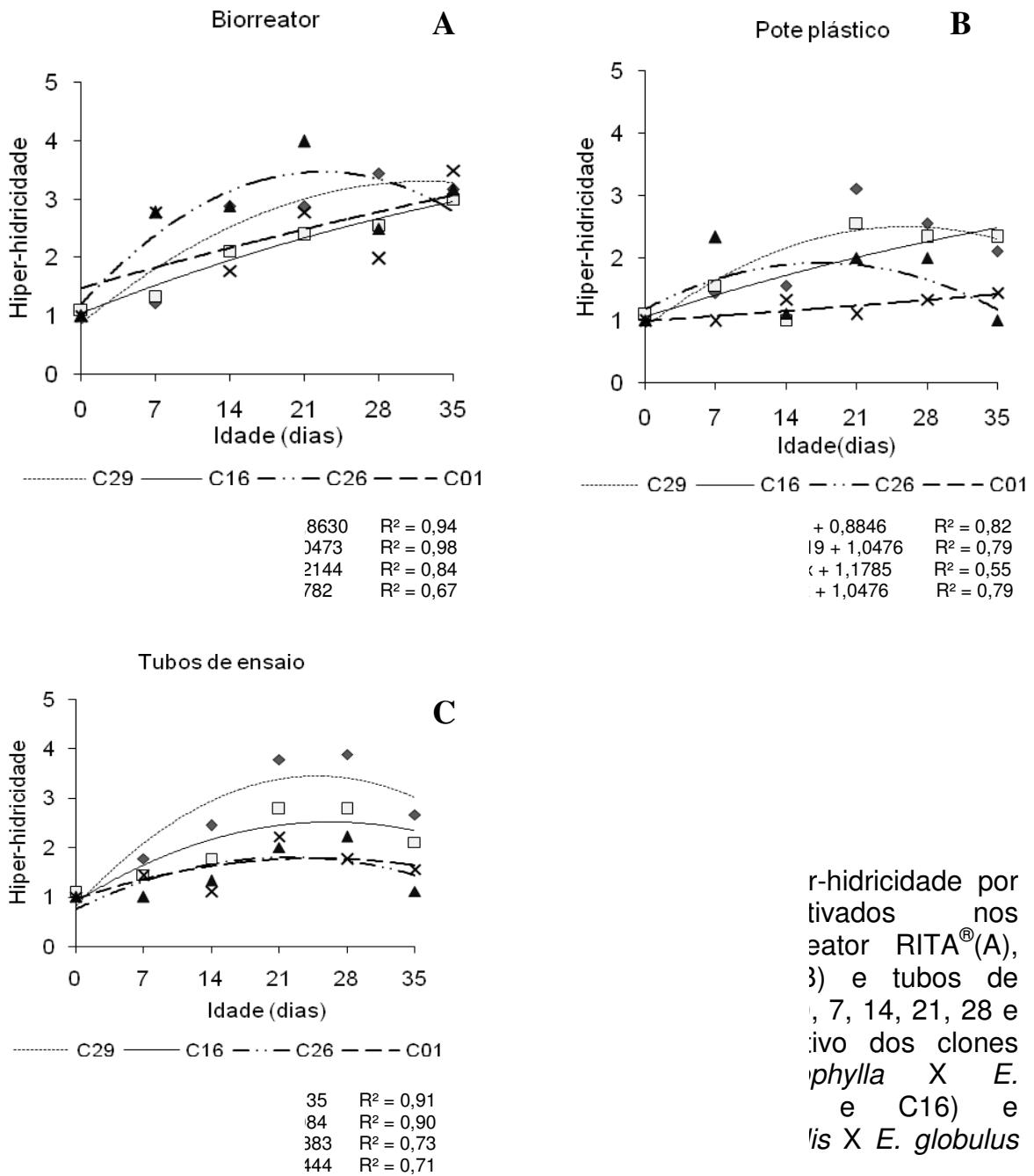


Figura 5 - Massa seca dos brotos por explante (MSB) cultivados nos recipientes, biorreator RITA[®](A), pote plástico (B) e tubos de ensaio (C) aos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo dos clones *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* (C01 e C16) e *Eucalyptus grandis* X *E. globulus* (C26 e C29).

Para a característica hiper-hidricidade, foi observado que aos 35 dias de idade ela foi superior no sistema de biorreator para os clones C01, C16 e C29 quando comparado ao sistema de cultivo com ágar (Figura 6).

Oliveira (2009) obteve taxas muito elevadas de hiper-hidricidade para cultivo de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em sistema RITA®, próximas a 100%, no entanto, não foi percebida esta desordem fisiológica nas plantas cultivadas em meio semissólido. Whitehouse *et al.* (2002) obtiveram sucesso limitado na multiplicação de gemas de *Eucalyptus*, utilizando meio líquido devido, à hiper-hidricidade dos explantes.



er-hidricidade por
tivados nos
eator RITA®(A),
) e tubos de
, 7, 14, 21, 28 e
ivo dos clones
rophylla X *E.*
e C16) e
lis X *E. globulus*

Plantas hiper-hídricas (Figura 7) têm aspecto translúcido, com folhas espessas, frágeis, muito alongadas e enroladas ou enrugadas, além de caules engrossados, com entrenós mais curtos que os de plantas normais. Brotos hiperídricos apresentam menor formação de raízes ou não enraízam e, em geral, não sobrevivem à aclimatização e, quando sobrevivem, originam plantas malformadas (GASPAR,1991; ZIV,1991; DEBERGH et. al. 1992; KEVERS et al., 2004).



Figura 7- Explantes sem hiper-hidricidade (A) e explantes com alto grau de hiper hidricidade (B) do clone *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* (C16).

Alguns autores como Ziv (1995) e Penchel et al. (2007) consideram a hiper-hidricidade o maior problema das plantas cultivadas em culturas líquidas, sendo conseqüentemente, um obstáculo para o sucesso do uso dos biorreatores na propagação de plantas.

Várias estratégias têm sido utilizadas para prevenir esta desordem fisiológica como o aumento do ágar ou de outro agente gelificante que afeta a disponibilidade de água e de vários componentes do meio (DEBERGH et al., 1992; CASANOVA et al., 2008), o tipo de vedação e/ou aumento das trocas gasosas (PARK et al., 2004), a utilização de compostos antivitrificantes como EM2 (WHITEHOUSE et al., 2002), a alteração da composição mineral dos meios (YADAV et al., 2003), entre outras.

4. CONCLUSÕES

Os cultivos no biorreator RITA[®] e em potes plásticos promoveram os maiores ganhos em número de brotos e massa fresca por explante respectivamente, independentemente do período de cultivo.

Houve diversidade de resposta dos clones para as variáveis avaliadas indicando o efeito do material genético quanto à propagação vegetativa *in vitro*.

Em todos os sistemas de cultivo, ocorreu a hiper-hidricidade, sendo os valores mais altos observados para os clones C01, C16 e C29, quando cultivados no biorreator Rita[®].

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E.. Meios nutritivos. 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.

CASANOVA E, MOYSSET L., and TRILLAS M.I. Effect of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. **Biologia Plantarum**. 52(1): 1-8, 2008.

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

DEBERGH P., AITKEN-CHRISTIE J., COHEN D., GROUT B., VON ARNOLD S., ZIMM ERMAN R., ZIV M. Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 30: 135-140, 1992.

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.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. **Pant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.215-231, 2002.

ETIENNE, H.; DECHAMP, E.; BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B. Bioreactors in coffee micropropagation. **Brazilian Journal Plant Physiol.** v. 18, p. 45-54, 2006.

GASPAR, T. Vitrification in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry – High-tech and micropropagation I.** Berlin: Springer, 1991. v. 17, p. 116-126.

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.

KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 77: 181-191, 2004.

LEMONS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M.C.; OLIVEIRA, J. G. L.; MAGALHÃES, V. S. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura.** v. 23, p. 482-487, 2001.

LORENZO, J. C.; GONZALEZ, B. L.; ESCALONA, M.; TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BARROTO, C. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 54, p. 197-200, 1998.

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 Forest (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 347-358, 2005.

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.

OLIVEIRA, M. L. **Micropropagação de clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreatores de imersão temporária.** 2009. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PARK, S.W.; JEON, J.H.; KIM, H.S; PARK, Y.M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments of the hyperhydricity of potato shoots in vitro. **Scientia Horticulturae**, 99: 199-205, 2004.

PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: Borém, A. (Ed.). **Biocnologia Florestal.** Viçosa: UFV, 2007. cap. 4, p. 75-92.

REIS, J. P.; MORAIS, P. B.; PENCHEL, R.; HENRIQUE, A. Micropropagação de eucalipto no sistema de imersão temporária. In: Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 1., 2003, Lavras. **Anais...** p. 276.

SCHEIDT, G. N. **Desenvolvimento e validação de um biorreator do tipo imersão por bolhas para micropropagação de plantas**. 2008. 89p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Paraná.

TEISSON, C.; ALVARD, D.; BERTHOULY, M.; COTE, F.; ESCALANT, J. V.; ETIENNE, H. *In vitro* culture by temporary immersion: a new device. **Plantations**, n. 2, v. 5, p. 32-33, 1995.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 24, p. 36-41, 2002.

WHITEHOUSE, A. B.; MARKS, T. R.; EDWARDS, G. A. Control of hyperhydricity in *Eucalyptus* axillary shoot cultures grown in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, p. 245-252, 2002.

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

YADAV, M. K.; GAUR, A. K.; GARG, G. K.; Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 72: 153-156, 2003.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.). **Micropropagation, technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 45-69.

Influência da razão N(NO₃⁻): N(NH₄⁺) na multiplicação e alongamento *in vitro* de brotações de clones híbridos de *Eucalyptus globulus* em biorreator de imersão temporária

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos entre as fontes de nitrato e amônio no meio de cultura nas fases de multiplicação e alongamento *in vitro* para micropropagação de clones híbridos de *Eucalyptus globulus* em biorreator de imersão temporária RITA[®]. Foram estudadas três razões (1:1, 2:1 e 3:1) entre as fontes de nitrogênio nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺) para a fase de multiplicação e duas razões (1:1 e 2:1) para a fase de alongamento *in vitro*. O material vegetal utilizado foi constituído de brotos apicais de dois clones de *Eucalyptus grandis* X *E. globulus* e dois clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus*. Ao final de 21 dias constatou-se que não houve efeito das razões nitrato amônio nas fases de multiplicação e alongamento *in vitro*. Em geral, as culturas em biorreator RITA[®] apresentaram alta hiper-hidricidade o que influencia diretamente na obtenção de brotos mais vigorosos aptos a enraizar em condições *ex vitro*.

Palavras-chave: Micropropagação, meio de cultura líquido, propagação *in vitro*.

Influence of the ratio N (NO₃⁻): N (NH₄⁺) in the multiplication and elongation *in vitro* shoots of hybrid clones of *Eucalyptus globulus* in temporary immersion bioreactor

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the effects of the sources of nitrate and ammonium nitrogen in the phases of multiplication and elongation *in vitro* by micropropagation of hybrid clones of *Eucalyptus globulus* in a bioreactor of temporary immersion RITA[®]. We studied three ratios (1:1, 2:1 and 3:1) between the sources of nitrate nitrogen (NO₃⁻) and ammonium (NH₄⁺) to the stage of multiplication and two ratios (1:1 and 2:1) to phase of elongation *in vitro*. The plant material used were apical shoots of two clones of *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* and two clones of *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus*. At the end of 21 days was found that there was no effect of ammonium nitrate relationships in multiplication and elongation phases. In general, the RITA[®] bioreactor cultures showed high hyper-hydro which directly influences the attainment of more vigorous shoots capable of rooting in *ex vitro* conditions.

