

NATANE AMARAL MIRANDA

**JARDIM CLONAL *in vitro* NA PROPAGAÇÃO  
VEGETATIVA DE *Eucalyptus* spp.**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Miranda, Natane Amaral, 1990-  
M672j Jardim clonal *in vitro* na propagação vegetativa de  
2018 *Eucalyptus* spp. / Natane Amaral Miranda. – Viçosa, MG, 2018.  
x, 88f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Aloísio Xavier.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Melhoramento genético. 2. Eucalipto -  
Propagação *in vitro*. 3. Eucalipto - Propagação por estaquia.  
4. Clonagem. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Engenharia Florestal. Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Florestal. II. Título.

CDO adapt CDD 634.923213

NATANE AMARAL MIRANDA

**JARDIM CLONAL *in vitro* NA PROPAGAÇÃO  
VEGETATIVA DE *Eucalyptus* spp.**

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

APROVADA: 29 de maio de 2018.

---

Diego Silva Batista

---

Elizabete Keiko Takahashi

---

Edgard Augusto de Toledo Picoli

---

Haroldo Nogueira de Paiva

---

Aloisio Xavier  
(Orientador)

*Aos meus pais Luciene e Dimas,  
e irmã Jéssica,  
pelo incentivo, amor e orações.*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por iluminar meu caminho e por nunca me abandonar.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal e ao Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCT-II) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pela realização do curso de doutorado e deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Ao meu orientador Aloisio Xavier pelos ensinamentos e confiança ao longo destes anos. Serei eternamente grata. Ao meu coorientador Wagner Campos Otoni por todas as contribuições tanto com o trabalho como para minha formação acadêmica. Muito obrigada!

Aos meus pais, pela educação, pelo exemplo de vida e por todas as orações. À minha irmã pelo incentivo, preocupação e auxílio de sempre.

Aos amigos de Serro e Diamantina que mesmo distantes se fazem presentes. Obrigada pela torcida. Aos grandes amigos que conquistei em Viçosa com os quais compartilhei os melhores dias nesta cidade, em especial aos meus amigos da pós-graduação e da república. Obrigada pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos do LCT-II, pela troca de experiências, pelo auxílio na execução dos trabalhos e pelas confraternizações. Adorei trabalhar neste laboratório. Aos bolsistas de iniciação científica pela ajuda com o desenvolvimento desse trabalho e ao grupo de pesquisa em Silvicultura Clonal.

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

## BIOGRAFIA

NATANE AMARAL MIRANDA, filha de Dimas do Amaral Saleme e de Luciene de Miranda Silva Saleme, nasceu em 07 de março de 1990, em Serro, Minas Gerais.

Concluiu o 1º grau em 2004, e o 2º grau em 2007, no Colégio Nossa Senhora da Conceição, em Serro, Minas Gerais.

Em março de 2008, ingressou no Curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), campus de Diamantina, Minas Gerais, concluindo o curso em abril de 2013.

Em maio de 2013, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Minas Gerais, concluindo os requisitos necessários à obtenção do título de *Magister Scientiae* em fevereiro de 2015.

Em março de 2015, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, concluindo os requisitos necessários à obtenção do título de *Doctor Scientiae* em maio de 2018.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. O <i>Eucalyptus</i> .....	3
2.2. Propagação vegetativa .....	4
2.3. Propagação por estaquia .....	6
2.4. Micropropagação .....	8
2.5. Propagação fotoautotrófica <i>in vitro</i> .....	10
2.6. Jardim clonal .....	12
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	13
<b>PARÂMETROS GENÉTICOS, RECIPIENTES E SUBSTRATOS NA PROPAGAÇÃO <i>in vitro</i> DE CLONES DE <i>Eucalyptus</i></b> .....	24
1. Introdução .....	24
2. Material e métodos .....	26
2.1. Material vegetal e condições de cultivo .....	26
2.2. Recipientes .....	27
2.3. Substratos .....	28
2.4. Coleta e análise de dados .....	28
3. Resultados .....	29
3.1. Recipientes .....	29
3.2. Substratos .....	32
4. Discussão .....	34
5. Conclusões .....	37
6. Referências bibliográficas .....	37
<b>TROCAS GASOSAS E SACAROSE NO DESENVOLVIMENTO <i>in vitro</i> DE MICROCEPAS DE <i>Eucalyptus urophylla</i></b> .....	41
1. Introdução .....	41
2. Material e métodos .....	43
2.1. Material vegetal e condições de cultivo .....	43
2.2. Análise de crescimento e pigmentos fotossintéticos .....	44
2.3. Contagem estomática .....	44
2.4. Sobrevivência de microestacas <i>ex vitro</i> .....	45
2.5. Delineamento experimental e análise de dados .....	45
3. Resultados .....	46

