

ELISA CRISTINA SOARES DE CARVALHO ALVES

ORGANOGENESE *IN VITRO* NA REGENERAÇÃO DE CLONES DE
Eucalyptus grandis x *Eucalyptus urophylla*

Tese 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
2001

ELISA CRISTINA SOARES DE CARVALHO ALVES

ORGANOGENESE *IN VITRO* NA REGENERAÇÃO DE CLONES DE
Eucalyptus grandis x *Eucalyptus urophylla*

Tese 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 EM: 14 de dezembro de 2001

Prof^a. Rita de Cássia Gonçalves Borges
(Conselheira)

Prof. Wagner Campos Otoni
(Conselheiro)

Prof. José Maria Moreira Dias

Prof. Haroldo Nogueira de Paiva

Prof. Aloisio Xavier
(Orientador)

À minha família, especialmente aos meus pais Laércio e Coralice.

Ao meu filho Guilherme.

AGRADECIMENTO

A Deus, Grande Arquiteto do Universo, por tudo.

Aos meus pais, à minha avó Eliza e aos meus irmãos Elissa e Alexandre, pelo estímulo, pela união e pelo incentivo.

Ao meu marido Geraldo, pelo apoio e companheirismo.

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

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

Ao professor Aloisio Xavier, pela orientação, amizade e confiança.

Aos membros da banca examinadora, pelas críticas e sugestões.

Às minhas amigas Kátia e Vanusa, pelos anos de convivência e por estarem sempre presentes nos momentos importantes.

Aos integrantes do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento em Silvicultura Clonal Ivar, Miranda, Fabiana, Rodrigo, Alex, Glêison e Marcelo, pela ajuda e convivência.

Aos meus colegas Zilda, pela ajuda na confecção das lâminas; Douglas, pelas fotografias em lupa; e Vespasiano, pelas valiosas dicas durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO/UFV), especialmente ao professor Wagner Campos Otoni, e à Elisonete R. G. Lani, pela oportunidade de convivência e pelos ensinamentos.

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

BIOGRAFIA

Elisa Cristina Soares de Carvalho Alves, filha de Laércio Francisco de Carvalho e Coralice Soares de Carvalho, nasceu em 23 de novembro de 1971, em Muriaé, MG.

Em 1985, concluiu o 1^o grau na Escola Estadual Padre Maximino Benassati, em Muriaé, MG.

Em 1988, concluiu o Curso Técnico em Contabilidade no Centro Educacional de Muriaé, em Muriaé, MG.

Em 1995, diplomou-se Engenheira Florestal pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

Em agosto de 1999, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Ciência Florestal, na área de Concentração em Silvicultura, na UFV, submetendo-se à defesa de tese em dezembro de 2001.

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | viii |
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT | xi |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. Propagação clonal | 3 |
| 2.2. Micropropagação | 4 |
| 2.2.1. Meios de cultura e reguladores de crescimento | 8 |
| 2.2.2. Micropropagação em <i>Eucalyptus</i> | 10 |
| 2.3. Micropropagação por organogênese | 11 |
| 2.3.1. Micropropagação por organogênese em <i>Eucalyptus</i> | 13 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 3.1. Material experimental | 17 |
| 3.2. Metodologia | 18 |
| 3.2.1. Obtenção dos explantes | 18 |
| 3.2.2. Micropropagação por organogênese | 18 |
| 3.2.2.1. Meios de cultura e reguladores de crescimento..... | 19 |
| 3.2.2.2. Condução e avaliações experimentais | 21 |

| | Página |
|--|--------|
| 3.2.4. Análise histológica | 23 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 24 |
| 4.1. Fase de indução de calos em explante foliar | 24 |
| 4.1.1. Intensidade de calejamento | 24 |
| 4.1.2. Textura dos calos | 28 |
| 4.2. Fase de indução de calos em explante caulinar | 30 |
| 4.2.1. Intensidade de calejamento | 30 |
| 4.2.2. Textura dos calos | 33 |
| 4.3. Regeneração de gemas | 36 |
| 4.3.1. Explante foliar | 36 |
| 4.3.2. Explante caulinar | 40 |
| 4.4. Análise histológica | 44 |
| 5. RESUMO E CONCLUSÕES | 47 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA: ácido 3-indolacético

AIB: ácido indolbutírico

ANA: ácido naftalenoacético

BAP: 6-benzilaminopurina

Cinetina: 6-furfurilaminopurina

MÊS: 2-(N-ácido morfolinoetanessulfônico)

PVP: polivinilpirrolidona

TDZ: 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) uréia

Zeatina: N-(4-hidroxi-3metilbut-2-enil) aminopurina

2-iP: isopenteniladenina

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

RESUMO

ALVES, Elisa Cristina Soares de Carvalho, M. S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2001. **Organogênese *in vitro* na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.** Orientador: Aloisio Xavier. Conselheiros: Wagner Campos Otoni e Rita de Cássia Gonçalves Borges.

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos dos reguladores de crescimento TDZ, BAP e ANA no desempenho da propagação *in vitro* por organogênese de explantes foliar e caulinar de três clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Os explantes foliar e caulinar obtidos de gemas alongadas *in vitro* foram cultivados em meio de cultura específico e submetidos, em cada fase distinta, a diferentes concentrações e tipos de reguladores de crescimento. Na fase de indução de calos, foram utilizadas combinações dos reguladores de crescimento TDZ e ANA e de BAP com ANA, sendo esta conduzida em regime de escuridão, pelo período de 35 dias. Na fase de regeneração de gemas, a partir do melhor tratamento obtido na fase de calejamento, avaliaram-se os reguladores de crescimento BAP e ANA, sendo conduzida em condições de fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, à irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pelo período de 35 dias. De modo geral, pôde-se observar resposta diferenciada dos clones quanto a intensidade, textura, coloração e grau de oxidação dos calos, em função dos tratamentos com os reguladores de crescimento, tanto para explante foliar quanto

caulinar. Para os três clones em estudo, os melhores resultados de calejamento foram observados nos tratamentos com a combinação dos reguladores de crescimento TDZ ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) e ANA ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), obtendo-se 100% de calejamento no explante foliar. Houve a formação de calo com aspecto nodular na região do pecíolo dos explantes foliares e de estruturas nodulares compactas, principalmente na extremidade dos explantes caulinares, sendo essas regiões responsáveis pela regeneração de gemas adventícias nos explantes foliares para o clone 1 e explantes caulinares para os clones 1 e 3. A melhor resposta de regeneração foi obtida com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP para o clone 1 utilizando-se explante foliar e para o clone 3, utilizando-se explante caulinar. As análises histológicas revelaram a origem adventícia das gemas diferenciadas a partir de explantes foliares e caulinares. Todavia, recomenda-se cautela quanto à utilização de explante caulinar na regeneração por organogênese *in vitro*, devido à possibilidade de inclusão acidental de gemas axilares durante a confecção dos explantes, aliado ao menor rendimento obtido, em comparação com explante foliar.

ABSTRACT

ALVES, Elisa Cristina Soares de Carvalho, M.S., Universidade Federal de Viçosa, December of 2001. ***In vitro* regeneration of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* clones by organogenesis.** Adviser: Aloisio Xavier. Committee Members: Wagner Campos Otoni and Rita de Cássia Gonçalves Borges.

The effects of the growth regulators TDZ, BAP and ANA on the performance of *in vitro* propagation by organogenesis was evaluated for three hybrid clones of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* with leaf and stem explants. These leaf and stem explants were obtained by extended buds *in vitro*, cultivated in specific culture medium and treated, in each different phase, with different types and concentrations of growth regulators. Combinations of the growth regulators TDZ with ANA and BAP with ANA were used in the callus induction phase under darkness regime, for a period of 35 days. Based on the best treatment obtained during this phase of callus forming, the growth regulators BAP with ANA were evaluated for the phase of buds regeneration, under photoperiod conditions with 16 hours of light and 8 hours of darkness, with an irradiation of $36 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, for a period of 35 days. In general, a differentiated response of the clones in relation to intensity, texture, color and oxidation degree of the callus could be observed, due to the growth regulator treatments, for the leaf as well as for the stem explants. For the three examined clones, the best results in cluster forming were observed for the treatments with a combination of the growth regulators TDZ (0.5 mg L^{-1}) and ANA (0.1 mg L^{-1}), achieving 100% of callus forming in the leaf explant. Node-formed callus appeared in the petiole region of the leaf explants, and compact node

structures, mainly in the extremities of the stem explants. These regions are responsible for the regeneration of adventitious buds in the leaf explants for clone 1 and in the stem explants for clones 1 and 3. The best regeneration response was obtained with 1.0 mg L^{-1} BAP for clone 1, using leaf explant, and for clone 3, using stem explant. Histological analyses revealed the adventitious origin of the differentiated buds brought forth by leaf and stem explants. However, precaution is recommended in relation to the use of stem explants for regeneration by organogenesis *in vitro*, due to the possibility of accidental inclusions of axillary buds during the fabrication of the explants, whose production is lower, compared to that of the leaf explant.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* inclui a maioria das espécies florestais utilizadas para o estabelecimento de plantações em áreas tropicais e subtropicais do mundo, sendo a clonagem de indivíduos superiores alternativa de grande importância e de aplicação no setor florestal.

Para as espécies de *Eucalyptus*, a estaquia tem sido o principal método de propagação vegetativa, com vistas à produção de mudas para o estabelecimento de plantações clonais, resultando em aumento da produtividade e uniformidade dos plantios. Entretanto, o método da estaquia apresenta algumas dificuldades no sistema de produção de mudas, como de enraizamento e brotação adventícia em estacas de certos clones, afetando o desenvolvimento da futura árvore, aliado à limitação de produção comercial (XAVIER et al., 1997). Nesse contexto, a micropropagação tem sido considerada como alternativa na propagação clonal, quando não é possível multiplicar vegetativamente uma espécie pelos métodos convencionais (GEORGE, 1993; TIBOK et al., 1995).

Atualmente, a micropropagação de *Eucalyptus* tem sido utilizada no rejuvenescimento de clones, visando à formação do jardim microclonal, o qual constitui a base para o método da microestaquia. O desenvolvimento e a aplicação desse método em *Eucalyptus* tiveram como origem os trabalhos realizados por ASSIS et al. (1992), caracterizando-se pela utilização de microestacas extraídas a

partir de clones rejuvenescidos *in vitro*, para serem, posteriormente, enraizadas em casa de vegetação.

Aliada à micropropagação, nos últimos anos, a transformação genética em plantas lenhosas tem despertado atenção no setor florestal, sendo uma realidade em algumas situações. Trabalhos com *Eucalyptus* têm sido desenvolvidos nessa linha (CHEN et al., 1996; SERRANO et al., 1996; MULLINS et al., 1997; HO et al., 1998), contudo o sucesso de programas de transformação estável de genes depende da capacidade de regeneração da espécie em estudo (FERREIRA et al., 1998).

Segundo MULLINS et al. (1997), os procedimentos convencionais de micropropagação em *Eucalyptus* se dão pela ativação de gemas axilares em cultura. Entretanto, a propagação *in vitro* por organogênese de explantes foliares também possui a capacidade de regenerar grande número de plantas, e com potencial para ser automatizada.

Protocolos eficientes de micropropagação de *Eucalyptus* pela via organogênica, conforme apresentados por SUBBAIAH e MINOCHA (1990), TIBOK et al. (1995), CHEN et al. (1996), AZMI et al. (1997), MULLINS et al. (1997), HO et al. (1998) e BANDYOPADHYAY et al. (1999), utilizaram materiais juvenis como fonte de explantes, como cotilédones e hipocótilos. Contudo, métodos eficientes para regeneração de clones selecionados pela via organogênica, utilizando como explantes folhas e segmentos caulinares de material rejuvenescido, poderiam constituir-se em alternativa de multiplicação vegetativa, além de atender a programas de transformação genética. Dessa forma, o objetivo do presente estudo objetivou avaliar os efeitos dos reguladores de crescimento TDZ, BAP e ANA no desempenho organogênico *in vitro* de explantes foliares e caulinares na regeneração de três clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Propagação clonal

A propagação clonal ou vegetativa consiste na produção de plantas com o genótipo idêntico daquela que lhe serviu de fonte de propágulo, utilizando-se para esse fim partes dessa planta, como ramos, gemas, folhas, raízes e outros (HARTMANN et al., 1997).

Os trabalhos de propagação vegetativa com o gênero *Eucalyptus* tiveram início nos anos 50, em Marrocos (ASSIS, 1996). No Brasil, os estudos pioneiros com êxito no enraizamento de estacas de *Eucalyptus* remontam ao ano de 1975 (IKEMORI, 1975), sendo a primeira plantação clonal comercial instalada em 1979.

Hoje, o Brasil ocupa posição destacada no cenário tecnológico mundial, em termos de silvicultura clonal de espécies de *Eucalyptus* (SILVA, 2001). Assim, a propagação vegetativa é considerada estratégica na melhoria da produtividade e qualidade das florestas (XAVIER e COMÉRIO, 1996), a qual combina o uso de clones selecionados e silvicultura intensiva (CHAPERON, 1987).

De modo geral, a propagação vegetativa proporciona maior uniformidade dos plantios (CHAPERON, 1987; ASSIS, 1996; COMÉRIO et al., 1996), adaptação de clones específicos para determinados sítios e maximização da produção de madeira em quantidade e qualidade desejáveis para determinados fins (XAVIER e

COMÉRIO, 1996), além de propiciar redução na idade e custos de exploração e transporte (FERREIRA, 1992).

Entre os métodos de propagação clonal utilizados em grande escala, o da estaquia é o mais difundido (HARTMANN et al., 1997). Uma enorme vantagem da estaquia como método de propagação vegetativa se deve ao fato de grande número de estacas poder ser obtido de uma única planta (DURAND-CRESWELL et al., 1982). Entretanto, a estaquia apresenta alguns obstáculos ao processo de produção de mudas, como dificuldades de enraizamento e de formação de brotações adventícias em estacas de certos clones (XAVIER et al., 1997). Mais recentemente, o desenvolvimento dos métodos de microestaquia e da miniestaquia de *Eucalyptus* tem permitido avanço considerável na propagação clonal de *Eucalyptus*. Em clones com maior dificuldade de enraizar, existe maior eficiência de enraizamento em resposta ao rejuvenescimento *in vitro* pelo uso da microestaquia (TITON, 2001).

2.2. Micropropagação

A propagação de plantas *in vitro* constitui-se em uma técnica de propagação vegetativa cuja aplicação mais direta é a cultura de células e tecidos vegetais (HARTMANN et al., 1997; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A micropropagação é usualmente mais rápida que outros métodos de propagação vegetativa e importante ferramenta onde não é possível propagar vegetativamente uma espécie pelos métodos convencionais (GEORGE, 1993; PIERIK, 1997). Entre as aplicações, a micropropagação tem sido utilizada na preservação de germoplasma, produção de plantas livres de doenças (HARTMANN et al., 1997), multiplicação rápida de plantas em períodos de tempo e espaço físico reduzidos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), rejuvenescimento clonal e produção de mudas de clones selecionados (COMÉRIO et al., 1996). Em *Eucalyptus*, também tem sido utilizada para aumentar a taxa de multiplicação na fase inicial do programa de propagação vegetativa, visando encurtar o tempo entre a

seleção das estacas e o uso do clone em plantios comerciais (CHAPERON, 1987), além de constituir base para o emprego de outras técnicas biotecnológicas.