Key words: micropropagation, liquid culture medium, *in vitro* propagation.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* tem uma enorme variedade de espécies adaptadas às mais diferentes condições de clima e solos, sendo comumente utilizado para atender a diversas finalidades madeireiras e não madeireiras. O grande potencial das espécies de *Eucalyptus* em produzir madeira e fibra para polpa e papel fez que o gênero ganhasse grande importância comercial, tornando-se alvo da propagação *in vitro* e manipulação genética (MERKLE e NAIRN, 2005). Entre as espécies existentes, a hibridação de *Eucalyptus globulus* com outras espécies desse gênero tem apresentado características tecnológicas de madeira de excelente qualidade para a fabricação de celulose, no entanto, apresenta recalcitrância ao enraizamento, dificultando sua propagação a nível comercial.

Com a evolução das técnicas de propagação de plantas, a micropropagação tem sido considerada ferramenta potencialmente importante, visto ser uma alternativa recomendável quando existe alto grau de maturação do material genético, 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). Novos equipamentos têm sido desenvolvidos para a produção de mudas *in vitro*, em que se tem destacado o sistema de biorreatores.

Os biorreatores de imersão temporária, como o sistema RITA[®], ganharam popularidade principalmente pela simplicidade e elevada taxa de produção com a mínima ocorrência de desordens fisiológicas em comparação com outros tipos de biorreatores (AFREEN, 2006). São eficazes, pois consistem em um sistema com certo grau de automação, possibilitando redução de mão-de-obra e alta produção na multiplicação de plantas (PENCHEL *et al.*, 2007), entretanto, vários são os fatores que influenciam a micropropagação em biorreatores como o uso do meio líquido, o tipo e a aeração do recipiente, a atmosfera gasosa do frasco de cultivo e principalmente as condições de manejo da cultura como a composição mineral e orgânica do meio, reguladores de crescimento e recalcitrância vegetal (ADELBERG e FÁRI, 2010).

Entre os sais utilizados no preparo do meio de cultura, o nitrogênio é um dos principais nutrientes essenciais e ativos, sendo absorvido, principalmente, sob a forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+). Por ser constituinte de várias

biomoléculas essenciais, como aminoácido, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outros, sua assimilação se dá em diversos processos metabólicos da planta (SAKUTA *et al.*, 1987). As fontes de nitrogênio são de grande importância tanto no crescimento quanto na diferenciação de células e tecidos cultivados *in vitro* (VAN BEUSICHEM *et al.*, 1988).

Autores como Grattapaglia e Machado (1998) e Araujo *et al.* (2009), relatam que a combinação de amônio e nitrato são responsáveis por estimular o crescimento de várias espécies de plantas *in vitro*. Entretanto, o efeito benéfico de ambas as formas de nitrogênio (NO_3^- e NH_4^+) ainda não é bem entendido (LU *et al.*, 2009; MARTÍNEZ *et al.*, 2010).

Embora o uso de biorreatores na propagação vegetativa de plantas lenhosas ainda se restrinja a um pequeno número de trabalhos e espécies, Castro e Gonzales (2002), ao cultivarem *Eucalyptus grandis* em biorreatores de imersão temporária, obtiveram melhor taxa de multiplicação de brotos axilares, reduzindo à metade as concentrações de nitrato de amônio e nitrato de potássio do meio básico MS. Resultados obtidos por Oliveira (2009) demonstram que o cultivo de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreatores de imersão temporária, em meio com altas concentrações de amônio, tendo proporcionado aspecto visual com menor vigor dos explantes e maior ocorrência de hiper-hidricidade.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo estudar a influência das diferentes razões entre as fontes de nitrogênio no meio de cultura MS em clones híbridos de *Eucalyptus globulus*, na fase de multiplicação e alongamento *in vitro* em biorreator de imersão temporária RITA[®].

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fonte, meio de cultura e condições de cultivo dos explantes

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pertencente à Universidade Federal de Viçosa (UFV) localizado no município de Viçosa, Minas Gerais.

O material vegetal utilizado para cultivo nos biorreatores foi proveniente de dois clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* (C01 e C16) e dois clones de *Eucalyptus grandis* X *E. globulus* (C26 e C29), obtidos em fase de multiplicação *in vitro* pela proliferação de gemas axilares em meio de cultura semissólido. As brotações foram preparadas e inoculadas, sob condições assépticas, em tubos de ensaio de 15 cm x 2,5 cm, contendo 10 ml do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) acrescidos de 800 mgL⁻¹ PVP30 (Polivinilpirrolidona – Synth Ltda), 100 mgL⁻¹ mio-inositol (Sigma Co) , 30 g L⁻¹ sacarose (Synth Ltda), 8 g L⁻¹ de ágar brasileiro e a relação de 0,5 mg L⁻¹ benzilaminopurina (BAP – Sigma Co) e 0,01 mg L⁻¹ ácido naftalenoacético (ANA – Sigma Co). O pH foi ajustado para 5,8 com KOH (1N) e HCl (1N) antes da adição do ágar e da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C por 15 minutos. O material vegetal foi estabelecido em prateleiras em sala de cultura a 25° C (± 2° C), fotoperíodo de 16 horas de luz e luminosidade de 80 µmol m⁻²s⁻¹, fornecidas por lâmpadas fluorescentes branco-frias.

2.2. Razões de nitrogênio: nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺)

Foram avaliadas três diferentes razões (1:1, 2:1 e 3:1) entre as fontes de nitrogênio nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺) (Quadro 1) no meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) na fase multiplicação e duas razões (1:1 e 2:1) de nitrato (NO₃⁻) e amônio(NH₄⁺) na fase de alongamento, em sistema de imersão temporária RITA[®] (Vitropic S/A) . Estas relações foram obtidas pela adição de diferentes sais sem modificar a concentração dos outros íons no meio de cultura.

Quadro 1 - Concentração dos íons N(NO₃⁻), N(NH₄⁺) e de N total (mmol L⁻¹) nas três razões N(NO₃⁻): N(NH₄⁺) estudadas no meio de cultura MS para cultivo de *Eucalyptus grandis* X *E. globulus* e *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* em biorreatores de imersão temporária RITA[®].

	1 / 1	2 / 1	3 / 1
Razão N(NO ₃ ⁻):N (NH ₄ ⁺)		-----(mg/L ⁻¹)---	
		--	
COMPOSIÇÃO	MS Original	MS Modificado	MS Modificado
N(NO ₃ ⁻)	29,25	39,00	43,90
N(NH ₄ ⁺)	29,25	19,50	14,60
N Total	58,50	58,50	58,50

Como explantes iniciais foram utilizados brotos apicais de tamanho uniforme de dois clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* (C01 e C16) e dois clones de *Eucalyptus grandis* X *E. globulus* (C26 e C29) estabelecidos *in vitro* preparados aproximadamente 14 dias antes de sua utilização nos biorreatores RITA[®], permanecendo em tubos de ensaio contendo meio MS como descrito no item 2.1.

Ao meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) para a fase de multiplicação, foram acrescidos 800 mg L⁻¹ PVP30 (Polivinilpirrolidona – Synth Ltda), 100 mg L⁻¹ mio-inositol, 30 g L⁻¹ sacarose, 0,5 mg L⁻¹ benzilaminopurina (BAP) e 0,01 mg L⁻¹ ácido naftalenoacético (ANA), com pH ajustado para 5,8 com KOH (1N) e HCl (1N), antes da esterilização em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 15 minutos. Para o meio de alongamento se deu o mesmo procedimento alterando apenas a concentração de BAP para 0,05 mg L⁻¹ benzilaminopurina e 0,50 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) .

O meio de cultura juntamente com as divisórias feitas de papel cartão, foram autoclavadas dentro dos recipientes dos biorreatores (Figura 1).



Figura 1- Brotos apicais dos clones utilizados como explantes iniciais no cultivo em biorreatores de imersão temporária RITA[®] separados por divisória feita de papel cartão.

Utilizou-se o volume de 250 mL de meio por recipiente. A frequência de imersão utilizada foi de três horas por um período de dez segundos e como suporte de apoio para os explantes utilizou-se papel filtro qualitativo (N^o 1 - Qualy[®]).

O material vegetal foi acondicionado em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fornecido por tubos fluorescentes branco-frios.

Para a fase de multiplicação, o delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, no esquema fatorial 3x4, sendo estudado o efeito das diferentes razões nitrato/amônio (1:1; 2:1 e 3:1) em quatro clones híbridos de *Eucalyptus globulus* (C01, C16, C26 e C29) composto por quatro repetições, sendo um explante por repetição. Na fase do alongamento *in vitro*, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, sendo estudadas duas razões (1:1 e 2:1) para dois clones (C16 e C29) e seis repetições por tratamento, cada repetição constituída por três explantes.

Ao final de 21 dias foram obtidas por pesagem a massa fresca do explante, a massa fresca do número de brotos por explante e a massa seca dos brotos por explante. Para a contagem do número de brotos por explante, na fase de multiplicação, foram considerados brotos maiores que 0,5 cm e na fase de alongamento, brotos maior que 2,0 cm. A massa seca dos brotos foi medida após a secagem em estufa por sete dias a 55°C . O grau de hiper-hidricidade ao final do período de cultivo foi obtido pela análise visual do explante atribuindo valores de “0” a “5”, em que “0” equivale não existe hiper-hidricidade e “5” significa alta hiper-hidricidade.

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste Tukey. Para a realização dos procedimentos estatísticos, utilizou-se o programa Statistica 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Razões $\text{N}(\text{NO}_3^-):\text{N}(\text{NH}_4^+)$ na fase de multiplicação *in vitro*

Observou-se que os clones apresentaram diferenças acentuadas para uma mesma razão de nitrato/amônio, indicando a variabilidade genética dos materiais. Entretanto, para o clone C16, melhores resultados foram encontrados para número de brotos por explante na razão 2:1 de nitrato/amônio e para o clone 29 nas razões 1:1 e 2:1 de nitrato e amônio (Figura 2).

No geral, a produção média de número de brotos por explante foi superior à encontrada por Oliveira (2009) na multiplicação de gemas de *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla*, que obteve uma média 7,08 brotos por explante na razão 3:1 ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$), seguido de 4,95, na razão 2:1 ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$), e de 4,91, na razão 1:1 ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$).