4. Discussão.....	50
5. Conclusões .....	53
6. Referências bibliográficas .....	53
<b>QUALIDADE E INTENSIDADE DE LUZ NO DESENVOLVIMENTO DE MICROCEPAS <i>in vitro</i> DE <i>Eucalyptus urophylla</i> EM SISTEMA FOTOAUTOTRÓFICO .....</b>	<b>57</b>
1. Introdução.....	57
2. Material e métodos .....	59
2.1. Material vegetal .....	59
2.2. Qualidade de luz .....	60
2.3. Intensidade de luz .....	61
2.4. Análise de crescimento .....	61
2.5. Análise de pigmentos fotossintéticos.....	62
2.6. Quantificação de celulose .....	62
2.7. Delineamento experimental e análise de dados .....	62
3. Resultados .....	63
3.1. Qualidade de luz .....	63
3.2. Intensidade de luz .....	64
4. Discussão.....	65
5. Conclusões .....	68
6. Referências bibliográficas .....	68
<b>APLICABILIDADE DO JARDIM CLONAL <i>in vitro</i> NA PROPAGAÇÃO DE <i>Eucalyptus urophylla</i> .....</b>	<b>73</b>
1. Introdução.....	73
2. Material e métodos .....	75
2.1. Formação do jardim clonal <i>in vitro</i> .....	75
2.2. Formação do minijardim clonal <i>ex vitro</i> .....	76
2.3. Coleta e enraizamento das miniestacas/microestacas .....	77
2.4. Coleta e análise de dados .....	78
3. Resultados .....	79
4. Discussão.....	80
5. Conclusões .....	83
6. Referências bibliográficas .....	83
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>87</b>



## RESUMO

MIRANDA, Natane Amaral, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2018. **Jardim clonal *in vitro* na propagação vegetativa de *Eucalyptus* spp.** Orientador: Aloisio Xavier. Coorientador: Wagner Campos Otoni.

O sucesso da produtividade nos plantios de *Eucalyptus* no Brasil tem sido função da combinação de diversos fatores, entre os quais encontra-se os avanços das tecnologias da propagação clonal. A produção de miniestacas a partir do minijardim clonal em viveiro é a principal metodologia adotada para produção de mudas de *Eucalyptus*, com avanços importantes em produtividade, controle ambiental e fitossanitário; no entanto, ainda com algumas limitações e desafios. Como alternativas, a micropropagação tem sido considerada como promissora na produção de mudas clonais, havendo porém, limitações à sua adoção, como a necessidade de estrutura física e operacional de um laboratório, e de protocolos ajustados para cada material vegetal. Assim, objetiva-se nesse trabalho verificar a viabilidade de um jardim clonal *in vitro* por meio da avaliação de diferentes composições de substratos, tipos e tamanhos de recipientes, formas de vedação, concentrações de sacarose e diferentes intensidades e qualidade de luz. Avaliou-se em dez genótipos de *Eucalyptus*, diferentes tipos de recipientes e substratos. O recipiente frasco de vidro de 250 mL de capacidade permitiu melhor crescimento das plantas. O ágar e a vermiculita foram os substratos que possibilitaram melhor crescimento *in vitro*. Além das diferenças observadas entre substratos e recipientes, constatou-se efeito do fator genético sobre as características, o que possibilita a seleção de clones para propagação sob as condições avaliadas. Para estabelecimento de jardim clonal *in vitro*, sob condições que estimulam o comportamento fotoautotrófico, testou-se a ausência e presença de membranas para trocas gasosas, bem como diferentes concentrações de sacarose na formação inicial da microcepa. A sacarose foi importante, inicialmente, com resultados crescentes para todas as características com o uso de concentrações até 20 g L<sup>-1</sup>, exceto para número de estacas obtidas aos 150 dias. A presença de membranas para maiores trocas gasosas nos frascos permitiu melhor crescimento das microestacas, tanto *in vitro* quanto *ex vitro*. Fontes luminosas fluorescentes e LED proporcionaram crescimento de microestacas *in vitro*, apresentando diferenças para algumas características analisadas. Em relação à intensidade luminosa, não foi observada diferença no crescimento das microcepas. O jardim clonal *in vitro* apresentou maior produtividade por área de