Conforme o explante utilizado e sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ser conduzida de três maneiras: multiplicação por meio da proliferação de gemas axilares ou apicais, multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese e multiplicação via embriogênese somática (THORPE et al., 1991; BONGA e VON ADERKAS, 1992; LAKSHMI SITA, 1993; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A micropropagação pela proliferação de gemas axilares e meristemas apicais provenientes de plântulas, assim como de material adulto, tem sido utilizada com sucesso em espécies de *Eucalyptus* (LAKSHMI SITA, 1993). Esta técnica envolve o isolamento de órgãos meristemáticos pré-formados (gemas axilares ou apicais), que são estimulados a crescer mediante a manipulação de reguladores de crescimento no meio de cultura, dando origem a novas partes aéreas, que, por sua vez, repetem o mesmo processo. Tufos de partes aéreas são formados, os quais são subdivididos em conjuntos menores, dando origem a novos explantes (BONGA e VON ADERKAS, 1992; PIERIK, 1997; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Um problema relativamente comum nesse método de micropropagação se deve à contaminação do material por bactérias endógenas, que não são eliminadas durante o processo de desinfestação (PIERIK, 1997), representando sérios problemas no estabelecimento das culturas. No controle desse tipo de contaminação, a utilização de antibióticos é de consenso, entretanto dificilmente se eliminam por completo as bactérias (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Embora possam ocorrer contaminações por bactérias endógenas, a proliferação de gemas pré-formadas se constitui em importante método de micropropagação. Por reproduzir *in vitro* um fenômeno natural, este sistema é mais facilmente controlado e apresenta fidelidade genética muito alta, em que as gemas pré-formadas, pelo fato de possuírem determinação para o crescimento vegetativo e estarem satisfeitas as necessidades nutricionais, irão se desenvolver naturalmente em plantas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Esse é geralmente mais simples que outros métodos de micropropagação, sendo a taxa de propagação

relativamente rápida, e as plantas resultantes desse processo apresentam bom crescimento em razão, provavelmente, do rejuvenescimento promovido por sucessivos subcultivos do material (PIERIK, 1997).

Quanto à organogênese, esta dá-se pela indução de gemas adventícias diretamente sobre os explantes ou sobre uma massa de células não-organizadas, denominada calo (THORPE et al., 1991; BONGA e VON ADERKAS, 1992). Quando as gemas se formam diretamente sobre os explantes, a organogênese é denominada direta, ocorrendo em tecidos que apresentam potencial morfogênico na planta *in vivo*, mas que, em geral, não se expressa como câmbio vascular, base de pecíolo em dicotiledôneas, base de folhas e escamas em bulbos de monocotiledôneas e segmento de raízes, entre outros. Quando a formação da gema é precedida pela formação de calo, a organogênese é denominada indireta, de onde surgem gemas que crescem e se desenvolvem em novas partes aéreas. As multiplicações sucessivas podem dar-se pela subdivisão do calo e manutenção de um sistema adventício, ou pela alteração do processo para proliferação axilar (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Em certas espécies, gemas adventícias podem surgir diretamente do tecido do explante, não havendo a formação prévia de calos, o que proporciona um método confiável de micropropagação. A indução direta de gemas é dependente da natureza do órgão de onde se derivou o explante, sendo também altamente dependente do genótipo da planta (GEORGE, 1993).

Tanto a micropropagação por gemas pré-formadas quanto a organogênese levam à formação de uma planta através da produção de brotos unipolares, que devem ser, subseqüentemente, enraizados em outra etapa da produção da muda.

Embriogênese somática, adventícia ou assexual são termos usualmente empregados para designar o processo pelo qual células diplóides ou somáticas se desenvolvem por meio de diferentes estádios embriogênicos, dando origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (Williams e Maheswaran, 1986, citados por GUERRA et al., 1998).

A embriogênese somática leva à formação de um embrião através dos passos que são freqüentemente similares à formação do embrião zigótico (THORPE et al.,

1991). O embrião somático passa pelos estádios de desenvolvimento pró-embriônicos propriamente ditos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar (GUERRA et al., 1998). Entretanto, o tamanho final dos cotilédones é usualmente reduzido, não havendo o desenvolvimento de endosperma e da camada protetora da semente (HARTMANN et al., 1997). Uma particularidade dos embriões somáticos é a presença de um sistema vascular fechado, sem conexão vascular com os tecidos do explante inicial (GUERRA et al., 1998).

Do ponto de vista do potencial de multiplicação, sistemas embriogênicos podem ser perpetuados via embriogênese repetitiva. Considerando que, teoricamente, uma cultura iniciada de um único explante pode produzir um número ilimitado de embriões, o processo torna-se altamente atrativo para produção massiva de plantas clonais (GUPTA et al., 1991). Aliado a isso, tem-se a possibilidade de produção artificial de sementes pelo encapsulamento dos embriões somáticos (TERMIGNONI et al., 1996), com um mínimo de manipulação e espaço físico de laboratório (BONGA e VON ADERKAS, 1992; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Entre as limitações apresentadas pela técnica de embriogênese somática, dificultando sua utilização como sistema de micropropagação, estão a necessidade de obtenção de um sistema de embriogênese reproduzível em larga escala (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998), a variabilidade genética indesejável introduzida pelo processo, a perda da capacidade regenerativa pelos subcultivos sucessivos (PIERIK, 1997; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998) e a dificuldade ou impossibilidade de se estabelecer um sistema de indução por embriogênese somática em algumas espécies (PIERIK, 1997).

Grande número de trabalhos sobre indução de embriões somáticos em plantas ornamentais, espécies de valor agrícola e árvores frutíferas, tem sido realizado, contudo em espécies florestais, embora tenham sido feitas pesquisas referentes à embriogênese somática em coníferas; trabalhos com dicotiledôneas ainda são escassos (TERMIGNONI et al., 1996).

2.2.1. Meios de cultura e reguladores de crescimento

Os componentes do meio de cultura de tecidos vegetais são divididos em quatro grandes categorias: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e aminoácidos. Compõem, ainda, o meio de cultura os reguladores de crescimento, carboidratos e vários outros compostos, podendo ser líquidos ou sólidos (BONGA e VON ADERKAS, 1992).

Segundo BONGA e VON ADERKAS (1992), existem meios que são originais, como os de White (WHITE, 1943), MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), B5 (GAMBORG et al., 1968) e WPM (LLOYD e McCOWN, 1981), sendo muitos outros modificações destes.

A lista dos minerais incluídos na maioria dos meios utilizados hoje foi definida por White, sendo, durante anos, utilizado como meio básico para a cultura de extensa gama de tecidos de diferentes espécies. Na tentativa de otimizar o crescimento de calos *in vitro*, modificações posteriores foram feitas, e o meio MS foi desenvolvido a partir de testes de suplementação do meio White com extrato de folhas de fumo. O meio MS, juntamente com o B5, é o mais usado na cultura de tecidos da grande maioria das espécies (CALDAS et al., 1998), além do meio WPM, elaborado principalmente para propagação de espécies lenhosas (GEORGE, 1993; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Na escolha do meio de cultura, deve-se levar em conta se este é apropriado à espécie de planta e ao tipo de cultura em estudo. Quando se pesquisa uma nova situação, é sensato, no primeiro momento, o uso de meios de cultura e métodos realizados com sucesso em outras pesquisas, sendo as mudanças e os ajustes feitos na tentativa de melhorar o crescimento, a morfogênese ou a taxa de multiplicação (GEORGE, 1993).

Na micropropagação de eucalipto, a grande variação genotípica em resposta aos meios de cultura constitui-se em importante fator a ser considerado. Frequentemente, com a utilização de um meio publicado para uma espécie em particular, é impossível obter bons resultados para alguns genótipos de interesse, sendo mais adequado, e menos custoso, realizar experimentos visando à melhoria da

“performance” *in vitro* dos genótipos recalcitrantes (McCOMB, 1995). Uma vez que cada espécie apresenta uma resposta diferenciada *in vitro*, torna-se necessária a adequação de meios de cultura conhecidos e que apresentem bons resultados em uma espécie em particular, como também testar meios específicos.

Quanto aos reguladores de crescimento, das várias classes conhecidas, as auxinas e citocininas são, sem dúvida, as mais importantes na regulação do crescimento e da morfogênese na cultura de tecidos e órgãos vegetais. Dentro dessas duas classes, reguladores sintéticos têm sido descobertos apresentando atividade biológica que se igualam ou excedem aos reguladores de crescimentos equivalentes (GEORGE, 1993).

As auxinas estão envolvidas na divisão e alongamento celular e na síntese de parede celular. A principal auxina natural é o AIA, o qual freqüentemente não tem sido utilizado em cultura de tecidos devido à sua instabilidade (BONGA e VON ADERKAS, 1992). Opcionalmente, as auxinas sintéticas mais comumente usadas são 2,4-D, AIB e ANA (GEORGE, 1993).

Uma das principais funções da citocinina na cultura de tecidos é a indução de gemas adventícias, bem como a proliferação de gemas axilares através da supressão da dominância apical, também requeridas para formação de calos e outros processos envolvendo a divisão celular. As citocininas comumente aplicadas são BAP, cinetina, TDZ, 2-iP e zeatina, sendo as duas últimas citocininas naturais (BONGA e VON ADERKAS, 1992).

O tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*, sendo as concentrações de auxinas freqüentemente baixas se comparadas com as das citocininas para manter um balanço auxina/citocinina menor que 1 (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O modo de interação entre auxinas e citocininas é freqüentemente dependente da espécie da planta e do tipo de tecido utilizado na cultura (COENEN e LOMAX, 1997; PIERIK, 1997). A maneira complexa que os reguladores de crescimento e as células interagem indica que, se o tecido não está em um estágio responsivo, este não irá responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações esses reguladores

são utilizados. Ausência na resposta a um regulador de crescimento é frequentemente um problema maior quando explantes de plantas adultas são utilizados, em comparação com material juvenil (BONGA e VON ADERKAS, 1992).

2.2.2. Micropropagação em *Eucalyptus*

Um dos principais objetivos da propagação clonal é multiplicar plantas em idade suficiente para serem demonstradas as suas características superiores (THORPE et al., 1991). Na maioria das espécies de *Eucalyptus*, até que seja alcançado o estágio em que as árvores possam ser avaliadas para características desejáveis, elas já se encontram na fase adulta, sendo dificultada a utilização dos métodos clássicos de propagação vegetativa (DE FOSSARD et al., 1977).

As técnicas de cultura de tecidos oferecem a possibilidade de propagação de árvores selecionadas em todas as idades (CRESSWELL e DE FOSSARD, 1974; DE FOSSARD, 1974), constituindo alternativa econômica e adequada em relação aos métodos clássicos de propagação vegetativa. Embora muitas espécies lenhosas possam ser propagadas a partir de segmentos nodais coletados de árvores adultas, algumas somente podem ser propagadas de material proveniente de sementes. Contudo, a importância da utilização de explantes de árvores adultas deve-se ao fato da possibilidade de se propagarem árvores selecionadas de reconhecido valor genético (MURALIDHARAN e MASCARENHAS, 1987).

Estudos preliminares de micropropagação de *Eucalyptus* foram realizados no princípio da década de 70. Desde então, várias espécies e híbridos de *Eucalyptus* têm sido propagados *in vitro*, utilizando segmentos nodais (CRESSWELL e DE FOSSARD, 1974; DE FOSSARD et al., 1977; BENNETT e McCOMB, 1982; WATT et al., 1995), cultura de nódulos (WARRAG et al., 1991; ITO et al., 1996), embriogênese somática (MURALIDHARAN e MASCARENHAS, 1987; WATT et al., 1991; TERMIGNONI et al., 1996; MAJOR et al., 1997) e organogênese (KITAHARA e CALDAS, 1975; MURALIDHARAN e MASCARENHAS, 1987;

SUBBAIAH e MINOCHA, 1990; LAINÉ e DAVID, 1994; TIBOK et al., 1995; AZMI et al., 1997; HERVÉ et al., 2001).

O sucesso na micropropagação de *Eucalyptus* pela proliferação de gemas axilares utilizando material adulto de várias espécies evidencia que a técnica pode ser usada no rejuvenescimento de material adulto (BONGA e VON ADERKAS, 1992; XAVIER et al., 1997), sendo atualmente utilizada no rejuvenescimento de clones, com vistas à formação do jardim microclonal, que constitui a base para o processo de microestaquia (TITON, 2001).

O desenvolvimento e a aplicação da microestaquia em *Eucalyptus* tiveram como origem os trabalhos realizados por ASSIS et al. (1992) e se basearam no aproveitamento máximo da juvenilidade dos propágulos vegetativos. Na microestaquia são utilizados como propágulos microestacas oriundas de clones rejuvenescidos *in vitro*, colocados para enraizar em ambiente de casa de vegetação, com umidade e temperatura controladas. Segundo TITON (2001), em clones com maior dificuldade de enraizar existe maior eficiência de enraizamento, quando antes esses clones eram rejuvenescidos *in vitro* pelo uso da microestaquia.

2.3. Micropropagação por organogênese

Os eventos organogênicos acontecem mediante a desdiferenciação e rediferenciação celular, dependendo da retomada da atividade meristemática em células maduras diferenciadas ou em um tecido calogênico desorganizado (ZIV 1999). O processo de organogênese *in vitro* é considerado complexo, com a atuação de múltiplos fatores externos e internos envolvendo uma interação entre a fonte de explante, o meio de cultura e fatores do ambiente (GEORGE, 1993; PIERIK, 1997; JOY IV e THORPE, 1999). Depende, também, da ação de reguladores de crescimento exógenos, em particular auxinas e citocininas, como também da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais durante o período de cultivo (SUGIYAMA, 1999).

Duas fases principais estão envolvidas na rota morfogênica *in vitro*: a fase de indução e a fase de expressão, ou seja, indução das células em adquirir competência organogênica e a expressão desse potencial no desenvolvimento de órgãos (ZIV, 1999). O conceito de competência vem da idéia de que todas as células nucleadas são totipotentes e, portanto, hábeis para formar outro indivíduo dos quais eles eram originalmente derivados (JOY IV e THORPE, 1999). As células competentes em cultivo são, então, canalizadas e determinadas para formação de um órgão específico sobre a influência de determinado balanço hormonal (SUGIYAMA, 1999).

Christianson e Warnick (1988), citados por THORPE e KUMAR (1993), relataram que três fases fisiológicas estão envolvidas na organogênese: (1) aquisição da competência, por meio da qual a célula torna-se capaz de indução na presença de um indutor; (2) indução ou determinação de uma célula ou células em se diferenciar e produzir o órgão de escolha; e (3) crescimento e expressão da diferenciação. Para otimizar a organogênese, os requerimentos temporais para cada uma dessas fases devem ser empiricamente determinados para dada espécie e, usualmente, para diferentes genótipos dentro da espécie. O motivo pelo qual algumas células e explantes não produzem gemas em cultura pode ser devido a fatores genéticos e epigenéticos, como também fisiológicos (JOY IV e THORPE, 1999).