Quando o nitrogênio, ele é fornecido nas formas de nitrato e de amônio. Inicialmente o nitrogênio na forma nítrica é consumido mais rapidamente e, posteriormente, a forma amoniacal se torna disponível para ser consumida pelo explante. Apesar da preferência da planta pelo nitrato, em trabalho realizado com *Cycas revoluta* (RINALDI, 1999), não se obteve indução de brotação quando ela foi cultivada em meio contendo apenas nitrato, ficando evidenciado que o balanço entre os íons nitrato e amônio pode interferir na taxa de multiplicação das plantas (SANTOS-SEREJO et al.,2006)

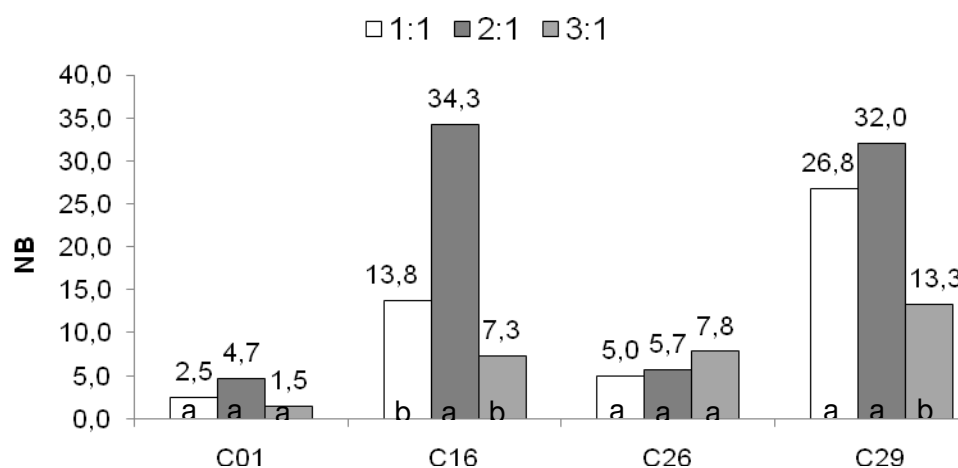


Figura 2 - Número de brotos por explante (NB) cultivados em meio de cultura para multiplicação, nas três razões nitrato/amônia estudadas (1:1, 2:1 e 3:1) aos 21 dias de cultivo dos clones *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* (C01 e C16) e *Eucalyptus grandis* X *E. globulus* (C26 e C29) em biorreatores de imersão temporária RITA[®]. Tratamentos com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Em relação à massa fresca por explante e à massa fresca e seca dos brotos por explante (Figuras 3, 4 e 5), elas foram superiores na razão 2:1 ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) para o clone C16 e para o clone C29 nas razões 1:1 e 2:1 ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$).

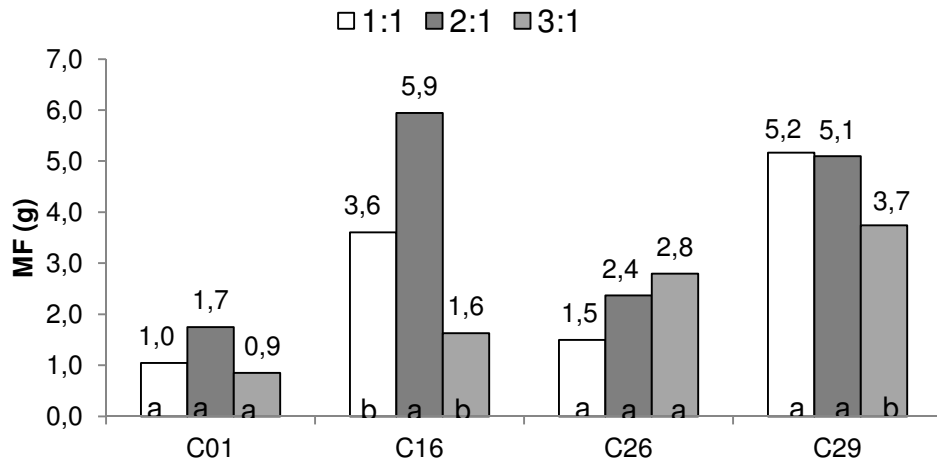


Figura 3 - Massa fresca por explante (MF) cultivados em meio de cultura para multiplicação, nas três razões nitrato/amônia estudadas (1:1, 2:1 e 3:1) aos 21 dias de cultivo dos clones *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* (C01 e C16) e *Eucalyptus grandis* X *E. globulus* (C26 e C29) em biorreatores de imersão temporária RITA[®]. Tratamentos com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

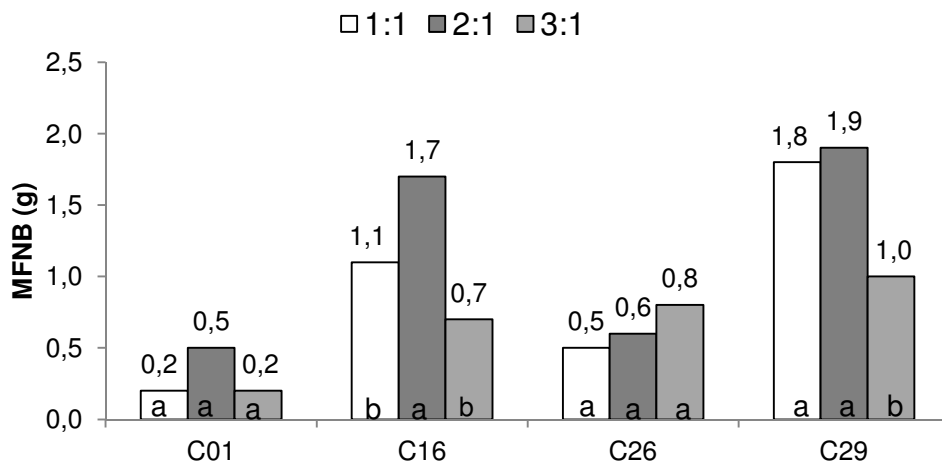


Figura 4 - Massa fresca dos brotos por explante (MFNB) cultivados em meio de cultura para multiplicação, nas três razões nitrato/amônia estudadas (1:1, 2:1 e 3:1) aos 21 dias de cultivo dos clones *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* (C01 e C16) e *Eucalyptus grandis* X *E. globulus* (C26 e C29) em biorreatores de imersão temporária RITA[®]. Tratamentos com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

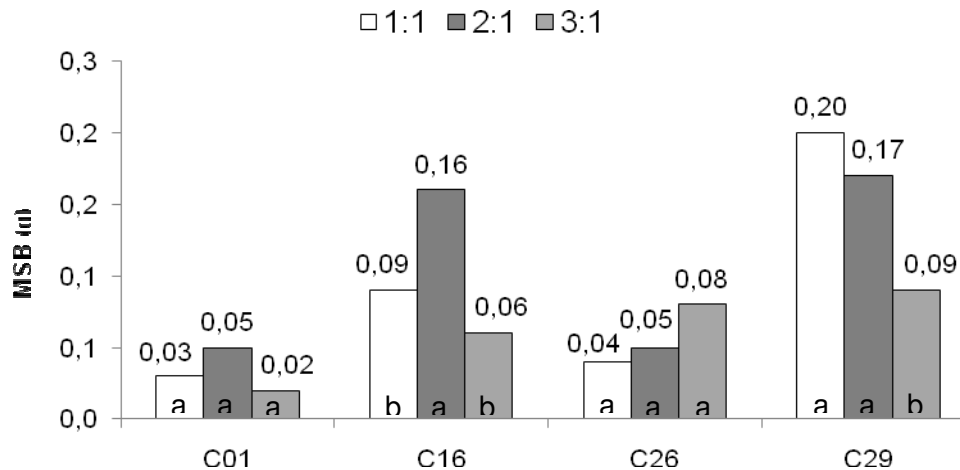


Figura 5 – Massa seca dos brotos por explante (MSNB) cultivados em meio de cultura para multiplicação, nas três razões nitrato/amônia estudadas (1:1, 2:1 e 3:1) aos 21 dias de cultivo dos clones *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* (C01 e C16) e *Eucalyptus grandis* X *E. globulus* (C26 e C29) em biorreatores de imersão temporária RITA[®]. Tratamentos com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Para a característica hiper-hidricidade (Figura 6), as razões de nitrogênio nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) (1:1, 2:1 e 3:1) não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) entre os tratamentos, sendo observado alto grau de hiper-hidricidade na maioria dos clones estudados, exceto para o clone C29, que apresentou menores valores médios de hiper-hidricidade na fase de multiplicação.

Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Oliveira (2009), que também não encontrou diferença estatística ($p > 0,05$) entre as razões nitrato/amônio (3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e 1:3) aos 21 dias de cultivo do híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* para a característica hiper-hidricidade no sistema RITA[®].

Brand (1993) observou que o aumento na concentração de nitrato de amônio ao meio de cultura fez aumentar linearmente a hiper-hidricidade, a concentração de nitrato e de nitrogênio total nos tecidos, o peso fresco e seco dos explantes e o número de brotos no cultivo de *Amelanchiers arborea*. Entretanto, observou-se neste estudo que para clones híbridos de *Eucalyptus globulus* avaliados, a hiper-hidricidade está relacionada ao tipo de material

genético do que propriamente ao aumento na concentração de nitrato de amônio no meio de cultura.

Segundo Gaspar *et al.* (2002) e Xavier *et al.* (2009), a hiper-hidricidade em brotações micropropagadas pode ser ocasionada por uma série de fatores que são responsáveis por ocasionar estresses em nível celular. 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 para os materiais avaliados no presente estudo.

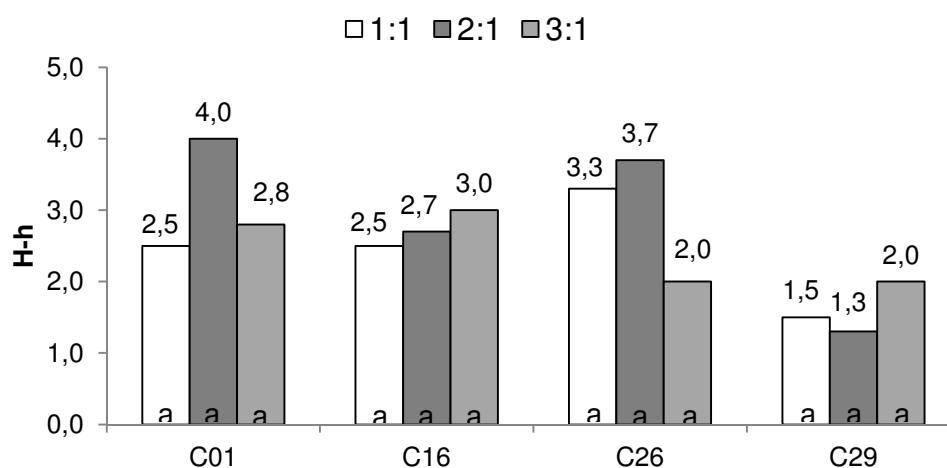


Figura 6 – Hiper-hidricidade (H-h) cultivados em meio de cultura para multiplicação, nas três razões nitrato/amônia estudadas (1:1, 2:1 e 3:1) aos 21 dias de cultivo dos clones *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* (C01 e C16) e *Eucalyptus grandis* X *E. globulus* (C26 e C29) em biorreatores de imersão temporária RITA[®]. Tratamentos com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

3.2. Razões $N(NO_3^-):N(NH_4^+)$ na fase de alongamento *in vitro*

Na fase de alongamento, não houve diferença na produtividade dos explantes em relação à utilização de diferentes razões de nitrato e de amônio estudados para os clones avaliados (Tabela 1). Independentemente do tratamento aplicado observou-se que para os híbridos de *Eucalyptus globulus* houve em média 39% de brotos alongados, enquanto Oliveira (2009) ao utilizar a

concentração de sais diminuída pela metade em *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* no sistema RITA[®], obteve em média 13% de brotos alongados, ou seja, brotos maiores que 2 cm de comprimento.