microestacas comparativamente ao sistema convencional de produção de miniestacas no minijardim clonal, sendo as taxas de enraizamento e sobrevivência semelhantes nos dois sistemas. No entanto, acompanhamento em diferentes estações do ano, padrões de minijardins clonais, avaliações com diferentes genótipos (clones), assim como viabilidade técnica, operacional e econômica devem ser realizadas.

## ABSTRACT

MIRANDA, Natane Amaral, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2018. ***In vitro* clonal hedge in the vegetative propagation of *Eucalyptus* spp.** Advisor: Aloisio Xavier. Co-advisor: Wagner Campos Otoni

The success of productivity in the *Eucalyptus* plantations in Brazil is due combination of several factors, among them are the advances of clonal propagation technologies. The production of mini-cuttings from mini-clonal hedge in nursery stage is the most adopted methodology for the production of *Eucalyptus* plantlets, with important advances in productivity and environmental and phytosanitary control; however, there is still some limitations and difficulties. As an alternative, micropropagation has been considered promising in the production of clonal plantlets, but there are limitations to its adoption, such as the need for a physical and operational structure of a laboratory, and protocols to be adjusted for each species. The objective of this work was to verify the efficiency of an *in vitro* clonal hedge through the evaluation of different substrates compositions, types of vessels, forms of sealing, sucrose concentrations and different light intensities and quality. For this, ten *Eucalyptus* genotypes, different types of vessels and substrates were evaluated. As a result, the vessel that allowed the best plant growth was the 250 mL glass flask. For the substrate, agar and vermiculite enabled better *in vitro* growth of the plants. In addition to the differences observed among substrates and vessels, genetic control of the characteristics was also verified, which allows the selection of clones for propagation under those conditions. For the establishment of an *in vitro* clonal hedge, under conditions that stimulate photoautotrophy, the absence and presence of membranes that allow gas exchange, as well as different sucrose concentrations in the initial formation of micro-stumps were tested. Sucrose was important initially, and increasing results were observed with the use of concentrations up to 20 g L<sup>-1</sup> for all characteristics except for number of cuttings obtained at 150 days. The presence of membranes that allow higher gas exchange led to a better development of the micro-cuttings both *in vitro* and *ex vitro*. Fluorescent and LED lights provided good plant development, showing differences for some characteristics analyzed. Regarding the intensity, no difference was observed in the development of micro-stumps. When comparing the mini-cutting/micro-cutting production, the conventional mini-clonal hedge system and the *in vitro* clonal hedge system show higher productivity per area in the *in vitro* clonal hedge, with rooting and

survival rates being similar in both systems. However, monitoring in different seasons of the year, establishment of patterns of mini-clonal hedge, evaluations with different genotypes (clones), as well as technical, operational and economic viability should be performed.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Eucalyptus* engloba plantas arbóreas e arbustivas, que tem como centro de origem a Austrália (PRYOR, 1976). Algumas espécies desse gênero possuem grande importância econômica mundial devido ao seu uso industrial. No Brasil, o setor de árvores plantadas conta com uma área de 7,84 milhões de hectares, dos quais os plantios de *Eucalyptus* ocupam 5,7 milhões de hectares (IBA, 2017).