Em muitas plantas lenhosas, somente explantes juvenis proporcionam condições de serem estabelecidos em cultivo. Explantes tomados diretamente da árvore apresentam problemas quanto a contaminação e exsudados, provocando seu escurecimento e morte, o que pode ser evitado pelo uso de explantes procedentes de culturas estéreis (DURAND-CRESSWELL et al., 1982). O estabelecimento de explantes adultos pode ser melhorado quando a planta-mãe passa por algum tratamento de rejuvenescimento (GEORGE, 1993).

A organogênese pode ser utilizada na conservação de germoplasma *in vitro*, em que estudos sobre espécies florestais têm demonstrado a capacidade de manutenção do potencial morfogênico após longos períodos de subcultivo de calos em *Pinus* (GLADFELTER e PHILLIPS, 1987; WAGLEY et al., 1987) e *Eucalyptus*

(WARRAG et al., 1991; ITO et al., 1996). Pode, ainda, auxiliar programas de propagação clonal pelo desenvolvimento de protocolos eficientes de regeneração em diversas espécies, como também na obtenção de transformantes via transformação genética.

2.3.1. Micropropagação por organogênese em *Eucalyptus*

Em plantas lenhosas, embora a micropropagação seja possível através de cultura de ápices caulinares e gemas axilares, organogênese e embriogênese somática estão ainda limitadas a um pequeno número de espécies (BONGA, 1987). Existem várias espécies, incluindo as florestais, que são difíceis de se manipular *in vitro*, sendo denominadas recalcitrantes.

Na micropropagação de plantas adultas recalcitrantes, um fator importante é a escolha do explante, visto que, em muitos casos, apenas poucos tecidos darão respostas desejáveis (BONGA e ADERKAS, 1992), sendo os explantes juvenis aqueles com maior habilidade de regeneração.

DE FOSSARD et al. (1977), trabalhando com cultivo *in vitro* de segmentos nodais de quatro espécies de *Eucalyptus*, observaram o desenvolvimento de gemas adventícias a partir de calos formados em material proveniente de plântulas. No entanto, quando os segmentos nodais procediam de plantas adultas, embora também tenha ocorrido a formação de calos na região nodal, nenhum desenvolvimento de gemas foi observado.

AZMI et al. (1997), em trabalho visando à organogênese em *Eucalyptus globulus*, utilizaram como fonte de explantes cotilédones e hipocótilos de plântulas e folhas e entrenós de clones micropropagados. Eles observaram que as gemas formadas surgiam, principalmente, na região onde ocorreu a excisão no cotilédone, com a ressalva de que, no hipocótilo, as gemas surgiam nas partes distal e proximal e que explantes excisados de folhas ou de segmentos internodais *in vitro* foram totalmente incompetentes para regenerar gemas em todas as condições experimentadas.

WARRAG et al. (1991), em experimentos sobre organogênese em híbridos de *Eucalyptus grandis*, utilizaram explantes de inflorescências imaturas, partes florais (filamentos de estames e tecidos do ovário), embriões zigóticos, hipocótilos e ápices caulinares, dos quais somente em hipocótilos foi observada a formação de gemas após a constituição de calos nodulares.

O tecido nodular obtido de hipocótilo no trabalho de WARRAG et al. (1991) foi mantido em subcultivo por mais de três anos, sem que perdesse a habilidade para regenerar. Resultados semelhantes sobre a manutenção da capacidade organogênica em calos subcultivados foram citados por ITO et al. (1996), em *Eucalyptus botryoides*, nos quais calos nodulares mantiveram a capacidade de regeneração por até quatro anos. Também, HO et al. (1998), em trabalhos com *Eucalyptus camaldulensis*, mantiveram a habilidade organogênica dos calos subcultivados por mais de um ano.

Um fator importante a ser considerado na organogênese é a idade do explante. TIBOK et al. (1995), trabalhando com regeneração em *Eucalyptus urophylla*, obtiveram melhores resultados utilizando como fonte de explantes hipocótilos coletados 14 dias após a germinação. Resultado semelhante foi observado por BANDYOPADHYAY et al. (1999), que usaram como fonte de explante cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus nitens* e *Eucalyptus globulus*. No trabalho de AZMI et al. (1997), hipocótilos e cotilédones de *Eucalyptus globulus* responderam melhor com 8 a 15 dias de idade (hipocótilo alongado e cotilédones completamente expandidos, mas sem folhas).

Em grande parte dos trabalhos realizados objetivando a propagação *in vitro* de *Eucalyptus* via organogênese, utilizaram-se materiais juvenis como fonte de explantes, como hipocótilos (KITAHARA e CALDAS, 1975; TIBOK et al., 1995; AZMI et al., 1997; HO et al., 1998), cotilédones (AZMI et al., 1997), caule e folhas de material juvenil proveniente de sementes (SUBBAIAH e MINOCHA, 1990; CHEN et al., 1996; MULLINS et al., 1997) e embriões zigóticos (SERRANO et al., 1996). Contudo, a possibilidade e otimização de protocolos eficientes de micropropagação de clones superiores poderia constituir-se em alternativa no

processo de multiplicação vegetativa (MULLINS et al., 1997), como também atender a programas de transformação genética.

LAINÉ e DAVID (1994), utilizando, em trabalhos de organogênese *in vitro*, explantes foliares de clones micropropagados de *Eucalyptus grandis*, constataram que existem diferenças no requerimento com relação aos reguladores de crescimento, para organogênese, entre os diferentes clones e que o tamanho do explante não afeta a habilidade destes de produzir gemas. Esses autores verificaram, também, que as condições de luminosidade constituem importante parâmetro, cujos melhores resultados são obtidos quando as primeiras quatro semanas de cultivo são conduzidas em ausência de luz. Os efeitos benéficos do escuro durante a iniciação da cultura também foram observados para organogênese em *Eucalyptus tereticornis* por SUBBAIAH e MINOCHA (1990), visto que a ausência de luz retarda o escurecimento dos explantes, presumivelmente causado por compostos fenólicos.

HERVÉ et al. (2001), trabalhando com clones de *Eucalyptus gunnii* e utilizando folhas e segmentos internodais e nodais como fonte de explante, observaram, nos explantes foliares, a presença de protuberâncias com células densamente coesas, que apareciam e se desenvolviam inicialmente na parte proximal do pecíolo da folha. Essas protuberâncias eram freqüentemente rodeadas por células de calos com coloração esbranquiçada a amarelada, em que a iniciação de gemas ocorria a partir da superfície dessas protuberâncias, após serem transferidas para meio de regeneração. Nos segmentos internodais, as protuberâncias densas se desenvolviam nas extremidades destes, no local dos cortes, para a obtenção do explante. Eles observaram em seus experimentos, em todas as condições de cultura testadas, que as folhas eram totalmente incompetentes para formar gemas quando a parte proximal ao pecíolo era removida. A análise histológica dos calos provenientes de folhas, coletadas em diferentes estágios, evidenciou que a parte proximal da folha consistia de um sistema vascular rodeado por parênquima limitado em ambos os lados pela epiderme, e, após duas semanas de cultura no meio de regeneração, protuberâncias eram produzidas na parte proximal, estando essas conectadas com os vasos da folha. Numerosas divisões foram observadas nas células dos vasos e próximos a elementos traqueais, indicando,

fortemente, que as protuberâncias originaram de células do câmbio do sistema vascular da parte proximal ao pecíolo da folha sem, contudo, excluir que algumas células podem ter se originado do parênquima.

Nos trabalhos realizados por AZMI et al. (1997), a habilidade de regeneração de gemas em hipocótilos e cotilédones foi relacionada à presença de glândulas secretoras de óleo em um estágio de germinação, quando a secreção desse óleo ainda não havia ocorrido. Essa habilidade de regenerar parece ser o resultado da combinação de estágios adequados e passageiros de diferenciação, em que são conduzidas as células competentes e a composição do meio de cultura, permitindo a formação de calos e a rediferenciação de novas glândulas secretoras de óleo na periferia do calo. Concluiu-se que essas células não estavam totalmente determinadas durante a excisão, mas ainda eram capazes de desviar sua rota de desenvolvimento e se desdiferenciar em condições adequadas de cultura.

Embora a micropropagação de *Eucalyptus* possa ser usada para uma rápida propagação clonal, provavelmente o maior ganho surja através de técnicas de engenharia genética envolvendo a inserção de genes para características específicas (TIBOK et al., 1995). Trabalhos relacionados à transformação genética em *Eucalyptus* são relativamente recentes, como CHEN et al. (1996), SERRANO et al. (1996), MULLINS et al. (1997) e HO et al. (1998), contudo o sucesso de programas de transformação estável de genes depende da capacidade de regeneração da espécie em estudo (FERREIRA et al., 1998). A estratégia de plantas transgênicas mostra-se vantajosa, uma vez que um gene responsável por determinada característica, quando identificado, pode ser isolado, clonado, seqüenciado e utilizado por meio de transformação genética (BRASILEIRO e CARNEIRO, 1999).

Diante da escassez de informações referentes à organogênese *in vitro* em tecidos adultos de *Eucalyptus*, faz-se necessária a adequação de protocolos de regeneração utilizando explantes coletados de clones selecionados, em que a utilização de material rejuvenescido *in vitro* possibilitaria melhor “performance” na capacidade organogênica dos explantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material experimental

Foram utilizados três clones híbridos de *Eucalyptus grandis* provenientes das empresas V&M Florestal LTDA. (clone 1 = híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) e Celulose Nipo-Brasileira S.A. - CENIBRA (clones 2 e 3 = híbrido de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*).

Esses clones foram inicialmente propagados vegetativamente por estaquia, introduzidos em laboratório de cultura de tecidos pela técnica de micropropagação via gemas axilares, os quais passaram por sucessivos subcultivos na fase de multiplicação, visando ao seu rejuvenescimento. Os clones 1, 2 e 3 encontravam-se em banco clonal no 25, 19 e 22^o subcultivos, respectivamente, quando foi iniciado o presente estudo.

O meio de cultura utilizado para multiplicação do material foi composto pelos sais básicos de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), vitaminas de White (WHITE, 1943), acrescidos de mio inositol (100 mg L^{-1}), PVP (800 mg L^{-1}), sacarose (3%), ágar granulado MERCK (0,5%), $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, com pH ajustado para 5,8.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

3.2. Metodologia

O presente trabalho de propagação por organogênese *in vitro* foi composto de duas etapas, sendo a primeira referente à produção de gemas alongadas *in vitro* para obtenção dos explantes foliar e caulinar e, a segunda, para obtenção dos calos e regeneração das gemas adventícias, conforme descrito nos tópicos subseqüentes.

3.2.1. Obtenção dos explantes

Para obtenção dos explantes foliar e caulinar, foi utilizada a técnica de micropropagação através da proliferação de gemas axilares, conforme descrito no item 3.1, modificando-se apenas a concentração dos reguladores de crescimento para $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, visando promover o alongamento das brotações em banco clonal. A partir das brotações alongadas, obtiveram-se os explantes foliares da parte superior destas (até o 3^o nó), sendo deixada uma parte do pecíolo, enquanto os explantes caulinares foram obtidos dos segmentos internodais extraídos das brotações, tomando-se o cuidado para que esses segmentos internodais não contivessem gemas axilares (Figura 1).

3.2.2. Micropropagação por organogênese

No presente trabalho, a micropropagação por organogênese foi composta pelas fases de indução de calo e da regeneração das gemas. Foram utilizados explantes foliar e caulinar em meio de cultura específico e submetido a diferentes concentrações e tipos de reguladores de crescimento descritos nos próximos itens.

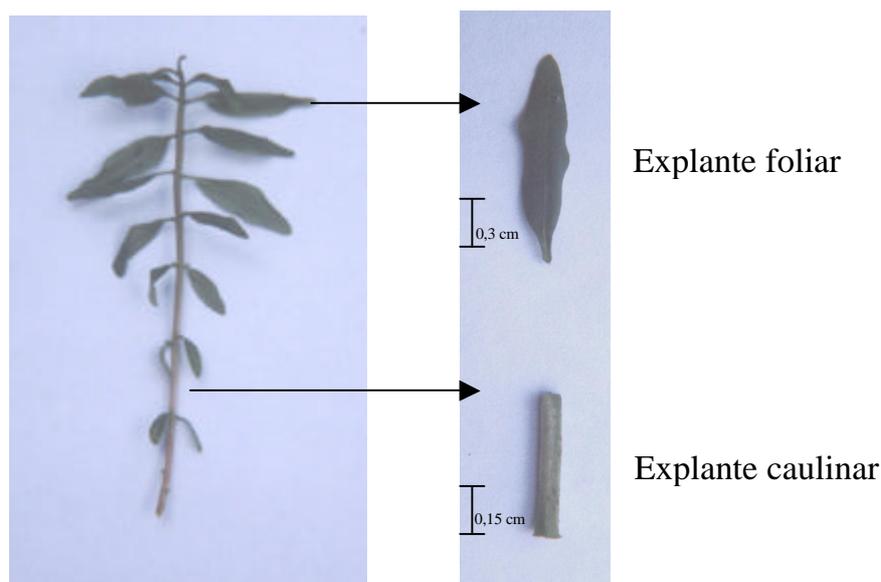


Figura 1 – Explantes foliar e caulinar de clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* utilizados na organogênese *in vitro* do presente estudo.

3.2.2.1. Meios de cultura e reguladores de crescimento

Para os explantes foliares, foi utilizado o meio de cultura LD com base no trabalho de LAINÉ e DAVID (1994) e para os explantes caulinares, o meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

- a) **Explante foliar:** o meio de cultura utilizado na fase de indução de calo foi composto pelos sais LD: [KNO_3 (750 mg L^{-1}), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (250 mg L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (250 mg L^{-1}) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (106 mg L^{-1})], micronutrientes e FeEDTA na metade da concentração de MS, mio inositol (100 mg L^{-1}), sacarose (2%), vitaminas compostas por [ácido nicotínico (10 mg L^{-1}), tiamina.HCl (10 mg L^{-1}), pantotenato de cálcio (1 mg L^{-1}), piridoxina.HCl (1 mg L^{-1}) e biotina ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$)], MES (600 mg L^{-1}), caseína hidrolisada (250 mg L^{-1}), PVP (800 mg L^{-1}) e Phytigel (0,25%), com pH ajustado para 5,7. Na fase de regeneração de gemas, utilizou-se o mesmo meio de cultura, alterando o ferro e micronutrientes para suas concentrações totais, de acordo com o meio MS.

b) **Explante caulinar:** para os explantes caulinares nas fases de indução de calo e regeneração de gemas, foi utilizado o meio MS acrescido de mio inositol (100 mg L⁻¹), PVP (800 mg L⁻¹), sacarose (2%) ágar granulado MERCK (0,5%), com pH ajustado para 5,6.

Para minimização das contaminações por bactérias, acrescentaram-se aos meios de cultura 300 mg L⁻¹ do antibiótico Timentim, após autoclavagem.

Quanto à avaliação dos tipos e concentrações de reguladores de crescimento na organogênese dos três clones de *Eucalyptus*, foram utilizados, na fase de indução de calos, combinações de TDZ e ANA e de BAP com ANA (Quadro 1). Na fase de regeneração de gemas, foram utilizadas combinações de BAP e ANA (Quadro 2).