Os brotos alongados apresentaram alto grau de hiper-hidricidade, tendo provocado morfologia atípica de *Eucalyptus*, com folhas curvadas, espessas, quebradiças e de tamanho reduzido, apresentando dificuldades para enraizamento. Para Oliveira (2009), a hiper-hidricade não foi um obstáculo para o alongamento dos brotos de *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla*, não tendo ocorrido sintomas deste fenômeno nas plantas nesta fase do cultivo.

Neste estudo, o clone C29 obteve alto grau de hiper-hidricidade. Resultado semelhante foi encontrado por Oliveira (2011), que, estudando este mesmo clone na fase de alongamento em sistema de tubos de ensaio, também apresentou uma alta hiper-hidricidade.

Tabela1 – Massa fresca por explante (MF), número de brotos por explante(NB), número de brotos maior que 2cm (NB>2cm), massa fresca do número de brotos maior que 2 cm (MFNB>2cm) e hiper-hidricidade(H-h) dos clones de *Eucalyptus urophylla* X *E. globulus* (C16) e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C29), em função da relação nitrato/amônio utilizada.

Clones	Relação NO ₃ ⁻ :NH ₄ ⁺	MF	NB	NB>2cm	MFNB>2cm	H-h
C16	1:1	3,9a	22,3a	9,7a	1,1a	2,5a
	2:1	3,0a	20,5a	6,1a	0,6a	2,2a
C29	1:1	5,0a	20,7a	9,3a	0,8a	3,5a
	2:1	4,9a	25,7a	10a	0,6a	3,1a

De acordo com Picolli *et al.* (2008), a hiper-hidricidade afeta a anatomia, a morfologia e a fisiologia das plantas, impossibilitando sua aclimação. Bertoni *et al.* (2006) descrevem que várias hipóteses têm sido lançadas para explicar esta disfunção, entre elas destacam-se o excesso de nutrientes minerais, elevadas concentrações de citocininas, tipo e concentração do agente gelificante, alto potencial hídrico e/ou uma atmosfera de elevada umidade relativa e tipo de frasco.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, não houve diferença entre as razões de nitrogênio nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) (1:1, 2:1 e 3:1) utilizado na fase de multiplicação e alongamento, exceto para o clone C16, que, na fase de multiplicação, obteve maior crescimento e produtividade na razão 2:1(NO_3^-) : (NH_4^+).

Os quatro clones respondem de forma diferente a um mesmo tipo de razão nitrato/amônio, indicando efeito genotípico.

De maneira geral, os explantes apresentaram alto grau de hiperhidricidade, sendo esta desordem um fator limitante nas condições deste estudo para a micropropagação em biorreator de imersão temporária RITA[®].

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFREEN, F. Temporary immersion bioreactor – Engineering considerations and applications in plant micropropagation. In: GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. (Eds.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 187-201.

ADELBERG, J.; Fári, M. G. Applied physiology and practical bioreactors for plant propagation. **Propagation of Ornamental Plants**. vol. 10, nº 4, 2010: 205-219.

ARAUJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F.A.; CARVALHO, J.G.; ZARRAGA, D.A.Z. Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2009.

BERTONI, B.W.; DAMIÃO FILHO, C. F.; MORO, J.R.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 8, p. 48-54, 2006.

BRAND, M. H. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 35, p. 203-209, 1993.

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

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

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.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Cultura de tecidos e transformação genética de Plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L. S. BUSO, J.A. Micropropagação. **Brasília: EMBRAPA –SPI / EMBRAPA-CNPB**, p. 183-260.1998.

MARTÍNEZ, L. R.; VISSER, R.G.F.; KLERK, GEERT-JAN. The hyperhydricity syndrome: waterlogging of plant tissues as a major cause. **Propagation of Ornamental Plants**.vol. 10, nº 4, 2010: 169-175

MERKLE, S. A.; NAIRN, C. J. Hardwood tree biotechnology. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.41, n.5, p.602-619, 2005.

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.

NIEDZ, R. P.; EVENS, T. J. The effects of nitrogen and potassium nutrition on the growth of nonembryogenic and embryogenic tissue of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **BMC Plant Biology**, v. 8, p. 1-11, 2008.

OLIVEIRA, L. S. Micropropagação, microestaquia e miniestaquia de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. 2011. 71p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

OLIVEIRA, M. L. Micropropagação de clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreatores de imersão temporária. 2009. 79p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: Borém, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: UFV, 2007. cap. 4, p. 75-92.

PICOLI, E. A. T.; PAIVA, E. A. S.; XAVIER, A.; AGUIAR, R. M.; CAROLINO, S. M. B.; FÁRI, M. G.; OTONI, W. C. Ultrastructural and biochemical aspects of normal and hyperhydric eucalypt. **International Journal of Horticultural Science**. 14 (3): 61–69 2008.

RINALDI, L.M.R. Factors affecting shoot regeneration from zygotic embryo and seedling explants of *Cycas revoluta* Thunb. **In Vitro Cellular and Development Biology Plant**, v.35, p.25-28, 1999.

SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L.; SILVA, K. M. da. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A. da S.;

JUNGHANS, T. G. (Eds.). **Introdução à micropropagação de plantas**. 1 ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, v. , p. 79-98.

SAKUTA, M. et al. Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacea americana*. **Physiologia Plantarum**, v. 71, n. 4, p. 459-463, 1987.

VAN BEUSICHEM, M. L.; KIRKBY, E. A.; BAAS, R. Influence of nitrate and ammonium nutrition and the uptake, assimilation and distribution of nutrient in *Ricinus communis*. **Plant Physiology**, v. 86, n. 3, p. 914-921, 1988.

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

Influência do substrato no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*

RESUMO: O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a influência do substrato na produção de mudas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus* pelo enraizamento de miniestacas e microestacas. O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso no arranjo fatorial 4 x 3 x 2, sendo estudados quatro clones híbridos de *Eucalyptus globulus*, três substratos (S1= 50%vermiculita +50% de casca de arroz carbonizada; S2= 100% composto orgânico Bioplant[®] e S3= 50% vermiculita + 50%de composto orgânico Bioplant[®]) e duas técnicas de propagação (miniestaquia e microestaquia). Foram realizadas avaliações em casa de vegetação, casa de sombra e a pleno sol quanto ao percentual de sobrevivência, enraizamento, altura, diâmetro do colo e massa seca da parte aérea e sistema radicular. Com base nos resultados obtidos, pôde-se concluir que os diferentes substratos utilizados neste estudo influenciaram o enraizamento dos clones híbridos de *Eucalyptus globulus*, sendo as microestacas superiores às miniestacas em relação a características avaliadas.

Palavras-chave: propagação vegetativa, silvicultura clonal.

Influence of substrate on the rooting of mini-cuttings and micro-cuttingshybrid clones of *Eucalyptus*

ABSTRACT: The present work was to evaluate the influence of the substrate in the production of seedlings of hybrid clones of *Eucalyptus globulus* by mini-cuttings and rooting micropiles. The design was a randomized block in factorial arrangement 4x 3x 2, and four studied hybrid clones of *Eucalyptus globulus*, three substrates (S1 = 50% vermiculite + 50% rice husk;S2 = 100% Bioplanta[®] and S3 = 50% + 50% vermiculite Bioplanta[®]) and two propagation techniques (mini-cuttings and micro). Evaluations were carried out in the shade in a greenhouse full sun and in the percentage of survival, rooting, height, stem diameter and dry mass of shoot and root system. Based on these results, we concluded that the different substrates used in this study influenced the rooting of hybrid clones of *Eucalyptus globulus*, the microcuttings being superior to mini-cuttings regarding the evaluated characteristics.

Keywords: minicutting, microcutting, vegetative propagation, clonal forestry.

1. INTRODUÇÃO

A propagação clonal de *Eucalyptus* evoluiu muito nos últimos anos, sendo adotada por várias empresas como estratégia na melhoria da produtividade e qualidade das mudas produzidas, contribuindo para que se tenha êxito na formação inicial de povoamentos florestais de alta produtividade. No entanto, algumas espécies e clones de *Eucalyptus* apresentam dificuldades para o enraizamento na propagação por estaquia, principalmente quando envolve material adulto (ASSIS, 1997).

O *Eucalyptus globulus* e seus híbridos, por exemplo, possuem características químicas, físicas e anatômicas da madeira de excelente qualidade para o setor de papel e celulose, devido principalmente ao alto rendimento em celulose e ao baixo teor de lignina (CARDOSO, 2002; ROSA, 2003; PINTO 2007; XAVIER *et al.*, 2007; ALFENAS *et al.*, 2009). Entretanto, a clonagem em larga escala via estaquia deste material tem enfrentado problemas por se tratar de uma espécie recalcitrante ao enraizamento, apresentando índices inferiores aos desejados na produção comercial de mudas pela propagação vegetativa.

Resultados da microestaquia e da miniestaquia têm apontado vantagens em relação à estaquia convencional quanto ao processo de produção de mudas de *Eucalyptus*, tais como maior percentual de enraizamento, qualidade do sistema radicular e velocidade de emissão das raízes (SANTOS *et al.*, 2005). 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. Entretanto, Oliveira (2011), estudando clones híbridos de *Eucalyptus globulus*, observou que os materiais genéticos apresentaram respostas diferenciadas quanto ao enraizamento das miniestacas e microestacas, não sendo observada, de maneira expressiva, a superioridade da microestaquia em relação à miniestaquia.

De forma geral, entre os vários fatores que afetam a propagação vegetativa pelo enraizamento de estacas estão aqueles relacionados com o genótipo, com as condições fisiológicas da planta fornecedora das estacas, tratamento das estacas (armazenamento, aplicação de reguladores de crescimento, antioxidantes e cofatores), com o tipo de estaca (GREENWOOD e HUTCHISON, 1993; HARTMANN *et al.*, 2002; TAIZ E ZEIGER, 2004), estado nutricional da planta-

matriz (SCHAWAMBACH *et al.*, 2005) e com a manipulação das condições ambientais, quanto à luminosidade, umidade, temperatura, tipo de recipiente e ao substrato (HIGASHI *et al.*, 2000; FREITAS *et al.*, 2006).

Segundo Couvillon (1988), o substrato pode ser determinante para o sucesso do enraizamento de estacas, embora, para algumas espécies vegetais, não haja efeito significativo (POKORNY e AUSTIN, 1982).

O substrato fornece à planta sustentação, podendo ainda regular a disponibilidade de nutrientes (PASQUAL *et al.*, 2001), servindo de base para o desenvolvimento de uma planta até a área de plantio. Ele pode ser formado de solo mineral ou orgânico, de um só ou de diversos materiais em mistura. Segundo Alfenas *et al.* (2009) a maioria dos substratos utilizados atualmente são constituídos à base de casca de arroz carbonizada, composto de casca de eucalipto ou de pinus, misturados com vermiculita, em diferentes proporções.

Entre as características que se espera de um substrato, podem-se citar propriedades físicas e químicas conhecidas e constantes, baixa densidade, possuir boa capacidade de retenção de água, adequado espaço poroso para facilitar o fornecimento de oxigênio, ausência de patógenos, boa disponibilidade, riqueza em nutrientes essenciais (SILVA *et al.*, 2001; WEDLING *et al.*, 2002).

A escolha do substrato é de fundamental importância, visto ser onde o sistema radicular irá desenvolver, determinando o crescimento da parte aérea da muda (JABUR & MARTINS, 2002). No entanto, outro importante fator que influencia no enraizamento está relacionado à juvenilidade dos propágulos, que interfere no vigor e desenvolvimento radicular e consequente benefício no aumento de número de raízes (WENDLING e XAVIER, 2005). Sendo assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a influência de diferentes substratos no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material experimental

Foram utilizados 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 Cenibra S.A.