O sucesso da produtividade dos plantios de *Eucalyptus* no Brasil é função da combinação de diversos fatores, entre os quais são citados os programas de silvicultura clonal bem estabelecidos, as estratégias de melhoramento genético em constante desenvolvimento, a produção de híbridos específicos e a seleção de clones elite, e o avanço das tecnologias da propagação clonal (XAVIER et al., 2013).

Dentre as técnicas de propagação vegetativa, a estaquia constitui-se em uma das principais na propagação de clones selecionados visando atender aos objetivos da silvicultura clonal. No Brasil, esta técnica foi aperfeiçoada para contornar desafios como a obtenção de material vegetativo com grau de juvenildade e vigor fisiológico adequado ao enraizamento de estacas, e a manutenção de áreas de coletas das mesmas. Assim, o processo culminou no desenvolvimento da miniestaquia e no uso da micropropagação para desenvolvimento da microestaquia (XAVIER e COMÉRIO, 1996; ALFENAS et al., 2009; XAVIER et al., 2013).

A clonagem do *Eucalyptus* por meio da propagação vegetativa via miniestaquia tem sido adotada pela maioria das empresas florestais (ALFENAS et al., 2009). No entanto, em determinadas situações, algumas empresas utilizam a técnica de micropropagação para a produção massal de genótipos selecionados (WATT et al., 2003), ou ainda, para o revigoração/rejuvenescimento de materiais adultos (XAVIER; COMÉRIO, 1996; BACCARIN et al., 2015; SHANTHI et al., 2015).

A técnica de micropropagação traz inúmeras vantagens ao processo de produção de mudas de *Eucalyptus*, como a propagação massal de clones em curto espaço de tempo; maior controle nutricional, ambiental e fitossanitário; transporte do material clonal por grandes distâncias sem danos e com segurança; armazenamento por longos períodos; retenção do vigor híbrido e revigoração/rejuvenescimento do material (BISHT et al., 1999; DUTRA et al. 2009; XAVIER et al., 2013; READ; PREECE, 2014). Além disso, os problemas de enraizamento de estacas, principalmente observados em árvores adultas devido à alta produção de inibidores ao

enraizamento, metabólitos secundários e fenóis, podem ser minimizados ou até solucionados pelo emprego da micropropagação como técnica de rejuvenescimento do material clonal (JOSHI et al., 2003; SHANTHI et al., 2015).

Atualmente, há limitações à adoção da técnica de micropropagação em larga escala, a qual depende da existência de estrutura física e operacional de um laboratório, protocolos de micropropagação ajustados para espécies e clones, além do alto custo de produção e pouco investimento para desenvolvimento e inovação no processo de produção *in vitro* (KAUR; SANDHU, 2015; SHUKLA et al., 2017; NUNES et al., 2018). Adicionalmente, plantas com capacidade de sobrevivência *ex vitro* limitada são frequentemente produzidas (CHANDRA et al., 2010; DIAS et al., 2014).

Os minijardins de *Eucalyptus* estabelecidos em viveiro são os mais empregados pelas empresas florestais, os quais têm apresentado desafios variados no atendimento à produção comercial de mudas clonais (XAVIER et al., 2013). O uso de um jardim clonal *in vitro* para produção de microestacas pode ser apontado como uma alternativa para produção de mudas, visando contornar condições desfavoráveis do sistema tradicional de produção de mudas utilizando os minijardins clonais estabelecidos na condição *ex vitro*.