Quadro 1 - Reguladores de crescimento utilizados na fase de indução de calos em explantes foliar e caulinar de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na micropropagação por organogênese

| Tratamentos | Reguladores de crescimento |
|-------------|---------------------------------|
| | TDZ + ANA (mg L ⁻¹) |
| 1 | 0,5 + 0,5 |
| 2 | 0,5 + 0,1 |
| 3 | 0,05 + 0,01 |
| 4 | 1,0 + 0,1 |
| | BAP + ANA (mg L ⁻¹) |
| 5 | 0,1 + 0,1 |
| 6 | 0,5 + 0,5 |
| 7 | 1,0 + 3,0 |
| 8 | 1,0 + 1,0 |

Quadro 2 - Reguladores de crescimento utilizados na fase de regeneração de gemas a partir de calos induzidos em explantes foliar e caulinar de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na micropropagação por organogênese

| Tratamentos | Reguladores de Crescimento BAP + ANA (mg L ⁻¹) |
|-------------|---|
| 1 | 0,2 + 0,2 |
| 2 | 0,3 + 0,0 |
| 3 | 0,5 + 0,2 |
| 4 | 1,0 + 0,0 |
| 5 | 1,0 + 3,0 |
| 6 | 3,0 + 0,0 |
| 7 | 0,1 + 0,05 |

3.2.2.2. Condução e avaliações experimentais

Os explantes foliar e caulinar foram colocados nos meios de indução de calos, conforme descrito em 3.2.2.1, em placas de Petri descartáveis estéreis (60 x 15 mm). Cada placa foi composta por 12 mL de meio de cultura e cinco explantes, sendo 10 placas por tratamento de reguladores de crescimento, conforme apresentado no Quadro 1.

Na fase de indução de calos, as placas foram mantidas em regime de escuridão à temperatura de 27 ± 2 °C pelo período de cinco semanas, sendo, ao final

desse período, realizada uma avaliação quanto à intensidade de calejamento, aspecto geral do calo (textura e coloração) e oxidação do explante. O critério adotado na avaliação da intensidade de calejamento foi: 1= pouco calejamento, 2= calejamento médio e 3= calejamento intenso.

Quanto à textura, a qual diz respeito à coesão entre as células que formam o calo, no presente estudo ela foi avaliada em friável (células frouxamente ligadas), compacta (células firmemente ligadas) e texturas intermediárias entre estas, classificadas como semifriável e semicompacta. A textura semicompacta é caracterizada como aquela intermediária entre a compacta e a semifriável e a semifriável é a intermediária entre a semicompacta e a friável.

Em relação às colorações avaliadas na fase de indução de calos, elas foram classificadas como branco, branco com bege, bege-claro e bege-escuro. O bege-escuro refere-se a calos de coloração mais escura, mas que não estão oxidados.

Em observações quanto à região do calejamento, nos explantes foliares, identificou-se tal fato como tendo ocorrido somente no pecíolo, no pecíolo e limbo e no pecíolo e limbo abaxial. No explante caulinar, foi verificado se o calejamento ocorreu em todo o explante ou somente nas extremidades dele. Foi verificada também a presença de oxidação.

Com base na avaliação realizada, na fase de indução de calo foi selecionado o melhor tratamento para cada clone e cada tipo de explante, o qual foi repetido para obtenção de calos suficientes para a fase seguinte.

Na regeneração de gemas, novos calos foram obtidos através dos explantes foliar e caulinar de cada clone proveniente do melhor tratamento da fase anterior. Eles foram cultivados em novo meio de cultura (conforme descrito em 3.2.2.1) em placas de Petri descartáveis estéreis (60 x 15 mm), contendo 12 mL de meio de cultura com cinco calos por placa, sendo 10 placas por tratamento de reguladores de crescimento (conforme descrito em 3.2.2.2 e no Quadro 2), e mantidos à temperatura de 27 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e densidade luminosa de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo utilizada lâmpada luz do dia branca fluorescente de 20 W por 35 dias.

A avaliação da capacidade organogênica do material para cada tratamento com calos provenientes de explantes foliar e caulinar foi tomada em porcentagem de calos apresentando gemas regeneradas e número de brotações por calo, como também mudanças ocorridas no aspecto desses calos após a transferência para a condição de luminosidade.

As gemas regeneradas foram transferidas para meio de alongamento composto pelos sais básicos MS, vitaminas White, acrescidos de mio inositol (100 mg L^{-1}), PVP (800 mg L^{-1}), sacarose (3%), ágar granulado MERCK (0,5%), $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, com pH ajustado para 5,8.

Para o enraizamento das brotações, foi utilizado o meio composto pelos sais básicos MS, vitaminas de White, acrescidos de mio inositol (100 mg L^{-1}), PVP (800 mg L^{-1}), sacarose (3%), ágar granulado MERCK (0,5%) e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, com pH ajustado para 5,8.

3.2.4. Análise histológica

Para confirmação de que as gemas regeneradas tratavam de gemas adventícias e não gemas pré-formadas, foi realizada a análise histológica de uma fração do material regenerado.

Para a realização da análise histológica foram selecionados aleatoriamente explantes foliar e caulinar que apresentaram regeneração, os quais foram submetidos aos procedimentos necessários à confecção dos cortes histológicos.

Amostras dos tecidos *in vitro* foram coletadas e fixadas em FAA 50%, pelo período de 24 horas. As amostras foram lavadas em álcool etílico 70% e desidratadas em série alcoólica (álcool butílico) e embebidas em parafina, segundo JOHANSEN (1940). Seções de $10 \mu\text{m}$ de espessura foram coradas em combinação fuccina básica e azul-de-astra e montadas em bálsamo-do-canadá.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fase de indução de calos em explante foliar

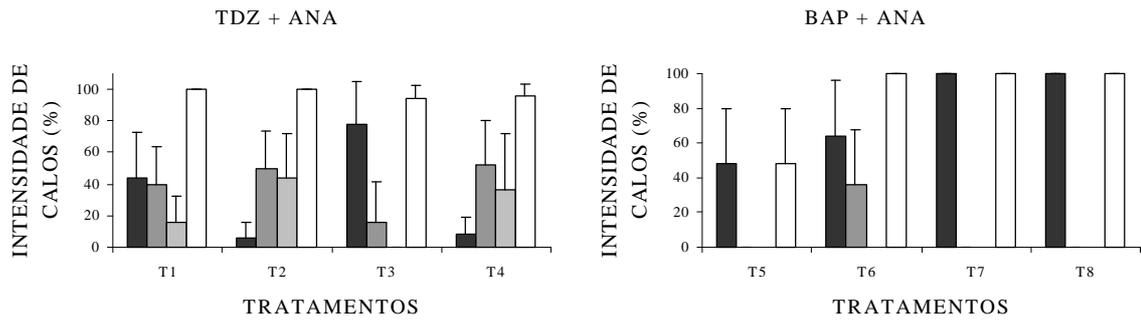
4.1.1. Intensidade de calejamento

Os resultados obtidos na fase de indução de calos com relação à intensidade de calejamento em explante foliar dos três clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* encontram-se na Figura 2.

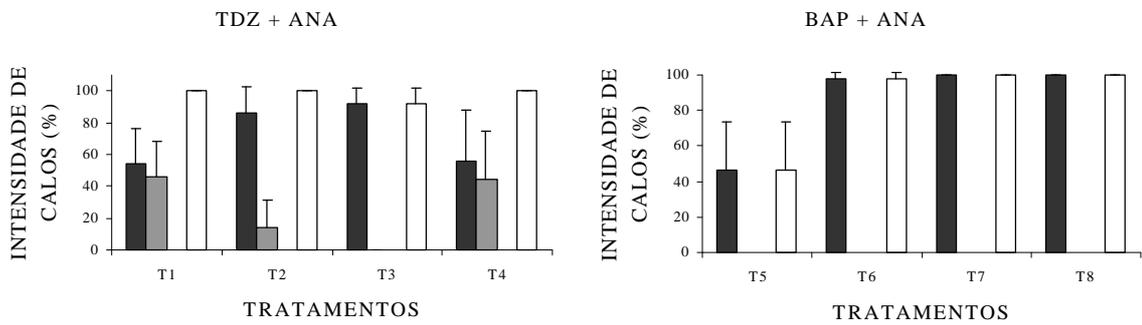
Observou-se que os clones responderam, de forma diferenciada, aos tratamentos com reguladores de crescimento, em que o clone 1 foi o que apresentou os melhores resultados para calejamento, seguido pelos clones 2 e 3. Os clones 1 e 2 exibiram 100% de calejamento em cinco dos oito tratamentos avaliados, enquanto no clone 3 a taxa máxima de calejamento observada foi de 66% no tratamento T₁. Apenas no clone 1 foi observado calejamento na classe de intensidade 3, em três dos quatro tratamentos, utilizando-se os reguladores de crescimento TDZ e ANA.

Para o clone 1, os resultados utilizando tratamentos com TDZ e ANA, com exceção do T₃, que apresentava as menores concentrações de TDZ, foram superiores aos tratamentos com BAP e ANA. Esses resultados corroboram os de

CLONE 1



CLONE 2



CLONE 3

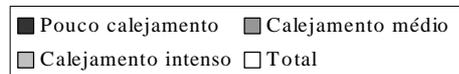
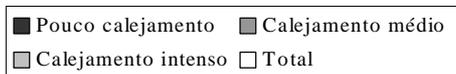
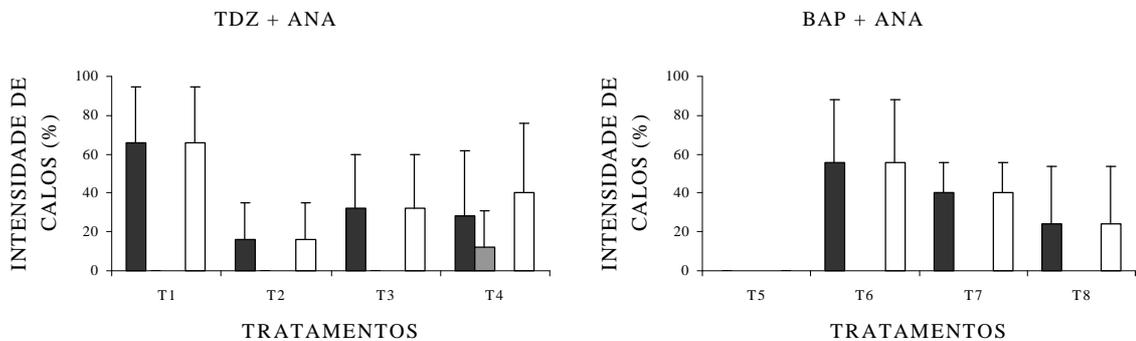


Figura 2 – Intensidade de calogênese a partir de explante foliar em função dos tratamentos com reguladores de crescimento (TDZ, BAP e ANA), avaliada em três clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Barras verticais indicam os desvios das médias.

VIEITEZ e SAN-JOSÉ (1996), que, utilizando como fonte de explante folhas de clones micropropagados de *Fagus sylvatica*, observaram que a formação de calos nos clones estudados ocorria com maior intensidade nos meios de cultura utilizando TDZ em relação aos utilizando BAP. A melhor “performance” do TDZ em relação a outros reguladores de crescimento na proliferação de tecido calogênico também é citada por MURTHY et al. (1998), segundo os quais o TDZ se mostrou eficiente em induzir a formação de calos em grande número de distintas espécies, sendo, em alguns casos, a taxa de proliferação celular maior que as obtidas com outros reguladores de crescimento.

Nos quatro tratamentos utilizando TDZ, foi observado que a maior porcentagem de calejamento se deu na região do pecíolo e limbo (Figura 3-A), enquanto nos quatro tratamentos utilizando BAP foi observada a tendência de calejamento na maior parte dos explantes somente na região do pecíolo (Figura 3-B).

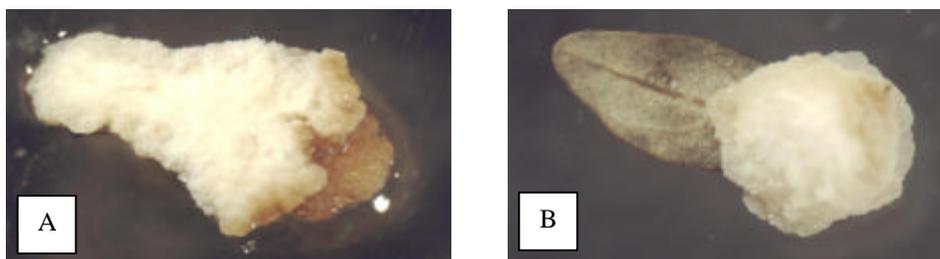


Figura 3 – Explante foliar com calejamento no limbo e pecíolo (A) e apenas no pecíolo (B) do clone 1, após 35 dias de cultivo na ausência de luz.

Não foi observado oxidação dos explantes em nenhum tratamento com TDZ, entretanto, nos tratamentos utilizando BAP, em 52% dos explantes no T₅ ocorreu oxidação durante a permanência no escuro e no T₇, embora tenha ocorrido 100% de calejamento, 48,9% dos explantes apresentaram sinais de oxidação em pequenas porções do calo. Essa tendência foi também observada por VIEITEZ e SAN- JOSÉ (1996), em que o escurecimento dos explantes foliares de *Fagus sylvatica* era mais intenso nos meios de cultura utilizando BAP, em comparação com os utilizando TDZ.

Em relação ao clone 2, este apresentou intensidade de calejamento na classe 1 em todos os tratamentos envolvendo as duas citocininas, contudo calos na classe de intensidade 2 somente foram observados nos tratamentos com TDZ e ANA (tratamentos T₁, T₂ e T₄). À exceção do tratamento T₃, a maior parte dos tratamentos apresentou as maiores porcentagens de calejamento na região do pecíolo e limbo. Nos tratamentos com BAP, o calejamento no limbo se deu somente na parte abaxial, ou seja, em contato com o meio de cultura (tratamentos T₅, T₆ e T₈).

No T₇, para o clone 2, foi observado calejamento no pecíolo e limbo em 74% dos explantes, sendo, em 70% destes, a parte do limbo calejada a que estava em contato com o meio de cultura. Essa tendência de maior concentração de calejamento na face abaxial do limbo também foi observada nos tratamentos utilizando TDZ, ocorrendo no T₁ (70%) e T₂ (36%).

Foi observada a presença de oxidação em somente 8% dos calos no tratamento T₃. Contudo, havia escurecimento do meio de cultura em todos os tratamentos, sendo o T₄ o que menos apresentou liberação de compostos fenólicos, ficando, portanto, o meio de cultura com aspecto mais transparente.

Quanto ao clone 3, embora seu melhor resultado tenha sido obtido no tratamento T₁ com TDZ e ANA, não houve, de forma geral, desempenho superior dos tratamentos utilizando TDZ, em comparação com os tratamentos com BAP, como ocorreu nos clones 1 e 2.

Dos três clones estudados, o clone 3 apresentou as maiores porcentagens de oxidação na fase de indução de calos. Os tratamentos exibiram as maiores porcentagens de calejamento na região do pecíolo e limbo, exceto T₄ (com TDZ e ANA), em que 100% do calejamento se deu no pecíolo. Calejamento no pecíolo e limbo abaxial foi somente observado nos tratamentos T₆ (82,1%) e T₈ (100%).