A mudas micropropagadas utilizadas como material experimental foram obtidas no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro), e as miniestacas obtidas no Viveiro de Pesquisas Florestais do Departamento de Engenharia Florestal, ambos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

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, Viçosa, MG.

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 por mudas provenientes de material micropropagado, pela proliferação de gemas axilares. Na micropropagação foi utilizado meio de cultura composto pelos sais básicos de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), 40 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). 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 revigoração clonal. O número de subcultivos variou entre os clones em função das respostas das gemas à multiplicação *in vitro*,

sendo C04 = 15, C16 = 18, C26 = 14 e C30 = 14, os quais, posteriormente, foram transferidos para o meio adequado ao alongamento das gemas.

As brotações alongadas *in vitro* foram resgatadas e transferidas para potes plásticos, contendo substrato (50% de vemiculita + 50% de composto orgânico 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 ≥80%), sendo transplantadas em tubetes plásticos de 55 cm³ de capacidade, contendo como substrato o composto orgânico Bioplant[®].

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 à 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 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 g L⁻¹), cloreto de potássio (0,240 g L⁻¹), nitrato de potássio (0,140 g L⁻¹), monoamônio fosfato (0,096 g L⁻¹), sulfato de magnésio (0,364 g L⁻¹), hidroferro (0,040 g L⁻¹), ácido bórico (2,800 mg L⁻¹), sulfato de zinco (0,480 mg L⁻¹), sulfato de manganês (1,120 mg L⁻¹), sulfato de cobre (0,100 mg L⁻¹) e molibdato de sódio (0,040 mg L⁻¹). A condutividade elétrica da solução nutritiva foi mantida em 2,0 mS m⁻² a 25 °C.

2.3. Obtenção, preparo e estaqueamento das miniestacas e microestacas

Miniestacas e microestacas apicais com 10 cm de tamanho foram preparadas contendo de dois a três pares de folhas reduzidas à metade de sua dimensão original, acondicionadas em uma caixa de isopor contendo água para manter as condições de turgescência do material vegetativo.

Após a confecção das miniestacas e microestacas, elas foram estaqueadas em tubetes de polipropileno com capacidade para 55 cm³, contendo diferentes substratos, provenientes das combinações de vermiculita granulometria média, casca de arroz carbonizada e composto orgânico Bioplant[®]. A nutrição mineral de base utilizada nos substratos foi composta de superfosfato simples (8,00 kg m⁻³), sulfato de amônio (0,69 kg m⁻³), cloreto de potássio (0,21 kg m⁻³), sulfato de zinco (13,9 g m⁻³), sulfato de cobre (13,9 g m⁻³), sulfato de manganês (13,9 g m⁻³) e ácido bórico (27,8 g m⁻³).

2.4. Avaliações experimentais

Adotou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso, em arranjo fatorial 4 x 3 x 2, constituído de quatro clones (C04, C16, C26 e C30), três tipos de substratos (S1= 50% de vermiculita +50% casca de arroz carbonizada; S2= 100% composto orgânico Bioplant[®]; e S3= 50% de vermiculita + 50% composto orgânico Bioplant[®]) e duas técnicas de propagação vegetativa (miniestaquia e microestaquia), com quatro repetições, composta por oito miniestacas ou microestacas por repetição.

O tempo de permanência das microestacas e miniestacas em casa de vegetação climatizada (umidade relativa do ar \geq 80% e temperatura entre 20 e 30 °C) foi de 30 dias, sendo posteriormente aclimatadas em casa de sombra com 50% de sombreamento durante 10 dias e transferidas para área de pleno sol até completarem 60 dias de idade. Foi feita 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, foram aplicados 5 mL por muda do formulado NPK (10-05- 30) (6 g L⁻¹). A aplicação da adubação de cobertura foi feita por meio de uma seringa dosadora automática Hoppner[®].

A característica avaliada foi a porcentagem de sobrevivência (SOB) de miniestacas e microestacas com raízes observadas na extremidade inferior do tubete (ROEIT) na saída da casa de vegetação (30 dias) e da casa de sombra (40 dias). Após 60 dias, foram avaliados a porcentagem de enraizamento (ENR), o número de raízes (NR) por miniestaca ou microestaca enraizada, altura (ALT), o diâmetro do colo (DC) e a massa seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSR), obtidas por secagem em estufa a 65^oC até peso constante 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.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA 7.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se boa taxa de sobrevivência das miniestacas e microestacas (Tabela 1), sendo os valores encontrados superiores a 79% na saída da casa de vegetação para os clones e diferentes substratos avaliados. Borges (2009) e Oliveira (2011), trabalhando com clones híbridos de *Eucalyptus globulus*, obtiveram resultados semelhantes a este trabalho com percentuais acima 86% de sobrevivência.

Segundo Titon et al. (2002), a sobrevivência na saída da casa de vegetação, embora não represente um resultado concreto do enraizamento das estacas, é de extrema importância 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.

Na saída da casa de vegetação para a casa de sombra, houve uma pequena redução na sobrevivência das miniestacas e microestacas, contudo, não existiu diferença estatística entre as técnicas de propagação utilizadas. De forma geral, o índice de sobrevivência na casa de vegetação e na casa de sombra

apresentou menores valores para as estacas cultivadas no substrato S1 (50% de vermiculita + 50% casca de arroz carbonizada) devido talvez à sua maior porosidade. De acordo com Brondani (2008), outro fator que pode interferir na sobrevivência das mudas é que, durante o período de aclimação na casa de sombra, as oscilações ambientais, tanto hídricas como de luminosidade, podem provocar maior estresse nas estacas resultando em posterior mortalidade.

Na saída da casa de vegetação e da casa de sombra, houve efeito das diferentes técnicas de propagação e substratos utilizados em relação à avaliação quanto à emissão de raízes na extremidade inferior do tubete. Em geral, na saída da casa de vegetação, o substrato 1 (50% vermiculita + 50% casca de arroz) apresentou os menores valores para emissão de raízes das miniestacas e microestacas para todos os clones avaliados. Já na saída da casa de sombra, os diferentes substratos e técnicas de propagação não influenciaram na emissão de raízes para os clones C16 e C30.

Os clones híbridos de *Eucalyptus globulus* apresentaram aumento no percentual médio de raízes observadas na extremidade inferior do tubete das miniestacas e microestacas comparado à saída da casa de vegetação, sendo observados valores entre 46,9% a 95,8% para microestacas do clone C26 cultivadas no substrato S3 (50% de vermiculita + 50% composto orgânico Bioplant[®]). No entanto, Oliveira (2011), estudando os mesmos materiais genéticos utilizados neste trabalho, obteve para a maioria dos tratamentos estudados na casa de sombra valor máximo de 62,5 % de emissão de raízes no fundo do tubete.

Tabela 1 - Sobrevivência (SOB) e raízes observadas na extremidade inferior do tubete (ROEIT) de miniestacas (Mini) e microestacas (Micro) apicais, 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 *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26 e C30), em função do tipo de substrato utilizado (1= 50%vermiculita +50% casca de arroz; 2= 100% Bioplant[®] e 3= 50% vermiculita + 50% Bioplant[®]).

Clone	Técnica	Substrato	Casa de Vegetação		Casa de sombra	
			SOB(%)	ROEIT(%)	SOB(%)	ROEIT(%)
C04	Mini	S1	79,2Ab	21,9Bb	71,9Ab	46,9Bb
		S2	96,9Aa	41,7Bb	90,6Aa	62,5Aa
		S3	90,6Aa	78,1Aa	90,6Aa	81,3Aa
	Micro	S1	81,3Aa	65,6Ab	78,1Aa	68,8Aa
		S2	90,6Aa	75,0Aa	87,5Aa	71,9Aa

Cont.						
		S3	87,5Aa	75,0Aa	84,4Aa	75,0Aa
C16	Mini	S1	87,5Aa	62,5Bb	87,5Aa	83,3Aa
		S2	90,6Aa	83,3Aa	90,6Aa	78,1Aa
		S3	96,9Aa	90,6Aa	93,8Aa	87,5Aa
	Micro	S1	90,6Aa	81,3Aa	90,6Aa	83,3Aa
		S2	87,5Aa	87,5Aa	84,4Ab	84,4Aa
		S3	96,9Aa	84,4Aa	96,9Aa	87,5Aa
C26	Mini	S1	81,3Ab	65,6Ab	78,1Ab	65,6Ab
		S2	100,0Aa	78,1Aa	100,0Aa	78,1Aa
		S3	93,8Aa	83,3Aa	93,8Aa	83,3Ba
	Micro	1	93,8Aa	68,7Ab	84,4Ab	71,9Ab
		2	95,8Aa	71,8Ab	91,66Aa	72,4Ab
		3	100,0Aa	83,3Aa	100,0Aa	95,8Aa
C30	Mini	S1	78,1Ab	62,5Ab	75,1Ab	68,8Aa
		S2	93,8Aa	84,4Aa	93,8Aa	84,4Aa
		S3	87,5Aa	81,3Aa	87,5Aa	83,3Aa
	Micro	S1	81,3Ab	68,8Ab	81,3Ab	71,9Aa
		S2	96,9Aa	78,1Aa	94,0Aa	87,5Aa
		S3	93,8Aa	87,5Aa	93,8Aa	87,5Aa

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula entre substratos e as seguidas de uma mesma letra maiúscula, entre técnicas de propagação, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação à porcentagem de enraizamento aos 60 dias de idade, as microestacas de maneira geral foram superiores às miniestacas para os clones C04 e C30. No entanto, os clones C16 e C26 não apresentaram diferenças entre as técnicas de propagação utilizadas, provavelmente devido ao número de subcultivos não ter sido suficiente para promover o rejuvenescimento/revigoramento significativo no aumento da taxa de enraizamento do material genético em estudo, ou ainda, que as microcepas utilizadas já apresentavam um grau de juvenilidade suficiente para apresentar bom vigor vegetativo, refletido diretamente no enraizamento das microestacas.

Titon (2002), pesquisando quatro clones de *Eucalyptus*, dois clones de *Eucalyptus grandis* e dois híbridos de *Eucalyptus grandis*, obteve 94% de enraizamento na microestaquia e 88% na miniestaquia. Apesar da diferença entre os valores encontrados neste estudo para os de Titon (2002), percebe-se que houve o mesmo comportamento nos resultados encontrados, ou seja, maior enraizamento das microestacas em relação às miniestacas, sendo provável que essa diferença no enraizamento se deva às espécies trabalhadas.

Tabela 2 – Enraizamento (ENR), número de raízes (NR), altura (Alt), diâmetro de colo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca do sistema radicular (MSR) de miniestacas (Mini) e microestacas (Micro) apicais 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 tipo de substrato utilizado (S1= 50%vermiculita +50% casca de arroz carbonizada; S2= 100% de composto orgânico Bioplant® e S3= 50% de vermiculita + 50% composto orgânico Bioplant®).