O jardim clonal *in vitro* preconiza contornar alguns desafios encontrados no jardim clonal em viveiro, agregando à técnica convencional de produção de estacas as vantagens da propagação *in vitro*. Condições de assepsia e maior controle ambiental são alguns fatores positivos incorporados ao sistema; entretanto, para proporcionar condições adequadas para o processo de desenvolvimento das plantas *in vitro* é preciso conhecer os efeitos dos diversos fatores que podem ser controlados.

Condições *in vitro*, tais como baixa intensidade luminosa, alta umidade relativa, níveis de sacarose e outros nutrientes podem causar alterações nas plantas que têm efeitos negativos sobre a aclimação de plantas. O manejo de condições *in vitro*, como luminosidade, níveis sacarose, nutrientes e umidade relativa, pode melhorar o desempenho fotossintético das plântulas em estágios iniciais após a transferência *ex vitro*, desempenhando um papel chave na melhoria do estresse de adaptação (BARRALES-LÓPEZ et al., 2015; SAÉZ et al., 2015).

Para aumentar a eficiência no desenvolvimento das culturas vegetais e reduzir custos na propagação *in vitro*, novas tecnologias têm focado mais no controle de fatores ambientais físicos do que em fatores biológicos (KIRDMANEE; MOSALEEYANON, 2000). Muitos conceitos da micropropagação convencional

como meio de cultivo, tipo de recipiente, sistema de produção, heterotrofia estão mudando. Os estudos relacionados aos sistemas fotoautotróficos, biorreatores e a automatização dos sistemas vem crescendo mundialmente, para elaborar protocolos eficientes para propagação de plantas (ARENCEBIA et al., 2017; BUSINGE et al., 2017; SHUKLA et al., 2017). O estabelecimento de condições fotoautotróficas e a automatização dos sistemas são tendências atuais, em relação às condições de cultivo *in vitro* (ARENCEBIA et al., 2013; ASSIS et al., 2016; TISARUM et al., 2018).

O estudo de condições de cultivo no desenvolvimento do jardim clonal *in vitro* torna-se fundamental para o estabelecimento de ambiente favorável para microcepas de clones de *Eucalyptus*. Nesse contexto, o presente trabalho teve como enfoque principal testar diferentes fatores no cultivo *in vitro* para estabelecer jardim clonal *in vitro* visando a produção de mudas clonais de *Eucalyptus*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O *Eucalyptus*

A família *Myrtaceae* compõe grande parte da vegetação natural australiana e ilhas adjacentes, e, dentre os membros dessa família está o gênero *Eucalyptus*, o qual apresenta mais de 600 espécies, variedades e híbridos naturais (MYERSCOUGH, 1998; BOLAND et al., 2006; MERCHANT et al., 2006; STEANEA et al., 2011). A grande maioria das espécies do gênero *Eucalyptus* ocorre naturalmente na Austrália, exceto as espécies *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus deglupta*, que têm ocorrência natural fora do país (MOURA, 2004).

Algumas espécies de *Eucalyptus* são cultivadas em aproximadamente 100 países tropicais e subtropicais. Grande destaque no seguimento de celulose e papel é dado à China, Estados Unidos, Japão, Índia, Alemanha, Canadá e Brasil, utilizando madeira de *Eucalyptus* (IBÁ, 2017). Entretanto, não são numerosas as espécies e híbridos que vêm sendo utilizadas em escala comercial (MOURA; GUIMARÃES, 2003).

As espécies do gênero usadas em plantios comerciais destinam-se a diversas finalidades, sendo a principal utilização voltada ao abastecimento de matéria-prima para as indústrias de celulose e papel, utilização da madeira na construção civil, móveis, caixotaria, além da produção de carvão vegetal (FERREIRA et al., 1997;

ROCHA; TOMASELLI, 2002; ROCHA; TRUGILHO, 2006; LIMA et al., 2007; ZANUNCIO et al., 2014; ROJO et al., 2015).