Nos três clones em estudo, os melhores resultados foram observados nos tratamentos com os reguladores de crescimento TDZ e ANA (tratamentos T₂, T₄ e T₁, para os clones 1, 2 e 3, respectivamente). Dentre os tratamentos com TDZ, o T₃, que apresentava as menores concentrações dessa citocinina, promoveu resultados inferiores nos clones 1 e 2 quando avaliada a capacidade de formar calos nas classes de intensidade 2 e 3, fato que não foi observado no clone 3. A vantagem da

utilização dos reguladores de crescimento TDZ e ANA foi citada por LU (1993), cujos estudos indicaram que o TDZ apresenta maior eficiência na presença de ANA. Contudo, esse autor citou que longas exposições ao TDZ não são recomendadas, por poderem causar hiper-hidricidade, crescimento anormal de gemas e dificuldade no enraizamento.

Diante desses resultados em relação à intensidade de calejamento, o clone 1 foi o que melhor respondeu quando cultivado com a combinação de 0,5 mg L⁻¹ de TDZ e 0,1 mg L⁻¹ de ANA (T₂), indicando a maior eficiência do TDZ para obtenção de calos visando à organogênese desse clone em explante foliar.

4.1.2. Textura dos calos

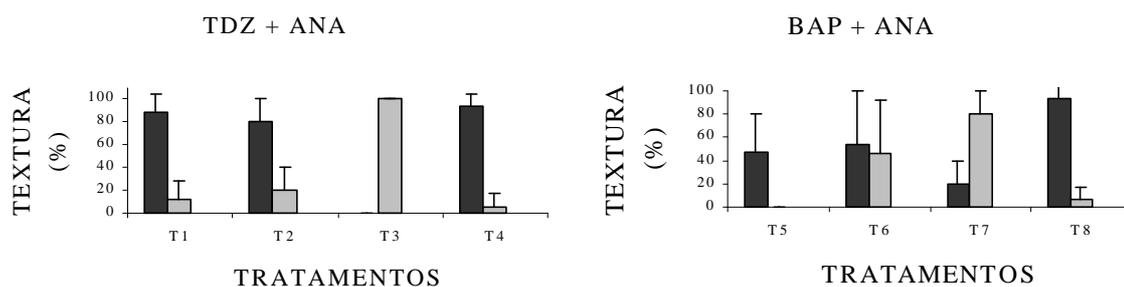
Os resultados obtidos na fase de indução de calos com relação à textura observada em explante foliar para os três clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* encontram-se na Figura 4.

No clone 1, os calos formados em explante foliar nos oito tratamentos com reguladores de crescimento foram classificados como compactos e semicompactos, em que as maiores concentrações de TDZ (tratamentos T₁, T₂ e T₄) proporcionaram calos compactos. A maioria dos calos compactos formados nos tratamentos com TDZ apresentava coloração branca e branca mesclada com bege, enquanto os calos semicompactos exibiam a coloração branca mesclada com bege e bege-claro. No tratamento T₃, que proporcionou somente calos semicompactos, houve 100% de coloração bege-claro.

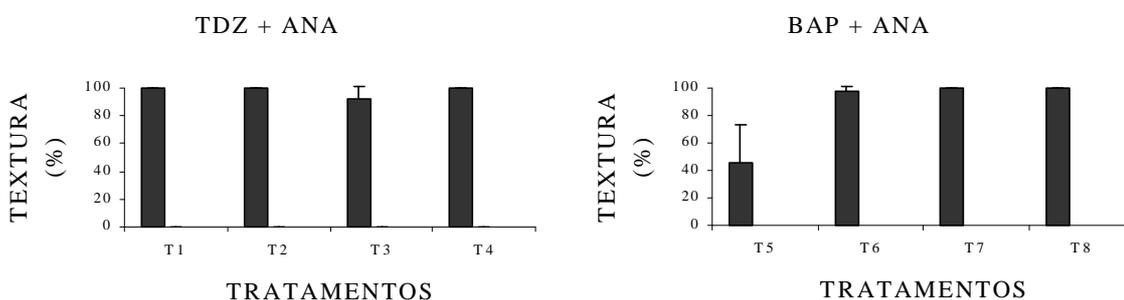
Nos tratamentos com BAP, foi observada a coloração bege-claro no T₆ e branca mesclada com bege nos tratamentos T₇ e T₈. No tratamento T₅, todos os calos apresentaram a coloração bege-escura.

No clone 2, todos os calos formados em explante foliar nos oito tratamentos com reguladores de crescimento foram classificados como compactos, não sendo observada a formação de nenhuma das outras três classes de textura. Calos

CLONE 1



CLONE 2



CLONE 3

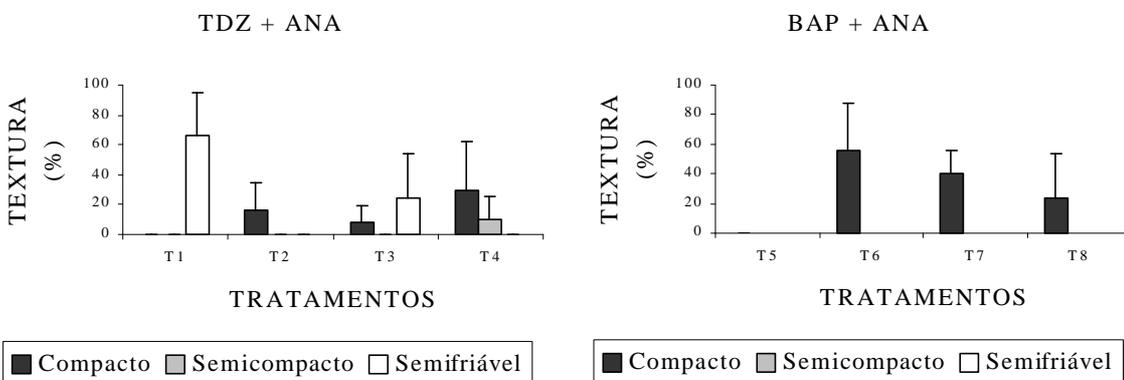


Figura 4 - Textura observada em calos obtidos a partir de explante foliar, em função dos tratamentos com reguladores de crescimento (TDZ, BAP e ANA), avaliada em três clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Barras verticais indicam os desvios das médias.

formados nos tratamentos com TDZ apresentavam a coloração branca mesclada com bege e bege-escuro, em proporções semelhantes nos tratamentos T₁, T₂ e T₄, e somente calos bege-escuros no tratamento T₃. Em calos formados nos tratamentos com BAP, observou-se a predominância da coloração bege-escuro em T₅, T₆ e T₈ e da bege-clara em T₇.

No clone 3, foi observada nos tratamentos T₁, T₃ e T₄, utilizando TDZ, a formação de calo com aspecto polvilhado e solto na superfície do explante, classificados como semicompactos e semifriáveis, em que todos os calos nesses tratamentos apresentavam, predominantemente, a coloração branca. Nos tratamentos com BAP, este apresentou somente calos compactos de coloração bege-escuro. Essa variedade de características observadas referentes à intensidade de formação e diferentes colorações e texturas dos calos foi citada em trabalhos realizados por WARRAG et al. (1991) e HERVÉ et al. (2001), como resultado da influência de diferentes concentrações de reguladores de crescimento.

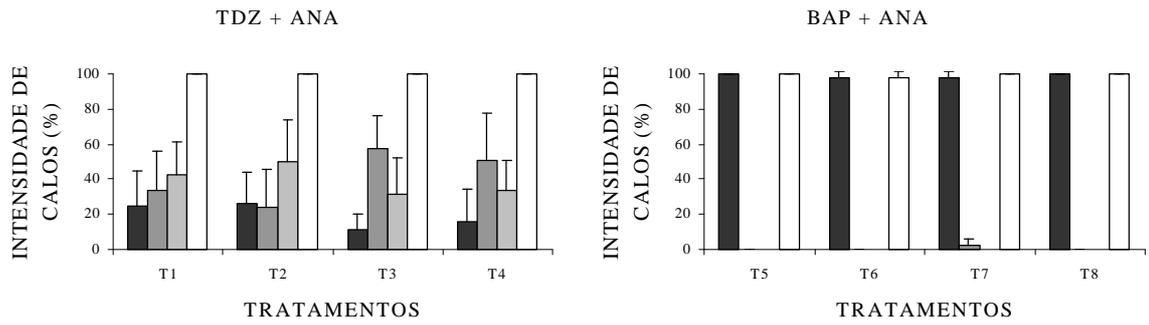
A partir dos resultados obtidos na fase de indução de calos para explante foliar, o melhor tratamento foi selecionado, principalmente, pela capacidade do explante em responder, em termos de intensidade de calejamento, a determinado tratamento hormonal. Dessa forma, foram selecionados, para serem repetidos e utilizados na fase de regeneração de gemas, os tratamentos T₂ (0,5 mg L⁻¹ de TDZ e 0,1 mg L⁻¹ de ANA) para o clone 1, T₄ (1,0 mg L⁻¹ de TDZ + 0,1 mg L⁻¹ de ANA) para o clone 2 e T₁ (0,5 mg L⁻¹ de TDZ + 0,5 mg L⁻¹ de ANA) para o clone 3.

4.2. Fase de indução de calos em explante caulinar

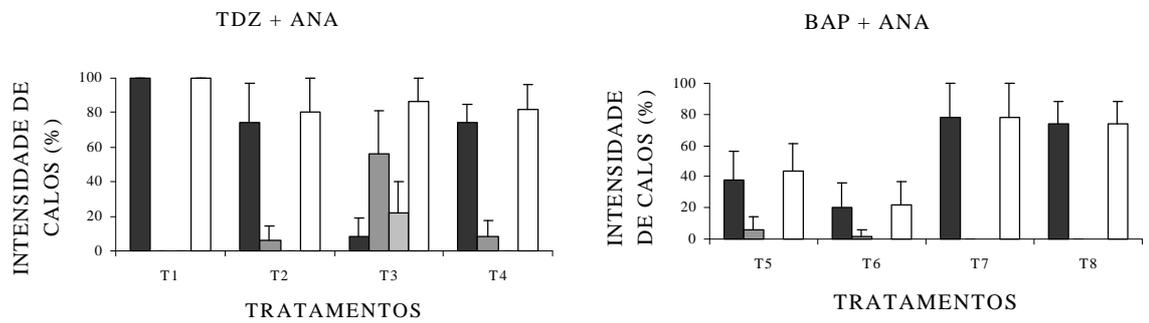
4.2.1. Intensidade de calejamento

Os resultados obtidos na fase de indução de calos com relação à intensidade de calejamento em explante caulinar para os três clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* encontram-se na Figura 5.

CLONE 1



CLONE 2



CLONE 3

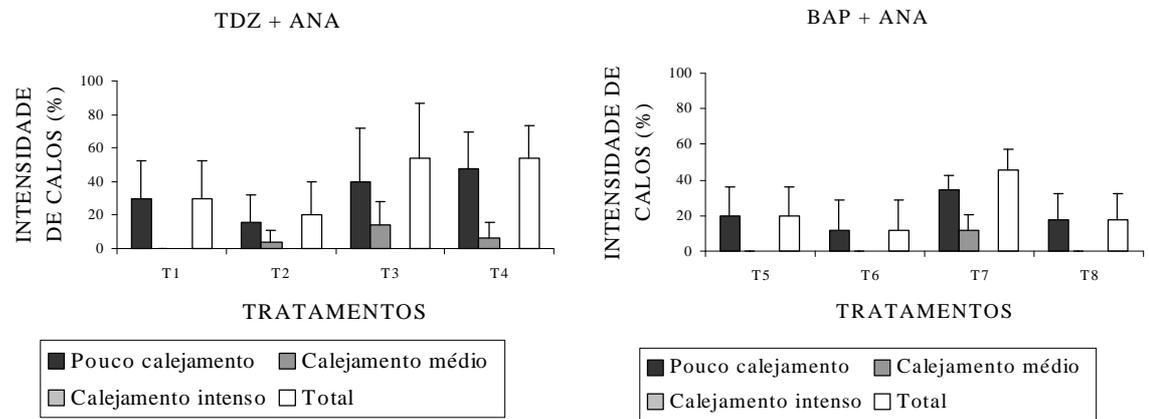


Figura 5 – Intensidade de calogênese a partir de explante caulinar, em função dos tratamentos com reguladores de crescimento (TDZ, BAP e ANA), avaliada em três clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Barras verticais indicam os desvios das médias

Observou-se que os clones responderam, de forma diferente, aos tratamentos com reguladores de crescimento, em que o clone 1 foi o que apresentou os melhores resultados de calejamento, seguido pelos clones 2 e 3. A classe de intensidade de calejamento 3 foi observada no clone 1, em quatro dos oito tratamentos; e no clone 2, em um dos oito tratamentos, todos utilizando TDZ.

Nos três clones, os melhores resultados foram observados nos tratamentos com os reguladores de crescimento TDZ e ANA, sendo o tratamento T₂ para o clone 1 e T₃ para os clones 2 e 3.

No clone 1, os tratamentos utilizando TDZ foram superiores aos tratamentos com BAP, visto apresentar as maiores porcentagens de calejamento nas classes de intensidade 2 e 3. O calejamento em todo o explante ocorreu em 100% dos calos formados nos tratamentos T₁, T₂ e T₄ e em 98% dos calos formados em T₃ (Figura 6-A). Nos tratamentos utilizando BAP, embora o calejamento se desse na maioria dos casos em todo o explante, o calejamento somente nas extremidades foi observado em maiores proporções em T₅, com 44%, e em menores proporções em T₇, com 16% (Figura 6-B).

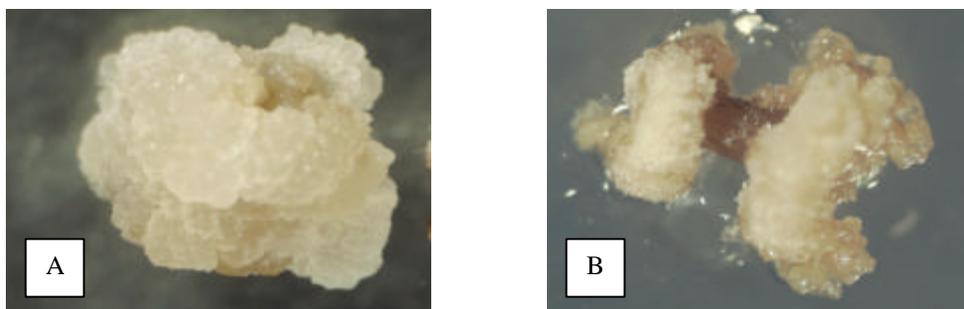


Figura 6 – Explante caulinar com calejamento em toda a superfície (A) e apenas nas extremidades (B) do clone 1, após 35 dias de cultivo na ausência de luz.

Quanto ao clone 2, os tratamentos utilizando TDZ e ANA também foram superiores aos com BAP e ANA. Os tratamentos com TDZ proporcionaram calejamento em todo o explante em 100% dos calos formados nos tratamentos T₁, T₂ e T₄ e em 98% dos calos formados em T₃. Nos tratamentos utilizando BAP, o calejamento somente nas extremidades foi observado em maiores proporções em T₅, com 68%. A oxidação foi observada nos calos na maioria dos tratamentos, com exceção do T₁, com maiores intensidades nos tratamentos utilizando BAP.