Clone	Técnica	Substrato	Crescimento a pleno sol					
			ENR(%)	NR	Alt(cm)	DC(mm)	MSPA(g)	MSR(g)
C04	Mini	S1	56,3Bb	3,1Bb	12,9Ba	2,2Aa	0,7Aa	0,3Aa
		S2	75,0Bb	2,4Bb	13,6Ba	2,2Aa	0,7Aa	0,3Aa
		S3	87,5Aa	4,1Aa	14,9Aa	2,2Aa	0,9Aa	0,3Aa
	Micro	S1	70,8Ab	4,4Aa	15,6Aa	2,3Aa	0,8Aa	0,4Aa
		S2	84,4Aa	4,6Aa	16,4Aa	2,3Aa	0,9Aa	0,3Aa
		S3	81,3Aa	4,7Aa	15,5Aa	2,4Aa	0,9Aa	0,3Aa
C16	Mini	S1	81,3Aa	5,0Ba	18,5Aa	2,7Aa	1,3Aa	0,4Aa
		S2	90,6Aa	3,6Bb	18,0Aa	2,6Aa	1,1Aa	0,3Aa
		S3	90,6Aa	5,2Aa	16,7Aa	2,8Aa	1,0Aa	0,3Aa
	Micro	S1	84,4Aa	6,1Aa	17,1Aa	2,5Aa	1,1Aa	0,3Aa
		S2	84,4Aa	5,6Aa	18,1Aa	2,5Aa	1,0Aa	0,3Aa
		S3	93,8Aa	5,4Aa	17,1Aa	2,5Aa	1,1Aa	0,3Aa
C26	Mini	S1	70,8Ab	3,9Aa	17,0Aa	2,4Aa	0,6Aa	0,3Aa
		S2	87,5Aa	4,1Aa	17,9Aa	2,5Aa	0,8Aa	0,3Aa
		S3	81,3Aa	4,2Aa	17,4Aa	2,3Aa	0,8Aa	0,3Aa
	Micro	S1	75,0Ab	2,9Bb	16,7Aa	2,2Aa	0,8Aa	0,4Aa
		S2	81,3Aa	4,2Aa	16,8Aa	2,2Aa	0,8Aa	0,3Aa
		S3	84,4Aa	4,0Aa	17,5Aa	2,5Aa	0,9Aa	0,3Aa
C30	Mini	S1	66,6Bb	5,0Aa	14,7Ba	2,6Aa	0,7Ba	0,3Ba
		S2	90,6Aa	4,1Ba	15,1Aa	2,2Aa	0,8Aa	0,3Aa
		S3	91,6,Aa	4,4Aa	14,2Ba	2,5Aa	0,8Ba	0,2Aa
	Micro	S1	91,6Aa	5,0Aa	17,1Aa	2,5Aa	1,0Aa	0,6Aa
		S2	93,8Aa	5,2Aa	15,9Aa	2,5Aa	1,0Aa	0,3Aa
		S3	93,8Aa	4,9Aa	17,1Aa	2,5Aa	1,1Aa	0,3Aa

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula, entre diferentes substratos e dentro de uma mesma técnica de propagação, e as seguidas de uma mesma letra maiúscula, entre técnicas de propagação dentro do mesmo tipo de substrato, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a característica número de raízes, as microestacas dos clones C04, C16 e C30 apresentaram valores superiores em relação às miniestacas, variando de 2,9 a 6,1 (Tabela 2). Os clones C04 e C16 tiveram médias menores de número de raízes nas miniestacas comparadas às microestacas quando

cultivadas no substrato 1 e 2 (50% de vermiculita + 50% casca de arroz carbonizada e 100% composto orgânico Bioplant[®]).

Os resultados para altura mostraram que os clones C04 e C30 obtiveram valores superiores em altura ao utilizar a microestacas em relação a miniestacas. Em média, os clones apresentaram altura em torno de 16,3 cm e diâmetro do colo por volta de 2,4mm, não apresentando diferenças entre a miniestaquia e microestaquia para esta característica. Estes resultados corroboram aqueles encontrados por Titon et al. (2003), que, ao estudarem miniestaquia e microestaquia de *Eucalyptus grandis* aos 50 dias de idade, obtiveram em média 13,3 cm altura e 2,0 mm de diâmetro do colo. Entretanto, Oliveira (2011), estudando os mesmos clones, encontrou aos 60 dias de idade para a característica altura um valor médio de 12,3 cm e diâmetro do colo variando de 4,2 a 7,2mm.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, verificou-se, para a massa seca da parte aérea e massa seca do sistema radicular, diferença entre as técnicas de propagação utilizadas apenas para o clone C30, sendo que a microestaquia foi superior à miniestaquia para estas características avaliadas. Este resultado confirma aqueles encontrados por Oliveira (2011) que, ao estudar este mesmo clone obteve maior altura da parte aérea, massa seca da parte aérea e do sistema radicular nas microestacas quando comparado às miniestacas.

Os diferentes substratos, aos 60 dias de idade, não mostraram efeito no crescimento e desenvolvimento dos clones híbridos de *Eucalyptus globulus* para a maioria das características avaliadas, exceto para a porcentagem de enraizamento e número de raiz, em que o substrato 3 apresentou os melhores resultados para todos os clones e técnicas de propagação utilizados.

4. CONCLUSÕES

Os diferentes substratos utilizados neste estudo influenciaram o enraizamento dos clones híbridos de *Eucalyptus globulus*, sendo as microestacas superiores às miniestacas em relação a algumas características avaliadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 3^o ed. 2009. 500p.

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

BORGES, S. R. **Micropropagação e enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus***. 2009. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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.

CARDOSO, G. V. **Otimização do cozimento kraft para produção de celulose a partir de madeiras de *Eucalyptus globulus* com diferentes teores de lignina**. 2002. 147 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

COUVILLON, G.A. Rooting response to different treatments. **Acta Horticulturae**. v.227, p.187-196, 1988.

FREITAS, T.A.S de; BARROSO, D.G; CARNEIRO, J.G.A; PENCHEL, R.M; FIGUEIREDO, F.A.M.M.A. Mudanças de eucalipto produzidas a partir de miniestacas em diferentes recipientes e substratos. **Revista Árvore**. v.30, n.4, p.519-528, 2006.

GREENWOOD, M. S.; HUTCHISON, K. W. Maturation as a development process. In: AHUJA, M.R.; LIBBY, W.J.(Eds.). **Clonal forestry: genetics and biotechnology**. Budapest: Springer-Verlag. 1993. p. 14-33

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**, 7, ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.A.; GONÇALVES, A.N. Evolução do jardim clonal de eucalipto para produção de mudas. **IPEF**, v.24, n.148, 2000.

JABUR, M. A.; MARTINS, A. B. G. Influência de substratos na formação dos porta-enxertos: limoeiro-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e tangerineira-cleópatra (*Citrus reshni* Hort. Ex Tanaka) em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.514-518, ago. 2002.

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

OLIVEIRA, L. S. Micropropagação, microestaquia e miniestaquia de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. 2011. 71p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D.; VALE, M. R. do; SILVA, C. R. de R. e. **Fruticultura comercial**: propagação de plantas frutíferas. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 137 p.

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

POKORNY, F.A.; AUSTIN, M.E. Propagation of blueberry softwood terminal cuttings in pine bark and peat media. **Hortscience**. v.17,p.640-642, 1982.

ROSA, C. A. B. **Influência do teor de lignina da madeira de *Eucalyptus globulus* na produção e na qualidade da celulose Kraft**. 2003. 140 p. Dissertação 15 (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

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

SCHAWAMBACH, J.; FADANELLI, C.; FETT-NETO, A. G. Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, v.25, p. 484-494, 2005.

SILVA, R. P. da; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, N. T. V. Influência de diversos substratos no desenvolvimento de mudas de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* DEG). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.377-381, ago. 2001.

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

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

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

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, 2005.

WEDLING, I.; GATTO, A.; PAIVA, H. N. **Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. 166 p.

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

Influência do tipo de miniestacas e microestacas no enraizamento de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*

RESUMO: Os objetivos do presente estudo foram avaliar os diferentes tipos de miniestacas e microestacas no enraizamento de quatro clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. Foram realizadas avaliações quanto ao percentual de sobrevivência, raízes emitidas na extremidade inferior do tubete, enraizamento, altura, diâmetro do colo, massa seca da parte aérea e da raiz. Aos 90 dias de idade, pôde-se concluir que as estacas apicais sem e com redução foliar foram superiores às intermediárias e que os clones se comportaram de maneira diferenciada em relação ao enraizamento das miniestacas e microestacas.

Palavras-Chave: Propagação vegetativa, miniestaquia, microestaquia.

Influence of type of cuttings in the rooting of minicuttings and microshoots hybrid clones of *Eucalyptus globulus*

ABSTRACT: The objectives of this study was to evaluate the different types of cuttings, apical leaf-size sheet and reduced to half their original size and stake sandwich sheet reduced to half their original size, as well as propagation techniques, and micro minicuttings on the rooting of four hybrid clones of *Eucalyptus globulus*. Evaluations were performed on the percentage of survival, roots emitted at the lower end of the cartridge, rooting, height, stem diameter, dry mass of shoot and root. At 90 days old, it can be concluded that the apical cuttings with and without reduction were higher than the intermediate leaf and each clone behaved differently in relation to propagation techniques used.

Keywords: Vegetative propagation, type of cutting, stem-cutting rooting.

1. INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus globulus* e seus híbridos têm se mostrado uma das espécies recalcitrantes ao enraizamento de estacas em razão da variabilidade da habilidade rizogênica dos clones, bem como pela redução do potencial de enraizamento com o envelhecimento ontogenético das plantas matrizes (WATT *et al.*, 2003). No entanto, atualmente essa espécie e seus híbridos têm sido alvo de grande interesse da indústria de papel e celulose por apresentarem características tecnológicas da madeira, como maior rendimento em celulose e menor teor de lignina, tornando-o muito atrativo para tal objetivo (CARDOSO, 2002; PINTO, 2007; XAVIER *et al.*, 2007; ALFENAS *et al.*, 2009).

Entre as diversas técnicas de propagação vegetativa, o aprimoramento no enraizamento de estacas de *Eucalyptus* tem sido alcançado com o desenvolvimento de técnicas como a miniestaquia (XAVIER E WENDLING, 1998; WENDLING *et al.*, 2000; HIGASHI *et al.*, 2000) e a micropropagação, aliada à microestaquia (ASSIS *et al.*, 1992; XAVIER E COMÉRIO, 1996; TITON, 2001), que possibilitaram consideráveis ganhos, principalmente quanto ao aumento das taxas e qualidade de enraizamento e redução do tempo para a formação da muda.

O enraizamento de estacas pode ser influenciado pela presença de gemas e/ou folhas e pelo período de coleta das estacas (HARTAMANN *et al.*, 2002), injúrias, balanço hormonal, constituição genética, presença de inibidores e pelas condições nutricionais e hídricas da planta doadora de propágulos (ASSIS *et al.*, 2004; ALFENAS *et al.*, 2009), além de ser fortemente influenciado pela maturação/juvelilidade dos propágulos e pelas condições ambientais de enraizamento das estacas (WENDLING *et al.*, 2000; XAVIER, 2002)

Nos viveiros de mudas clonais, é comum a utilização de miniestacas com tamanho entre 4 e 8 cm, com pelo menos dois pares de folhas (ALFENAS *et al.*, 2009). A presença das folhas é essencial para o enraizamento das estacas, pois os produtos da fotossíntese proporcionam acúmulo de carboidratos, os quais favorecem o crescimento de raízes (HARTMANN & KESTER., 1975). Entretanto, para evitar o efeito “*guarda-chuva*”, que pode reduzir a eficiência da irrigação, o excesso de transpiração e o recurvamento das estacas, Alfenas *et al.* (2009)

recomendam reduzir em um terço a lâmina foliar da miniestaca, e Xavier (2002) recomenda reduzir em 50 % a área foliar .