O plantio de florestas de *Eucalyptus* também possui uma contribuição importante na conservação de florestas nativas (MARTINS, 2014). Adicionalmente, pode ser utilizado para produção de óleos na indústria farmacêutica, extração de compostos medicinais, como tanino e óleos essenciais (HAFSA et al., 2016; MIRANDA et al., 2016; AFZAL et al., 2017; SARTORI et al., 2018), e para fixação de carbono (ALFENAS et al., 2009).

Os primeiros estudos com *Eucalyptus* no Brasil só foram iniciados em 1904, por Edmundo Navarro de Andrade, para a Companhia Paulista de Estradas de Ferro. Devido às características de produtividade, capacidade de adaptação e crescimento rápido, houve grande crescimento no país de áreas plantadas desse gênero principalmente a partir da década de 60, com a promulgação da Lei de Incentivos Fiscais ao Reflorestamento (VENTURIN et al., 2014).

No Brasil, o uso da madeira de *Eucalyptus* em indústrias vem se expandindo, principalmente por ser amplamente utilizada na obtenção de polpa de celulose. Atualmente o país detém a maior área de plantio desse gênero com cerca de 5,7 milhões de hectares, e estão localizados principalmente em Minas Gerais (24%), em São Paulo (17%) e no Mato Grosso do Sul (15%) (IBA, 2017).

Ganhos significativos em produtividade têm sido obtidos para o gênero *Eucalyptus* por meio do melhoramento genético (CASTRO et al., 2016; MÜLLER et al., 2017), com utilização de clones superiores, os quais são identificados nas avaliações de testes clonais (SANTOS et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017). Para a multiplicação clonal, as grandes empresas florestais utilizam a técnica de miniestaquia para a clonagem do *Eucalyptus*, sendo essa a técnica de propagação vegetativa mais difundida na atualidade para esse gênero (ALFENAS et al., 2009). Em certos casos, a cultura de tecidos por meio da micropropagação também tem sido considerada para a produção massal de genótipos selecionados (WATT et al., 2003; XAVIER et al., 2013).

## **2.2. Propagação vegetativa**

Existem duas formas de propagação, via sexuada e assexuada; a primeira caracterizada pelo uso de sementes e a segunda tem como elemento de proliferação os



propágulos vegetativos. A propagação vegetativa de plantas consiste no processo de multiplicação, perpetuação e manutenção da sua juvenilidade, sendo requerido prática, paciência e conhecimento dos procedimentos técnicos envolvidos, para uma propagação vegetal bem sucedida (HARTMANN et al., 2011).

A clonagem de espécies do gênero *Eucalyptus* teve início no Brasil na década de 1970 (CAMPINHOS; IKEMORI, 1983). Introduzida no Brasil pela equipe de pesquisa da Aracruz Florestal, a clonagem proporcionou grandes ganhos ao setor florestal, modificando completamente a fisionomia dos plantios (VENTURIN et al., 2014). Desde a introdução da clonagem, a eucaliptocultura brasileira vem avançando, principalmente no que tange as técnicas de produção de mudas, uso de material genético superior, controle de doenças e tratos culturais para estabelecimento de florestas (ALFENAS et al., 2009).

A propagação vegetativa é importante quando se deseja multiplicar um genótipo que é altamente heterozigoto e que apresenta características consideradas superiores, as quais se perdem quando propagadas por sementes (PAIVA; GOMES, 2013). Sendo assim, uma das principais implicações da forma de propagação das plantas está no fato de os plantios via propagação assexuada constituírem-se em populações com maior uniformidade em ambiente homogêneo em relação àquelas oriundas de sementes, o que se torna vantajoso em muitas situações no campo da silvicultura intensiva, como é o caso do *Eucalyptus* (XAVIER et al., 2013).