Os resultados obtidos nos tratamentos com TDZ e ANA para o clone 3 se mostraram ligeiramente superiores aos de BAP e ANA, não sendo observada diferença acentuada entre os tratamentos com as duas citocininas, como ocorreu com os clones 1 e 2. Nos tratamentos com TDZ, foi observado o calejamento ao longo do explante em 100% daqueles que calejaram, enquanto nos tratamentos com BAP o calejamento ocorreu somente nas extremidades também em 100% dos explantes que calejaram nos tratamentos T₅ e T₆ e, em menores proporções, nos tratamentos T₇ (6%) e T₈ (22%). A oxidação ocorreu nos explantes em todos os tratamentos, com maiores intensidades nos tratamentos com BAP.

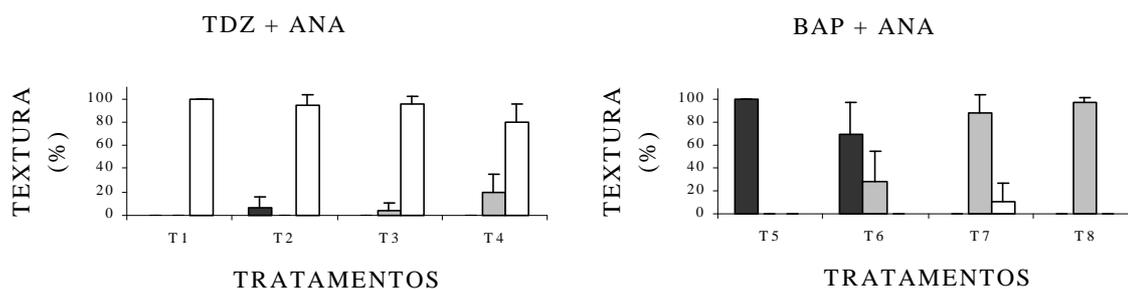
De forma geral, com base nesses resultados, o clone 1 apresentou os melhores resultados com a combinação de 0,5 mg L⁻¹ de TDZ e 0,1 mg L⁻¹ de ANA (T₂), concordando com os resultados obtidos para o explante foliar.

4.2.2. Textura dos calos

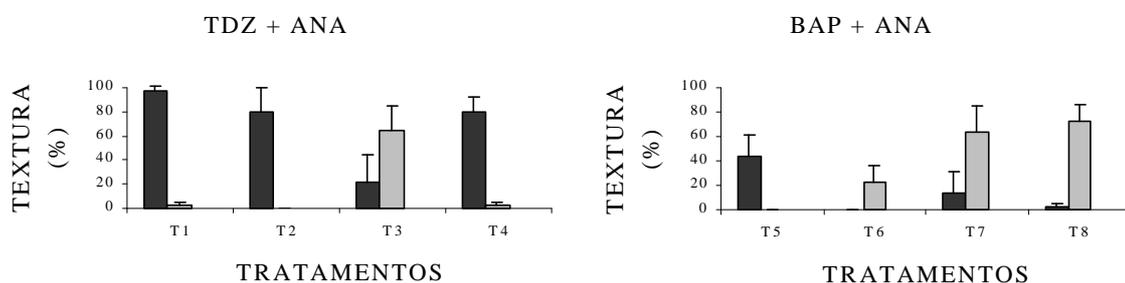
Os resultados obtidos na fase de indução de calos com relação à textura observada em explante caulinar nos três clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* encontram-se na Figura 7.

Em relação ao clone 1, os tratamentos com BAP e ANA proporcionaram a maioria dos calos compactos (T₅ e T₆) e semcompactos (T₇ e T₈), enquanto os tratamentos com TDZ e ANA resultaram em calos semifriáveis, em sua maioria. Foi observada nos tratamentos T₅, T₇ e T₈ com BAP uma correlação entre os calos compactos formados e a presença de estruturas compactas nodulares formadas na superfície destes, principalmente nas extremidades do explante. Quanto à coloração, houve predominância do bege-claro em todos os tratamentos.

CLONE 1



CLONE 2



CLONE 3

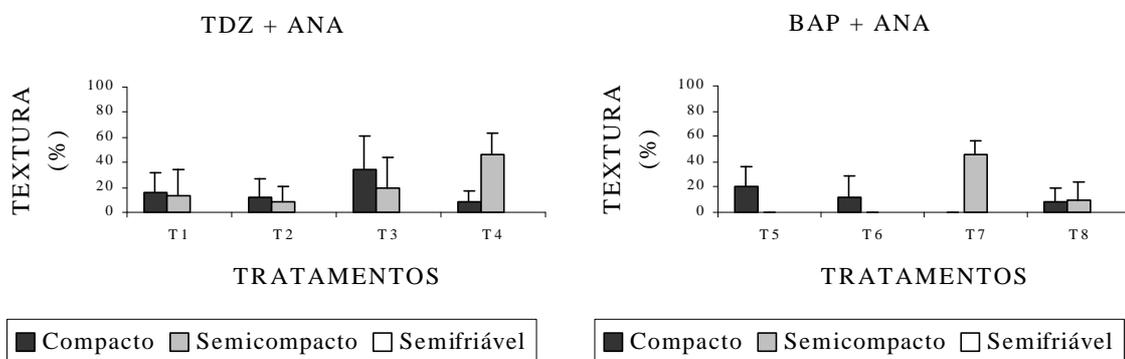


Figura 7 – Textura observada em calos obtidos a partir de explante caulinar, em função dos tratamentos com reguladores de crescimento (TDZ, BAP e ANA), avaliada em três clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. Barras verticais indicam os desvios das médias.

Quanto ao clone 2, foi observada a formação de calos compactos e semicompactos, em que os tratamentos com BAP e ANA, com exceção do T₅, apresentaram a maior parte dos calos semicompactos. Os tratamentos com TDZ e ANA, com exceção do T₃, apresentaram a maior parte dos calos compactos. Houve a predominância das colorações branca mesclada com bege e bege-claro nos tratamentos com TDZ e branca mesclada com bege nos tratamentos com BAP.

No clone 3, foram formados calos compactos e semicompactos, em que os tratamentos com TDZ e ANA, com exceção do T₄, proporcionaram calos mais compactos. Nos tratamentos com BAP e ANA, as maiores concentrações de BAP nos tratamentos T₇ e T₈ proporcionaram calos mais semicompactos. Foi observada nos tratamentos T₅, T₆ e T₈ uma correlação entre os calos compactos formados e a presença de estruturas compactas nodulares formadas na superfície desses calos, principalmente nas extremidades do explante. Nos tratamentos com TDZ, houve a predominância das colorações branca mesclada com bege e bege-claro, e nos tratamentos com BAP predominou a coloração bege-escura. Pôde ser observado que a concentração e o tipo de reguladores de crescimento utilizados influenciaram a coloração e textura dos calos nos três clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em estudo, concordando com os resultados obtidos por WARRAG et al. (1991) e HERVÉ et al. (2001).

A partir dos resultados obtidos na fase de indução de calos para explante caulinar, o melhor tratamento foi selecionado, principalmente, pela capacidade do explante em responder, em termos de intensidade de calogênese, a determinado tratamento hormonal. Assim, foram selecionados, para serem repetidos e utilizados na fase de regeneração de gemas, os tratamentos T₂ (0,5 mg L⁻¹ de TDZ e 0,1 mg L⁻¹ de ANA) para o clone 1 e o T₃ (0,05 mg L⁻¹ de TDZ + 0,01 mg L⁻¹ de ANA) para os clones 2 e 3.

4.3. Regeneração de gemas

4.3.1. Explante foliar

O percentual de calos apresentando regeneração de gemas adventícias por organogênese *in vitro* e o número médio de gemas formadas por calo regenerado em explante foliar nos clones 1 e 3 encontram-se nas Figuras 8 e 9, respectivamente. Ressalta-se que o clone 2 não apresentou regeneração de gemas.

Conforme observado nas Figuras 8 e 9, os clones 1 e 3 apresentaram capacidade organogênica a partir de calos formados de explante foliar, indicando o potencial morfogênico desses materiais genéticos.

Observaram-se, nos três clones em estudo, mudanças quanto a coloração e textura dos calos durante a fase de regeneração em condições de luminosidade (Figura 10-A). Houve maior compactação na superfície dos calos e aumento significativo da estrutura nodular formada na região do pecíolo (Figura 10-B).

No clone 1, somente no tratamento T₅ não foi observado regeneração de gemas, sendo o melhor resultado alcançado com a concentração de 1,0 mg L⁻¹ de BAP (T₄). Nesse clone, todas as gemas regeneradas nos tratamentos com BAP ou BAP e ANA se originaram na região do pecíolo formado pelo calo de aspecto nodular, sempre associadas à presença de antocianina.

BANDYOPADHYAY et al. (1999), trabalhando com *Eucalyptus nitens* e *E. globulus*, observaram, em calos formados a partir de cotilédones, que, após os tecidos serem transferidos para o meio de regeneração, eles se tornaram gradualmente mais compactos e nodulares, com formação das gemas adventícias nessas áreas.

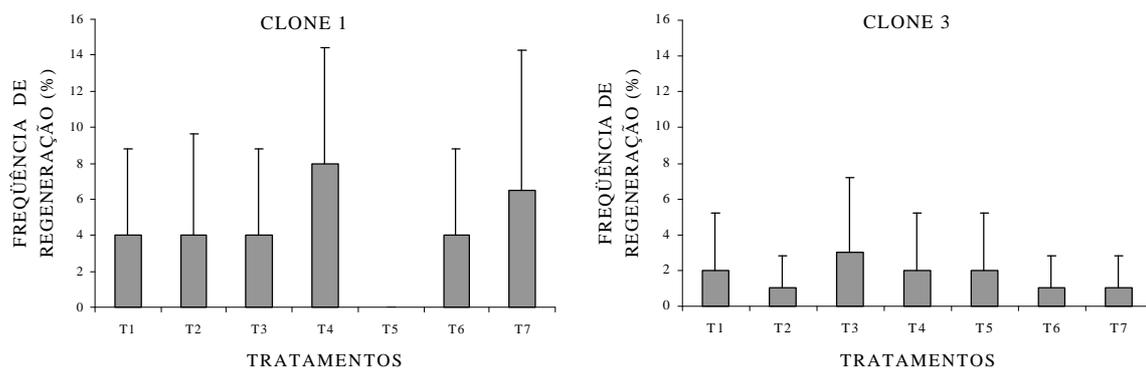


Figura 8 - Percentual dos calos formados a partir de explantes foliares que regeneraram gemas, em função dos tratamentos com reguladores de crescimento (BAP e ANA) avaliado nos clones 1 e 3. Barras verticais indicam os desvios das médias.

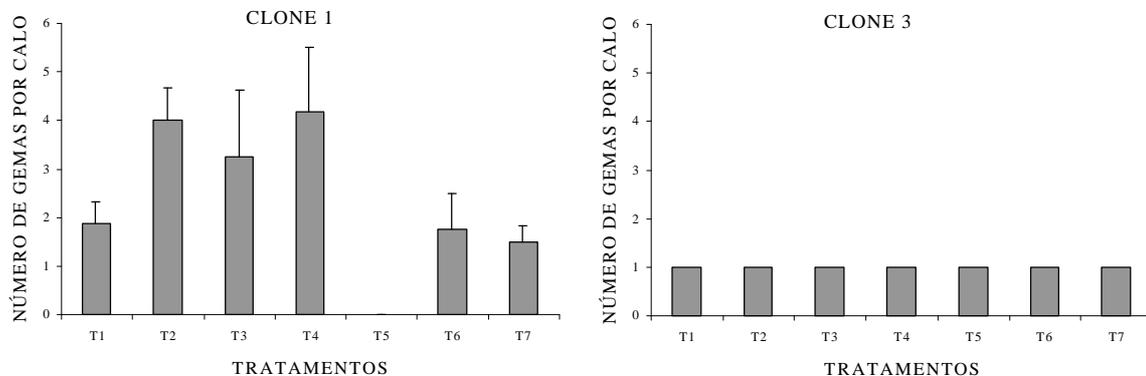


Figura 9 – Número médio de gemas por calo formado a partir de explante foliar, em função dos tratamentos com reguladores de crescimento (BAP e ANA), avaliado nos clones 1 e 3. Barras verticais indicam os desvios das médias.

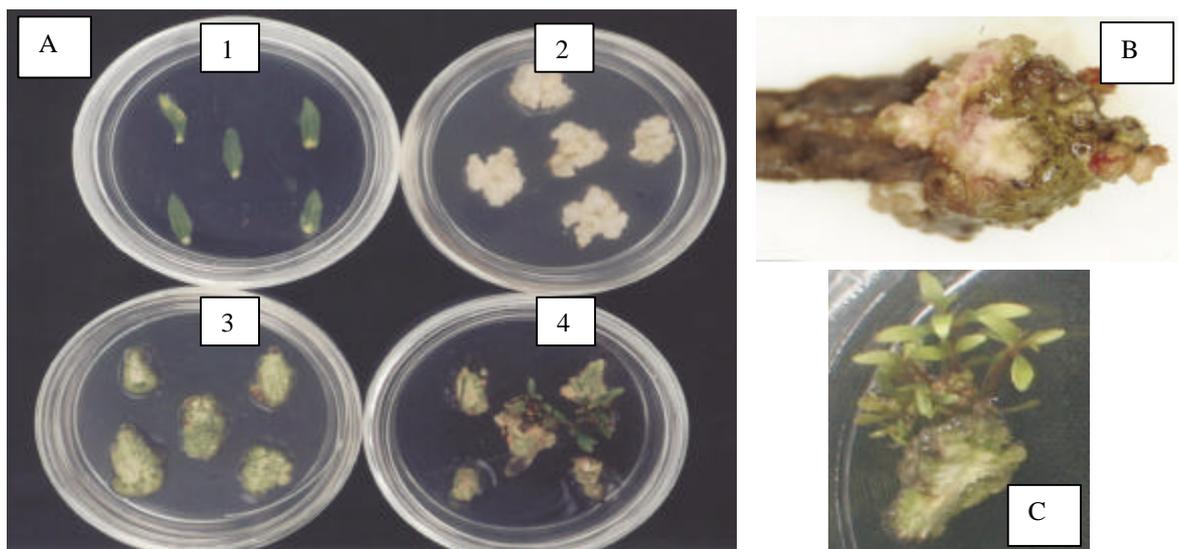


Figura 10 - (A) organogênese de explante foliar nas fases inicial (1), de calejamento no escuro (2), na presença de luz (3) e de regeneração de gemas adventícias (4) do clone 1 após 35 dias. (B) Detalhe da estrutura nodular desenvolvida na região do pecíolo nas condições de regeneração das gemas adventícias. (C) Detalhe da regeneração do explante foliar desenvolvida na região do pecíolo.

HERVÉ et al. (2001) também observaram a correlação entre protuberâncias densamente coesas e a regeneração por organogênese em explante foliar de *Eucalyptus gunnii*. Segundo esses autores, esses nódulos se formavam na parte proximal ao pecíolo e, após serem excisados e transferidos para meio de regeneração, desenvolviam-se em gemas. Constataram, também, que os tecidos eram incapazes de regenerar gemas quando a parte proximal ao pecíolo da folha era removida.