De acordo com Santana et al. (2010), a técnica de redução foliar em miniestacas é praticamente a mesma que se utilizava em produção de mudas por macroestacas nas décadas de 80 e 90, apesar de o propágulo vegetativo da miniestaca ser menor e mais juvenil comparativamente ao da macroestaquia, além de os sistemas de irrigação terem evoluído muito nos últimos anos.

Neste contexto, este estudo teve por objetivo avaliar a influência da redução da área foliar em miniestacas e microestacas no enraizamento e crescimento de mudas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material experimental

Foram utilizados 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 Cenibra S.A.

As mudas micropropagadas utilizadas como material experimental foram obtidas no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro) e as miniestacas obtidas no Viveiro de Pesquisas Florestais do Departamento de Engenharia Florestal, ambos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG..

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 por mudas provenientes de material micropropagado pela proliferação de gemas axilares. Na micropropagação, foi utilizado meio de cultura composto pelos sais básicos de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), 40 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). 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 variou entre os clones em função das respostas das gemas à multiplicação *in vitro*, sendo C04 = 15, C16 = 18, C26 = 14 e C30 = 14, posteriormente, transferidos para o meio adequado ao alongamento das gemas.

As brotações alongadas *in vitro* foram resgatadas e transferidas para potes plásticos contendo substrato (50% de vemiculita + 50% de composto orgânico 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 - 80%), sendo transplantadas em tubetes plásticos de 55 cm³ de capacidade, contendo composto orgânico Bioplant®.

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 à 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 miniestquia. 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 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 g L⁻¹), cloreto de potássio (0,240 g L⁻¹), nitrato de potássio (0,140 g L⁻¹), monoamônio fosfato (0,096 g L⁻¹), sulfato de magnésio (0,364 g L⁻¹), hidroferro (0,040 g L⁻¹), ácido bórico (2,800 mg L⁻¹), sulfato de zinco (0,480 mg L⁻¹), sulfato de manganês (1,120 mg L⁻¹), sulfato de cobre (0,100 mg L⁻¹) e molibdato de sódio (0,040 mg L⁻¹). A condutividade elétrica da solução nutritiva foi mantida em 2,0 mS m⁻² a 25 °C.

2.3. Obtenção, preparo e estaqueamento das miniestacas e microestacas

Miniestacas e microestacas apicais e intermediárias, Figura 1, foram coletadas no minijardim e microjardim clonal e acondicionadas em caixas de isopor contendo água, visando a 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 sem redução foliar e com redução dos pares de folhas à metade de sua dimensão original, enquanto as intermediárias, medindo 5 cm com um par de folhas, foram reduzidas à metade de sua dimensão original.

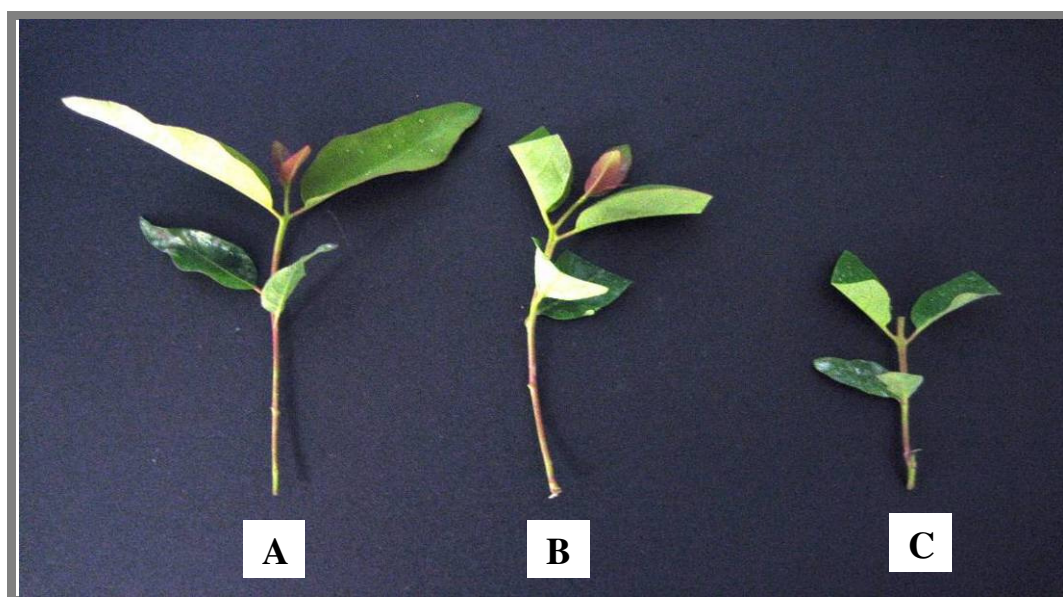


Figura 1 - Estaca apical sem redução foliar (A), estaca apical com folha reduzida à metade de sua dimensão original (B) e estaca intermediária com folha reduzida

à metade de sua dimensão original (C) de clone híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus*, usadas como padrão no presente estudo.

Após a confecção das miniestacas e microestacas, elas foram estaqueadas em tubetes de polipropileno com capacidade para 55 cm³ de uma mistura de 50% Bioplant® + 50% vermiculita. A nutrição mineral de base utilizada no substrato foi composta de superfosfato simples (8,00 kg m⁻³), sulfato de amônio (0,69 kg m⁻³), cloreto de potássio (0,21 kg m⁻³), sulfato de zinco (13,9 g m⁻³), sulfato de cobre (13,9 g m⁻³), sulfato de manganês (13,9 g m⁻³) e ácido bórico (27,8 g m⁻³).

2.4. Avaliações experimentais

Adotou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso, em arranjo fatorial 4 x 3 x 2, constituído de quatro clones (C04, C16, C26 e C30), três tipos de estacas (1= apical sem redução foliar; 2= apical com folha reduzida à metade de sua dimensão original; e 3= intermediária com folha reduzida à metade de sua dimensão original) e duas técnicas de propagação vegetativa (miniestaquia e microestaquia), com quatro repetições, composta por oito miniestacas ou microestacas por repetição.

O tempo de permanência das microestacas e miniestacas em casa de vegetação climatizada (umidade relativa do ar ≥ 80% e temperatura entre 20 e 30⁰ C) foi de 30 dias, sendo posteriormente aclimatadas em casa de sombra com 50% de sombreamento durante 10 dias e transferidas para área de pleno sol até completarem 90 dias de idade. Foi feita uma adubação de cobertura, aplicando 2 mL por muda de fosfato monoamônico (2,0 g L⁻¹) na saída de casa de vegetação. Na saída da casa de sombra, foram aplicados 5 mL por muda do formulado NPK (10-05-30) (6 g L⁻¹). A aplicação da adubação de cobertura foi feita por meio de uma seringa dosadora automática Hoppner®.

As características avaliadas foram a porcentagem de sobrevivência e de miniestacas e microestacas com raízes observadas na extremidade inferior do tubete na saída da casa de vegetação (30 dias) e da casa de sombra (40 dias). Após 90 dias, foram avaliados a porcentagem de enraizamento, o número de raízes por miniestaca ou microestaca enraizada, altura, o diâmetro do colo e a

massa seca da parte aérea e sistema radicular, obtidas por secagem em estufa a 65⁰C, até peso constante 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.

Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias dos tratamentos comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA 7.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados apresentados na Tabela 1, observaram-se valores de até 100% de sobrevivência na saída da casa de vegetação e de 96,9% na saída da casa de sombra, sendo os menores valores dessa característica encontrados para o clone C04, tanto na saída da casa de vegetação (28,1%) quanto na casa de sombra (25%). O clone C04 ainda apresentou diferenças de respostas à sobrevivência entre as miniestacas e microestacas apicais sem redução foliar.

Para a característica raízes observadas na extremidade inferior do tubete, as microestacas sem redução foliar foram superiores às miniestacas para todos os clones estudados na saída da casa de vegetação e para o clone C04 na saída da casa de sombra. Os clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* apresentaram valores de raízes emitidas na extremidade inferior do tubete variando entre 9,4% a 58,3% na saída da casa de vegetação e de 16,6% a 87,5% na saída da casa de sombra, conforme o tipo de estaca utilizado. Vale salientar que este parâmetro tem sido muito utilizado pelas empresas florestais como indicador prático para identificar as miniestacas ou microestacas enraizadas e aptas a serem transferidas para a área de crescimento a pleno sol.

Em relação aos tipos de estacas, notou-se que não houve efeito dos tipos de estacas para os clones C26 e C30 para o parâmetro sobrevivência na saída da casa de vegetação, entretanto, na saída da casa de sombra, para esta mesma

característica, os diferentes tipos de estacas se comportaram de maneira distinta para cada clone estudado. Independentemente da técnica de propagação, em geral as estacas intermediárias apresentaram os menores valores para a característica raízes observadas na extremidade inferior do tubete na saída da casa de vegetação e casa de sombra.

Tabela 1 - Sobrevivência (SOB) e raízes observadas na extremidade inferior do tubete (ROEIT) de miniestacas (Mini) e microestacas (Micro) 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 *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26 e C30), em função do tipo de estaca utilizado (1= apical com folha inteira; 2= apical com folha reduzida à metade de sua dimensão original e 3= intermediária com folha reduzida à metade de sua dimensão original).

Clone	Técnica	Tipo de Estaca	Casa de Vegetação		Casa de sombra	
			SOB(%)	ROEIT(%)	SOB(%)	ROEIT(%)
C04	Mini	E1	28,1Bb	12,5Ba	25,0Bc	16,6Bb
		E2	56,3Aa	18,8Aa	41,6Ab	29,2Ba
		E3	56,3Aa	9,4Aa	62,5Aa	31,3Aa
	Micro	E1	87,5Aa	21,9Aa	87,5Aa	62,5Aa
		E2	53,1Ab	25,0Aa	45,8Ab	50,0Ab
		E3	51,3Ab	11,5Ab	58,8Ab	33,3Ac
C16	Mini	E1	96,9Aa	41,6Ba	96,9Aa	81,3Aa
		E2	78,1Aa	46,9Aa	78,1Ab	62,5Ab
		E3	96,9Aa	43,8Aa	96,9Aa	68,8Ab
	Micro	E1	93,8Aa	58,3Aa	93,8Aa	78,1Aa
		E2	75,0Ab	50,0Aa	71,9Ab	68,8Aa
		E3	87,5Aa	40,6Ab	87,5Aa	62,5Ab
C26	Mini	E1	93,8Aa	28,1Bb	90,6Aa	65,6Ab
		E2	93,8Aa	53,1Aa	93,8Aa	87,5Aa
		E3	90,6Aa	16,6Ac	87,5Aa	34,4Ac
	Micro	E1	100,0Aa	53,1Aa	93,8Aa	78,1Aa
		E2	90,6Aa	53,1Aa	87,5Aa	78,8Aa
		E3	84,4Aa	21,9Ab	81,3Ab	34,4Ab
C30	Mini	E1	87,5Aa	16,6Bb	87,5Aa	68,8Aa
		E2	84,4Aa	37,5Aa	84,4Aa	66,3Aa
		E3	91,6Aa	22,5Ab	91,6Aa	37,5Ab
	Micro	E1	87,5Aa	41,6Aa	78,1Ab	65,6Aa
		E2	87,5Aa	37,5Aa	87,5Aa	72,4Aa
		E3	93,8Aa	25,0Aa	93,8Aa	43,8Ab

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula entre tipo de estaca e as seguidas de uma mesma letra maiúscula, entre técnicas de propagação, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao analisar os resultados de enraizamento das miniestacas e microestacas aos 90 dias de idade (Tabela 2), notou-se que as miniestacas e microestacas apicais sem redução foliar apresentaram valores de 15,6 a 84,4% e de 71,9% a 93,8%, respectivamente, entre os clones. Nas miniestacas apicais com folha reduzida à metade de sua dimensão original, os índices de enraizamento variaram de 54,2% a 81,3% e para as microestacas, de 65,6% a 84,4%. Já nas miniestacas intermediárias com folha reduzida à metade de sua dimensão original, o enraizamento obtido variou de 25,0% a 79,2% e para as microestacas, de 56,3% a 68,8%. Não foi constatada diferença significativa entre as técnicas de propagação utilizadas, exceto para o clone C04, em que as microestacas foram superiores às miniestacas apicais sem redução foliar e intermediárias. Existe uma relação positiva entre área foliar de miniestacas e capacidade rizogênica de eucalipto, incluindo velocidade de enraizamento, número de raízes e biomassa radicular. Ao empregar miniestacas com folhas inteiras, segundo Alfenas *et al.*(2009), resultados promissores têm sido demonstrados para o aumento no enraizamento e controle de doenças, já que, nesse caso, como não é necessário fazer ferimentos nas folhas, evita-se a abertura de portas de entrada para patógenos.

Tabela 2 – Enraizamento (ENR), número de raízes (NR), altura (Alt), diâmetro de colo (DC), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca do sistema radicular (MSR) de miniestacas (Mini) e microestacas (Micro) dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* (C04 e C16) e de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* (C26 e C30) aos 90 dias, em função tipo de estaca utilizado (E1= apical com folha inteira E 2= apical com folha reduzida à metade de sua dimensão original e E3= intermediária com folha reduzida à metade de sua dimensão original).

Clone	Técnica	Estaca	Crescimento a pleno sol					
			ENR(%)	NR	Alt(cm)	DC(mm)	MSPA(g)	MSR(g)
C04	Mini	1	15,6Bb	3,0Aa	15,8Aa	2,1Aa	1,0Aa	0,6Aa
		2	54,2Aa	3,0Ba	15,8Aa	1,9Aa	0,8Aa	0,3Ba
		3	25,0Bb	3,7Aa	11,2Ab	2,1Aa	0,4Aa	0,6Aa
	Micro	1	87,5Aa	3,6Aa	14,0Aa	2,3Aa	0,8Aa	0,4Ab
		2	45,6Ac	5,2Aa	15,7Aa	2,2Aa	0,9Aa	0,6Aa
		3	66,7Ab	3,7Aa	11,8Ab	2,2Aa	0,6Aa	0,4Ab
C16	Mini	1	84,4Aa	4,8Ba	19,3Aa	2,5Aa	1,3Aa	0,5Aa
		2	78,1Aa	5,5Aa	16,8Aa	2,3Aa	1,1Aa	0,4Aa
		3	81,3 Aa	3,7Ab	10,7Ab	1,9Ab	0,6Ab	0,3Aa

		Cont.						
	Micro	1	93,8Aa	7,0Aa	17,3Aa	2,2Aa	1,3Aa	0,5Aa
		2	68,8Ac	6,1Aa	15,3Aa	2,2Aa	1,0Aa	0,3Aa
		3	79,2Ab	4,8Ab	10,7Ab	1,9Aa	0,5Ab	0,2Aa
C26	Mini	1	79,2Aa	3,4Ba	19,8Aa	2,2 Aa	0,8Aa	0,3Aa
		2	81,3Aa	5,0Aa	19,2Aa	2,4Aa	0,9Aa	0,5Aa
		3	59,4Aa	3,4Ba	12,3Ab	2,0Aa	0,5Aa	0,5Aa
	Micro	1	87,5Aa	5,3Aa	18,8Aa	2,3Aa	0,9Aa	0,5Aa
		2	78,1Aa	4,8Aa	16,8Aa	2,2Aa	0,9Aa	0,5Aa
		3	65,6Aa	5,8Aa	10,5Ab	2,1Aa	0,5Aa	0,3Aa
C30	Mini	1	78,1Aa	5,5Ba	16,2Aa	2,3Aa	1,1Aa	0,3Aa
		2	75,0Aa	4,1Bb	15,2Aa	2,0Aa	0,9Aa	0,3Aa
		3	70,8Aa	3,7Ab	11,6Ab	2,4Aa	0,8Aa	0,4Aa
	Micro	1	71,9Ab	7,5Aa	15,8Aa	2,8Aa	1,3Aa	0,4Aa
		2	84,4Aa	7,0Aa	16,5Aa	2,4Aa	1,0Aa	0,3Aa
		3	68,8Ab	3,9Ab	9,0Ab	2,2Aa	0,6Ab	0,2Aa

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula, entre tipos de estacas e dentro de uma mesma técnica de propagação, e as seguidas de uma mesma letra maiúscula, entre técnicas de propagação dentro do mesmo tipo de estaca, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação ao número de raízes, as microestacas de todos os clones avaliados, em geral, apresentaram valores superiores às miniestacas. As estacas intermediárias com folha reduzida à metade de sua dimensão original, quando comparadas aos outros tipos de estacas utilizados, obtiveram os menores valores para esta característica para os clones C16 e C30. Para os clones C04 e C26, não houve diferença entre os tipos de estacas utilizadas.

As características altura e diâmetro do colo das mudas não foram influenciadas pelo método de propagação (miniestaquia e microestaquia) para os clones estudados; no entanto, todas as miniestacas e microestacas intermediárias, com folha reduzida à metade de sua dimensão original, obtiveram menores valores de altura, quando comparadas aos outros tipos de estacas. As estacas apicais apresentam maior predisposição ao enraizamento em comparação com as intermediárias em razão da maior juvenildade destes propágulos, havendo, portanto, formação mais rápida de raízes com o sistema radicular bem mais estruturado, refletindo em maior crescimento tanto em altura como em diâmetro do colo das mudas.

Em média, independentemente do tipo de estaca, as miniestacas apresentaram 15,3cm e as microestacas 14,3 cm de altura. De acordo com Gomes et al. (1996), as empresas florestais utilizam como adequado para mudas de eucalipto altura média em torno de 15 e 30 cm e diâmetro do coleto superior a 2 mm. Os valores encontrados neste estudo provavelmente se devem ao fato de o material utilizado ser mais difícil de ser propagado, influenciando assim no crescimento e desenvolvimento das mudas.

Conforme Gomes e Paiva (2004), o diâmetro de colo é facilmente mensurável, sendo considerado por muitos pesquisadores um dos mais importantes parâmetros para estimar a sobrevivência de mudas de espécies florestais no campo. De acordo com estes autores, o padrão de qualidade de mudas de várias espécies florestais, prontas para o plantio, tem alta correlação com esse parâmetro e isso pode ser observado nos significativos aumentos das taxas de sobrevivência e do crescimento das plantas no campo. Entretanto, neste estudo, não houve efeito dos diferentes tipos de estacas utilizados influenciando o crescimento em diâmetro dos clones estudados.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2, não foi verificada diferença entre as técnicas de propagação, miniestaquia e microestaquia para as características massa seca da parte aérea e massa seca do sistema radicular, exceto para o clone C04, em que as microestacas apicais foram superiores às miniestacas apicais com redução foliar para a característica massa seca de raiz. Para esta mesma característica, em relação ao tipo de estaca utilizado, os resultados obtidos mostram que as microestacas intermediárias do clone C04 e C16 e as miniestacas intermediárias do clone C16 foram inferiores às microestacas e miniestacas apicais, respectivamente. Não foi observado efeito significativo entre as estacas apicais sem redução e com redução foliar. Santana et al.(2010), estudando oito clones de *Eucalyptus urophylla* e quatro níveis de redução foliar em estacas apicais, chegaram à conclusão de que os diferentes níveis de redução foliar não influenciaram a característica massa seca de raiz.

4. CONCLUSÕES

Os materiais genéticos comportaram-se de maneira distinta em relação ao enraizamento de miniestacas e microestacas.

De maneira geral, as estacas apicais sem redução e com redução foliar foram superiores às estacas intermediárias, apresentando maior predisposição ao enraizamento.

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.

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.; FETT-NETO, A.G.; ALFENAS,A.C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on Eucalyptus. In: WALTER, C.; CARSON, M. (Eds.) **Plantation forest biotechnology for the 21th century**. Kerala, India: Research Signposts, 2004.p. 303-333

CARDOSO, G. V. **Otimização do cozimento kraft para produção de celulose a partir de madeiras de *Eucalyptus globulus* com diferentes teores de lignina**. 2002. 147 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

GOMES, J.M.; PAIVA, H.N.; COUTO, L. Produção de mudas de eucalipto. **Informe Agropecuário**. v.18, n.185, p.15-22, 1996.

GOMES, J. M.; PAIVA, H. N. **Viveiros florestais** – propagação sexuada. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004. 116 p.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Plant propagation**. New Jersey: Prentice-Hall, 1975. 662p.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIS JÚNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New York: Englewood Clippis, 2002. 880 p.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e sua evolução no Brasil**. Piracicaba: IPEF/ ESALQ/USP, 2000, 10p. (Circular Técnica, 192).

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

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

SANTANA, R. C.; DUTRA, T. R.; NETO, J.P.C.; NOGUEIRA, G.S.; GRAZZIOTTI, P.H.; FILHO, N.F.B. Influence of leaf area reduction on clonal production of *Eucalyptus* seedlings. **Cerne**. v. 16, n. 3, p. 251-257, jul./set. 2010.

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

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

XAVIER, A. **Silvicultura clonal I: princípios e técnicas de propagação vegetativa**. Viçosa: UFV, 2002. 64p. (Caderno didático, 92)

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

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

WATT, M. P.; BERJAK, P.; MAKHATHINI, A.; BLAKEWAY, F. *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 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**, v.24, n.2, p.181-186, 2000.

3. CONCLUSÕES GERAIS

Com base nas condições estudadas para os clones *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus*, conclui-se que:

- 1) Ao comparar os recipientes tubos de ensaio, biorreator RITA[®] e potes plásticos, houve maior crescimento dos explantes nos biorreatores e potes plásticos, não havendo diferença entre o sistema líquido e semissólido para um mesmo volume de recipiente. Ainda em relação aos biorreatores, de modo geral, a utilização de diferentes relações de nitrogênio nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) (1:1, 2:1 e 3:1) utilizado na fase de multiplicação e alongamento no sistema de imersão temporária RITA[®] não influencia o desenvolvimento dos explantes. No geral, independentemente do sistema de cultivo, as culturas apresentaram alto grau de hiper-hidricidade influenciando o crescimento e desenvolvimento dos explantes.
- 2) As técnicas de propagação de miniestaquia e microestaquia proporcionaram respostas distintas para os clones estudados. Houve efeito dos diferentes substratos para algumas características avaliadas dos clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. As estacas apicais sem redução foliar e com redução foliar de modo geral não diferiram entre si, mas foram superiores às estacas intermediárias.