A relação entre a presença de antocianina e a de organogênese foi relatada em trabalhos como o de MURALIDHARAN e MASCARENHAS (1987), que em explante foliar de *E. camaldulensis* verificaram que os calos formados desenvolviam antocianina e, após quatro semanas de cultivo, gemas iniciais se desenvolviam nessas áreas de pigmentação. SUBBAIAH e MINOCHA (1990), em trabalho com folhas e caule de *E. tereticornis*, observaram que os calos sempre se tornavam avermelhados antes do aparecimento dos primórdios de gemas. Também,

CUENCA et al. (2000), na micropropagação por organogênese de *Fagus sylvatica* e *Fagus orientalis*, relataram que nos calos formados os locais de diferenciação de gemas eram aqueles que apresentavam antocianina.

Em relação ao clone 2, foi observada a presença de quantidades pequenas de antocianina na superfície de alguns calos, entretanto não houve regeneração de gemas nesses locais. Em todos os tratamentos com reguladores de crescimento na fase de regeneração de gemas, foi verificado crescente aumento no escurecimento do meio de cultura com o tempo, provavelmente pela liberação de compostos fenólicos.

O clone 3 apresentou, na região do calo formado por tecido nodular, gemas em estágio inicial de desenvolvimento, com a ressalva de que, na maioria dos casos, estas estavam associadas à presença de antocianina. Contudo, essas gemas não se desenvolveram quando subcultivadas em novo meio de regeneração ou alongamento.

A presença de antocianina foi também observada em alguns casos na superfície do explante, assim como no calo nodular desenvolvido na região do pecíolo, não estando, porém, associada a nenhuma estrutura. Uma percentagem dos calos, quando cultivados em meio de regeneração, tendeu a se oxidar após curto período em condições de luminosidade (31% em T₁, 14% em T₂, 36% em T₃, 11% em T₄, 21% em T₅, 13% em T₆ e 18% em T₇).

Diante desses resultados, com relação à capacidade organogênica a partir de explante foliar dos clones em estudo, os clones 1 e 3 responderam quando cultivados em meio de regeneração, sendo no clone 1 o melhor resultado obtido com 1,0 mg L⁻¹ de BAP, em que 8% dos calos formados a partir de explantes foliares regeneraram gemas, com número médio destas formadas por calo igual a 4,2. No clone 3, o melhor resultado foi obtido com 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 0,2 mg L⁻¹ de ANA, com número médio de gemas formadas por calo igual a 1. Em relação ao percentual de calos com regeneração de gemas, os valores obtidos foram inferiores aos resultados alcançados em trabalhos utilizando como fonte de explante material juvenil, como os de SUBBAIAH e MINOCHA (1990), TIBOK et al. (1995), AZMI et al. (1997) e BANDYOPADHYAY et al. (1999). Em relação a trabalhos em que

explantes foliares foram obtidos de clones de *Eucalyptus*, os resultados do presente estudo mostram-se inferiores aos alcançados por LAINÉ e DAVID (1994), que obtiveram 38,5% de calos regenerando gemas, porém próximos dos de HERVÉ et al. (2001), que obtiveram 8,8% de calos regenerando gemas com o número médio de gemas formadas por calo igual a 4.

Os regenerantes obtidos foram transferidos para meio de cultura, na busca do desenvolvimento das gemas adventícias para posterior enraizamento. Entretanto, dada a baixa taxa de regeneração, poucas gemas foram subcultivadas em meio específico, sendo a quantidade de gemas alongadas insuficiente para avaliar o potencial de enraizamento dos clones analisados.

4.3.2. Explante caulinar

O percentual de calos apresentando regeneração de gemas adventícias por organogênese e o número de gemas formadas por calo regenerado em explante caulinar nos clones 1 e 3 encontram-se nas Figuras 11 e 12, respectivamente. Ressalta-se que o clone 2 não apresentou regeneração de gemas.

Somente os clones 1 e 3 apresentaram alguma resposta de regeneração de gemas nos tratamentos com reguladores de crescimento. No clone 1, foi obtido resposta em somente 1% dos calos no tratamento T₁, enquanto no clone 3 o melhor resultado foi conseguido no tratamento T₄, com 5% dos calos formados a partir de explantes caulinares regenerando gemas.

Foram observadas, nos três clones, mudanças quanto a coloração e textura dos calos, após estes serem transferidos para o meio de regeneração e cultivados à luz. Os calos passaram a apresentar maior compactação e, de forma geral, coloração verde, cuja tonalidade variou de acordo com o clone.

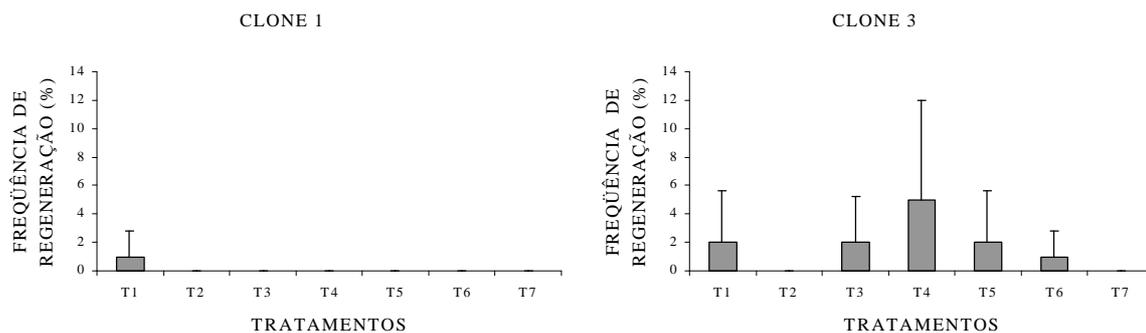


Figura 11 - Percentual de calos com regeneração de gemas a partir de calos formados de explante caulinar, em função dos tratamentos com reguladores de crescimento (BAP e ANA), avaliado nos clones 1 e 3. Barras verticais indicam os desvios das médias.

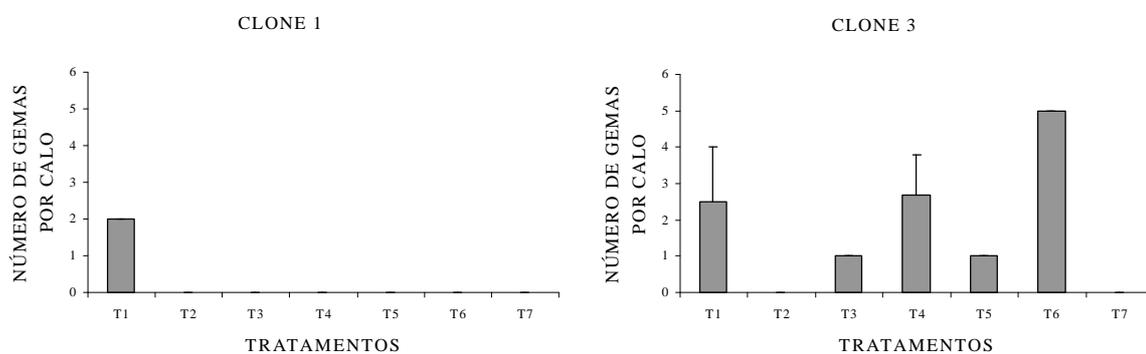


Figura 12 – Número médio de gemas por calo regenerado em explante caulinar, em função dos tratamentos com reguladores de crescimento (BAP e ANA), avaliado nos clones 1 e 3. Barras verticais indicam os desvios das médias.

Dos três clones em estudo, o clone 1 foi o que apresentou calos verdes com maior intensidade. Em alguns casos, foi observada a formação de estruturas nodulares compactas na superfície do calo, onde as gemas formadas no explante caulinar no tratamento T₁ se desenvolveram a partir de regiões nodulares desse calo. Os calos que não apresentaram formação de gemas foram subcultivados em novo meio de regeneração, contudo, com o tempo, eles se oxidaram e morreram. Em relação ao clone 2, em todos os tratamentos com reguladores de crescimento na fase de regeneração de gemas foi observado crescente aumento no escurecimento do meio de cultura com o tempo, provavelmente pela liberação de compostos fenólicos. Dos calos que não se oxidaram durante o período até a avaliação, pequena parcela apresentou a coloração esbranquiçada, sendo a maioria de coloração esverdeada. Parte dos calos não oxidados desenvolveu estruturas nodulares compactas em sua superfície.

O clone 3, embora tenha sido o que melhor respondeu à organogênese em explante caulinar, teve percentual alto de calos oxidados ou em fase de oxidação quando foi realizada a avaliação (75% em T₁, 80% em T₂, 81% em T₃, 67% em T₄, 83% em T₅, 83% em T₆ e 80% em T₇). As gemas produzidas, pouco desenvolvidas, formaram-se a partir de pequenas partes de tecidos nodulares compactos nos calos e apresentavam aspecto hiper-hídrico, estando em alguns casos associadas à antocianina (Figura 13). A relação entre a textura compacta e a capacidade de regeneração de gemas foi também observada por HERVÉ et al. (2001), que verificaram que calos formados a partir de segmentos internodais de clones de *Eucalyptus gunnii* apresentavam, nas extremidades dos explantes, o desenvolvimento de protuberâncias densas que culminavam na regeneração de gemas.

De acordo com os resultados, embora a taxa de oxidação no clone 3 tenha se mostrado alta, este apresentou a melhor “performance” na avaliação da capacidade organogênica a partir de calos formados em explantes caulinares quando cultivados em meio de regeneração com 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Vale salientar que os resultados obtidos em relação ao percentual de regeneração foram inferiores aos de

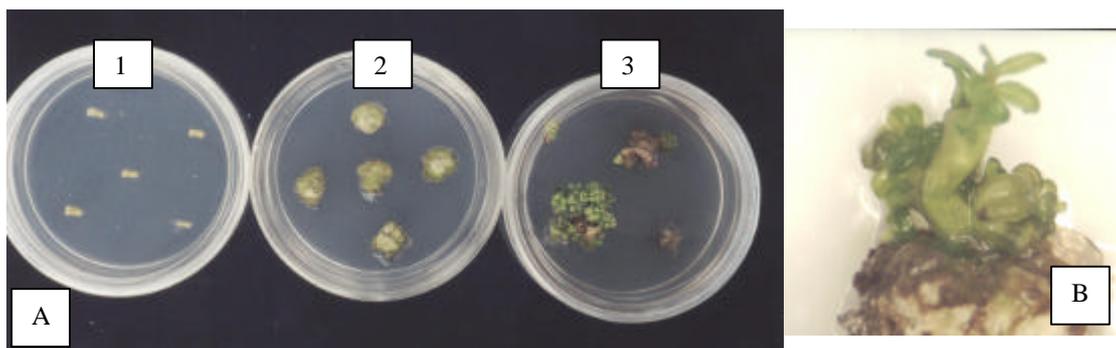


Figura 13 - (A) Organogênese em explante caulinar nas fases inicial (1), de calejamento obtido após 35 dias no escuro (2) e de regeneração de gemas adventícias do clone 3 obtida 35 dias após sua transferência para luz (3). (B) Detalhe das gemas adventícias desenvolvidas em explante caulinar, do clone 3.

SUBBAIAH e MINOCHA (1990), TIBOK et al. (1995), AZMI et al. (1997), BANDYOPADHYAY et al. (1999) e LAINÉ e DAVID (1994), sendo próximos dos resultados alcançados por HERVÉ et al. (2001), que, utilizando segmentos internodais de clones de *Eucalyptus gunnii*, obtiveram 9,9% de calos regenerando gemas com o número médio destas formadas por calo igual a 3,4.

Os regenerantes obtidos foram transferidos para meio de alongamento, onde as gemas formadas, por serem pouco desenvolvidas e apresentarem hiper-hidricidade, não exibiram resposta no meio de alongamento.

Deve-se ressaltar que, na confecção dos explantes caulinares, principalmente quando estes não são realizados com o auxílio de lupa, existe a possibilidade de gemas axilares presentes ao longo das brotações permanecerem nos segmentos internodais utilizados como explantes, vindo, com isso, a mascarar os resultados obtidos. Portanto, explantes foliares se apresentam como fonte mais segura de explante.

4.4. Análise histológica

As análises histológicas realizadas nos explantes foliar e caulinar revelaram a origem adventícia das gemas formadas.

Após 35 dias do início de cultivo para explante foliar em meio de regeneração, houve a diferenciação das gemas e primórdios foliares a partir da região proximal das folhas. Em toda a lâmina foliar houve a tendência de formação de maior ou menor índice de calejamento, de modo especial a partir de células do mesofilo junto à epiderme abaxial, permanecendo em alguns pontos intacta a epiderme adaxial. Nas regiões associadas aos feixes vasculares houve intensa atividade de divisão celular culminando na formação, em maior ou menor grau, de calos. À medida que se aproximava da região proximal das folhas houve tendência de formação de protuberâncias de aspecto nodular que culminaram, em alguns casos, na formação de gemas adventícias (Figura 14-A). Em ambos os clones, observou-se na extremidade distal dos explantes a diferenciação de gemas e primórdios foliares, seguindo o padrão típico de organogênese e apresentando a continuidade vascular com o tecido original (Figura 14-B). Pode-se observar, ainda, a presença de cavidades secretoras de óleo típicas da espécie (Figura 14-C).

Conforme observado nos regenerantes (Figura 10-A), as folhas em corte transversal apresentaram estrutura típica do gênero, sendo anfiestomáticas e apresentando mesofilo diferenciado, contendo este, cavidades secretoras (Figura 14-D).

Nos explantes caulinares, foi observada intensa divisão celular a partir da superfície de corte destes. Conforme descrito para os explantes foliares, as gemas diferenciadas apresentaram conexão vascular com o tecido original (Figura 14-E) confirmando, assim, a origem adventícia delas. Em corte transversal, houve intensa desdiferenciação de células a partir de células parenquimáticas associadas ou não à região vascular, resultando em considerável expansão radial dos explantes (Figura 14-F). De maneira semelhante, as células da periferia dos explantes apresentaram significativa divisão celular no plano predominantemente periclinal, contribuindo também para a expansão radial. Todavia, em algumas regiões dos explantes, houve

tendência de ocorrer a rediferenciação dessas células e a conseguinte formação de gemas (Figura 14-G).

A realização de análises histológicas em trabalhos com organogênese *in vitro* mostra-se fundamental para a confirmação da origem das gemas formadas em cultivo, excluindo a possibilidade de interpretação equivocada dos resultados advindos da presença de gemas pré-formadas no explante original.

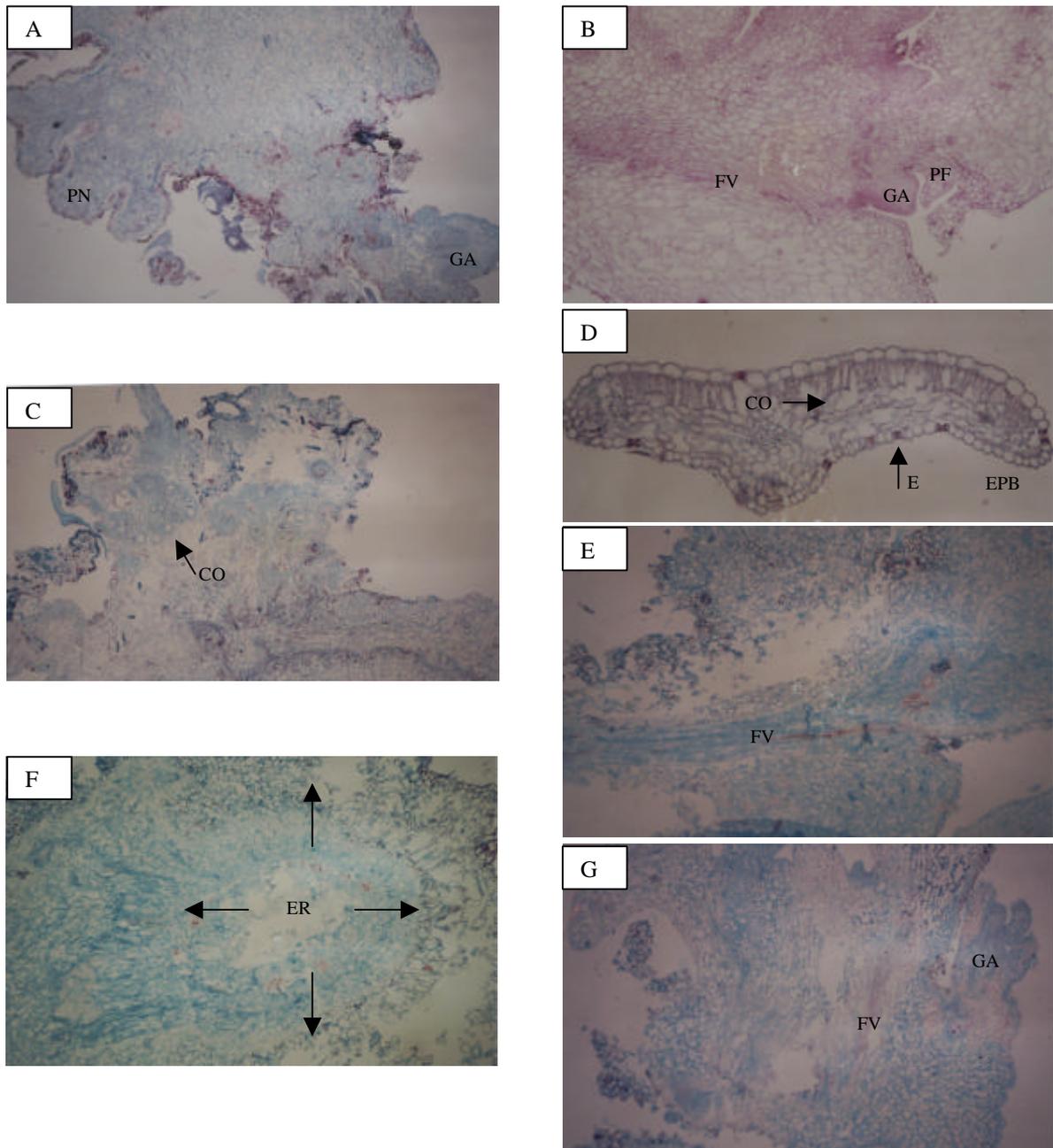


Figura 14 - Fotomicrografias de cortes transversais (A, D e F) e longitudinais (B, C, E e G) de explantes foliar e caulinar. A – Formação de protuberâncias de aspecto nodular (PN) e gemas adventícias (GA) na região proximal do explante foliar. B – Continuidade dos feixes vasculares (FV) entre a região de formação do calo com gemas adventícias (GA) e primórdios foliares (PF). C – Presença de cavidades secretoras de óleo (CO). D – Folha de um regenerante apresentando estômatos (E) na epiderme abaxial (EPB) e cavidades secretoras de óleo (CO). E – detalhe da conexão dos feixes vasculares (FV) com gemas diferenciadas. F – Corte transversal evidenciando a proliferação celular e a conseguinte expansão radial (ER) do explante caulinar. G – Formação de gemas adventícias em explante caulinar (GA) apresentando conexão dos feixes vasculares (FV) com o tecido original do explante.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente estudo objetivou avaliar a micropropagação por organogênese em três clones de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, utilizando-se como explantes folhas e segmentos internodais de clones rejuvenescidos *in vitro* pela técnica de micropropagação via gemas axilares.

O presente trabalho foi constituído em duas etapas, sendo a primeira referente à produção das gemas alongadas *in vitro* para obtenção dos explantes foliar e caulinar e a segunda, às fases de obtenção de calos e regeneração de gemas adventícias. Os explantes foliar e caulinar foram cultivados em meio de cultura específico e submetidos a diferentes concentrações e tipos de reguladores de crescimento (TDZ, ANA e BAP).

Na fase de indução de calos, foram utilizadas quatro combinações dos reguladores de crescimento TDZ e ANA e quatro de BAP e ANA. Na fase de regeneração de gemas, o melhor tratamento para o calejamento foi repetido, sendo os calos obtidos avaliados em sete combinações com os reguladores de crescimento BAP e ANA.

De maneira geral, considerando as condições em que o experimento foi desenvolvido, obtiveram-se os seguintes resultados:

- Na fase de indução de calos, observou-se resposta diferenciada dos clones aos tratamentos com os reguladores de crescimento, tanto para explante

foliar quanto caulinar, em relação à quantidade, coloração e compactação dos calos.

- Nos três clones em estudo, na fase de calejamento, os melhores resultados foram observados com os reguladores de crescimento na combinação de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, com 100% de calejamento.
- Somente um clone apresentou capacidade organogênica com a utilização de explante foliar, em que todas as gemas regeneradas nos tratamentos com BAP ou BAP e ANA se originaram na região do pecíolo formado pelo calo de aspecto nodular.
- Para explante caulinar, dois clones apresentaram resposta organogênica quando transferidos para meio de regeneração, com gemas formadas a partir de pequenas partes de tecido nodular compacto nos calos.

Com base nos resultados, pode-se concluir, com relação aos clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* avaliados, que os reguladores de crescimento TDZ e ANA proporcionam maiores índices de calejamento, e a sua concentração variou de acordo com o clone utilizado. Contudo, a intensidade de calejamento não deve ser o único parâmetro na escolha de um tratamento objetivando a organogênese em *Eucalyptus*, sendo a textura do calo obtido fator de grande importância a ser considerado. De forma geral, entre os principais fatores envolvidos na organogênese, o tipo de explante, as condições ambientais, os meios de cultura e as combinações de reguladores de crescimento específicos para cada clone mostram-se necessários na obtenção de resultados satisfatórios na organogênese de clones de *Eucalyptus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSIS, T. F. Melhoria genética do eucalipto. **Informe Agropecuário**, v. 18, n. 185, p. 32-51, 1996.
- ASSIS, T. F.; ROSA, O.P.; GONÇALVES, S. I. Propagação por microestaquia. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7, 1992, Nova Prata. **Anais...** Santa Maria, RS: UFSM, 1992. p. 824-836.
- AZMI, A.; NOIN, M.; LANDRÉ, P.; PROUTEAU, M.; BOUDET, A. M.; CHRIQUI, D. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. hypocotyls: ontogenesis and ploidy level of the regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.51, p.9-16, 1997.
- BANDYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSSEN, G.; HAMILL, J. D. Efficient plant regeneration from seedling of two commercially important temperate eucalypt species- *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Plant Science**, v.140, p.189-198, 1999.
- BENNETT, I. J.; McCOMB, J. A. Propagation of jarrah (*Eucalyptus marginata*) by organ and tissue culture. **Australian Forestry Research**, v.12, p.121-127, 1982.
- BONGA, J. M. Clonal propagation of mature trees: problems and possible solutions. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry**. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. p.249-271.
- BONGA, J. M.; VON ADERKAS, P. In vitro culture of trees. **Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236 p.**
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-CANARGEN, 1999. 309 p.

- 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-CNPq, 1998. v.1, p.87-132.
- CHAPERON, H. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: SIMPOSIO SOBRE SILVICULTURA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO DE ESPECIES FORESTALES, 1987, Buenos Aires, Argentina. **Anales ...[S.l]: AFOCEL**, 1987. p.215-232.
- CHEN, Z. Z.; TSAY, J. Y.; CHUNG, J. D. Callus culture of *Eucalyptus grandis* x *urophylla* and preliminary studies on organogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation. **Taiwan Journal Forestry Science**, v.11, n.1, p.43-52, 1996.
- COENEN, C.; LOMAX, T. L. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. **Trends in Plant Science**, v.2, n.9, p.351-356, 1997.
- COMÉRIO, J.; XAVIER, A.; IANNELLI, C. M. Microestaquia: um novo sistema de produção de mudas de *Eucalyptus* na Champion. In: ENCONTRO TÉCNICO FLORESTAL, 7, 1996, Belo Horizonte. **Anais ... Piracicaba, SP: ABRACAVE**, 1996. 6 p.
- CRESSWELL, R.; DE FOSSARD, R. Organ culture of *Eucalyptus grandis*. **Australian Forestry**, v.37, p.55-69, 1974.
- CUENCA, B.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. *In vitro* adventitious bud regeneration from internode segments of beech. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, p.213-220, 2000.
- DURAND-CRESSWELL, R.; BOULAY, M.; FRANCLLET, A. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Eds.). **Tissue culture in forestry**. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1982. p.150-181.
- DE FOSSARD, R. A. Tissue culture of *Eucalyptus*. **Australian Forestry**, v.37, p.43-54, 1974.
- DE FOSSARD, R. A.; BARKER, P. K.; BOURNE, R. A. The organ culture of nodes of four species of *Eucalyptus*. **Acta Horticulturae**, v.78, p.157-163, 1977.
- FERREIRA, M. Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal. **IPEF**, v.45, p.22-30, 1992.

- FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. 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.21-43.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.148-151, 1968.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture - The technology**. 2. ed. England: Exegetics, 1993. v. 1, 575 p.
- GLADFELTER, H. J.; PHILLIPS, G. C. De novo shoot organogenesis of *Pinus elliottii* Medw. *in vitro*: I. Reproducible regeneration from long-term callus cultures. **Plant Cell Reports**, v.6, p.163-166, 1987.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. 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.2, p.533-568.
- GUPTA, P. K.; TIMMIS, R.; PULLMAN, G.; YANCEY, M.; KREITINGER, M.; CARLSON, W. C.; CARPENTER, C. Development of an embryogenic system for automated propagation of forest trees. In: VASIL, I. K. (Eds.). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. San Diego: Academic, 1991. v.8, p.76-93.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.183-260.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. 770 p.
- HERVÉ, P.; JAUNEAU, A.; PÂQUES, M.; MARIEN, J. N.; BOUDET, A. M.; TEULIÈRES, C. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, v.161, p.645-653, 2001.
- HO, C. K.; CHANG, S. H.; TSAY, J. Y.; TSAI, C. J.; CHIANG, V. L.; CHEN, Z. Z. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v.17, p.675-680, 1998.

- IKEMORI, Y. K. **Resultados preliminares sobre enraizamiento de estacas de *Eucalyptus* spp.** [S.l.: s. n. t.], 1975. 12 p. (Informativo Técnico Aracruz, 1).
- ITO, K.; DOI, K.; TATEMICHII, Y.; SHIBATA, M. Plant regeneration of eucalypts from rotating nodule cultures. **Plant Cell Reports**, v.16, p.42-45, 1996.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.
- JOY IV.; THORPE, T. A. Shoot morphogenesis: structure, physiology, biochemistry and molecular biology. In: SOH, W. Y.; BHOJWANI, S. S. (Eds.). **Morphogenesis in plant tissue cultures**. London: Kluwer Academic Publishers, 1999. p.171-214.
- KITAHARA, E. H.; CALDAS, L. S. Shoot and root formation in hypocotyl callus cultures of *Eucalyptus*. **Forest Science**, v.21, p.242-243, 1975.
- LAINÉ, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. **Plant Cell Reports**, v.13, p.473-476, 1994.
- LAKSHMI SITA, G. Micropropagation of *Eucalyptus*. In: AHUJA, M. R. (Ed.). **Micropropagation of woody plants**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.263-280.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society**, v.30, p.421-427, 1981.
- LU, C-YI. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.29, p.92-96, 1993.
- MAJOR, G.; KRAUSE, M.; ROSS, S.; SOTELA, M. Preliminary studies on the somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTUS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, 1997. v.(X), p. 137-142.
- McCOMB, J. A. Clonal propagation of eucalypts. **Plant Tissue Culture Manual**, v.8, p.1-24, 1995.
- MULLINS, K. V.; LLEWELLYN, D. J.; HARTNEY, V. J.; STRAUSS, S.; DENNIS, E. S. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, v.16, n.11, p.787-791, 1997.

- MURALIDHARAN, E. M.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v.6, p.256-259, 1987.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant**, v.31, p.267-275, 1998.
- PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. 4.ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997. 348 p.
- SERRANO, L.; ROCHANGE, F.; SEMBLAT, J. P.; MARQUE, C.; TEULIÈRES, C.; BOUDET, A. M. Genetic transformation of *Eucalyptus globulus* through biolistics: complementary development of procedures for organogenesis from zygotic embryos and stable transformation of corresponding proliferating tissue. **Journal of Experimental Botany**, v.47, n.295, p.285-290, 1996.
- SILVA, L. F. Propagação vegetativa do eucalipto. A experiência da International Paper do Brasil. **IPEF, Notícias**, v.25, p.156, 2001.
- SUBBAIAH, M. M.; MINOCHA, S. C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Reports**, v.9, p.370-373, 1990.
- SUGIYAMA, M. Organogenesis in vitro. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, p.61-64, 1999.
- TERMIGNONI, R. R.; WANG, P. J.; HU, C. Y. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, p.129-132, 1996.
- THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.). **Micropropagation, technology and application**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.311-336.
- THORPE, T. A.; KUMAR, P. P. Cellular control of morphogenesis. In: AHUJA, M. R. (Ed.). **Micropropagation of woody plants**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.11-29.
- TIBOK, A.; BLACKHALL, N. W.; POWER, J. B.; DAVEY, M. R. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. **Plant Science**, v.110, p.139-145, 1995.

- TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2001. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- VIEITEZ, A. M.; SAN-JOSÉ, M. C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants in vitro. **In Vitro Cellular Development and Biology-Plant**, v.32, p.140-147, 1996.
- XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v.20, n.1, p.9-16, 1996.
- XAVIER, A.; COMÉRIO, J.; IANNELLI, C. M. Eficiência da estaquia, da microestaquia e da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* spp. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTUS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo, PR: EMBRAPA, 1997. v.4, p.40-45.
- WAGLEY, L. M.; GLADFELTER, H. J.; PHILLIPS, G. C. De novo shoot organogenesis of *Pinus eldarica* Medw. *In vitro*: II. Macro- and micro-photographic evidence of de novo regeneration. **Plant Cell Reports**, v.6, p.167-171, 1987.
- WARRAG, E.; LESNEY, M. S.; ROCKWOOD, D. J. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. **Plant Cell Reports**, v.9, p.586-589, 1991.
- WATT, M. P.; BLAKEWAY, F.; CRESSWELL, C. F.; HERMAN, B. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, v.157, p.59-65, 1991.
- WATT, M. P.; DUNCAN, E. A.; ING, M. I.; BLAKEWAY, F. C.; HERMAN, B. Field performance of micropropagated and macropropagated *Eucalyptus* hybrids. **South African Forestry Journal**, v.173, p.17-21, 1995.
- WHITE, P. R. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. **American Journal of Botany**, v.30, p.33-36, 1943.
- ZIV, M. Developmental and structural patterns of in vitro plants. In: SOH, W. Y.; BHOJWANI, S. S. (Eds.). **Morphogenesis in plant tissue cultures**. London: Kluwer, 1999. p.235-253.