A clonagem constitui o processo ideal para maximizar os benefícios da hibridação no contexto da formação de povoamentos altamente produtivos para finalidades industriais. A grande variação entre as espécies, em termos de crescimento e propriedades tecnológicas da madeira, por exemplo, é um fator importante na produção de combinações complementares, capazes de proporcionar ganhos simultâneos em diferentes características (MADHIBHA et al., 2013). O aproveitamento comercial da heterose em híbridos de *Eucalyptus*, por intermédio da clonagem, é um dos responsáveis pela rápida evolução da produtividade florestal nos últimos anos e é um dos exemplos mais bem sucedidos do uso de híbridos em espécies florestais (ASSIS; MAFIA, 2007).

As técnicas de propagação vegetativa são a base da silvicultura clonal, sobretudo pela sua efetividade em capturar os ganhos genéticos obtidos dos programas de melhoramento, constituindo atualmente um dos principais processos de produção de mudas (WENDLING et al., 2006; XAVIER et al., 2013). A fundamentação dessa

técnica está baseada na seleção de clones de alta produtividade, que são normalmente identificados nas avaliações de testes clonais para, posteriormente, proceder a propagação clonal massal (SILVA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2017)

Há diversos fatores ligados ao grau de sucesso da propagação vegetativa, que é influenciada pela espécie ou clone, estação do ano, condições fisiológicas da planta mãe, variações nas condições climáticas, posição do propágulo na planta mãe, tamanho, tipo e hora de coleta do propágulo, meio de enraizamento e substâncias de crescimento (HARTMANN et al., 2011). Portanto, as variações do sucesso de propagação vegetativa originam-se de uma interação de fatores externos e internos inerentes, presentes nas células das plantas.

### **2.3. Propagação por estaquia**

A estaquia é um processo de propagação vegetativa que consiste em promover o enraizamento de partes da planta, podendo ser caules, raízes ou folhas; no entanto, a escolha da estaca apropriada deve ser feita com base na facilidade de enraizamento da espécie/clone, no padrão de muda desejada e nas facilidades disponíveis de infraestrutura física, técnica, pessoal e orçamentária, para obtenção do sucesso da propagação vegetativa (FERRARI et al., 2004; XAVIER et al., 2013).

O processo de estaquia se dá pela obtenção do material a ser propagado (estacas), podendo este ser obtido de material em campo que possua características que atendam os objetivos a serem alcançados com a clonagem, ou podem ser colhido no jardim clonal (ALFENAS et al., 2009; PAIVA; GOMES, 2013; XAVIER et al., 2013). Posteriormente à coleta, as estacas permanecem na casa de vegetação e, quando enraizadas, são aclimatadas em casa de sombra e, em seguida, transferidas para um local de pleno sol, onde completarão seu desenvolvimento e receberão os tratamentos finais antes de serem levadas ao campo (HIGASHI et al., 2000; PAIVA; GOMES, 2013).

Propagação de plantas por estaquia é uma estratégia comum para maximizar o crescimento, a uniformidade e a qualidade do produto em sistemas florestais (SNEDDEN et al. 2010; NAVARRETE-CAMPOS et al. 2013). Propagação por estacas também é usada quando a oferta de mudas é limitada pela inacessibilidade de sementes, floração irregular, baixa produção de sementes ou baixa taxa de germinação (POHIO et al. 2005; AMRI et al. 2010). Algumas espécies de *Eucalyptus* são altamente

receptivas à propagação vegetativa (WENDLING; XAVIER, 2005; CUNHA et al. 2009a, b; WU et al., 2011). No entanto, muitas delas ainda são consideradas de difícil propagação a partir de estacas (BRONDANI et al., 2012; OBERSCHELP et al., 2015; TRUEMAN, 2018).

Melhoria de taxas de enraizamento de estacas foi observada ao longo dos anos com vários estudos a cerca principalmente do controle de aplicação de reguladores de crescimento (LEAKEY 2004; ATANGANA et al., 2006; TRUEMAN; RICHARDSON, 2007; WENDLING et al., 2010; MAJADA et al., 2011) e maior controle de condições ambientais no enraizamento, como a temperatura (TRUEMAN; RICHARDSON 2008; CUNHA et al. 2009b). Os viveiros de *Eucalyptus* normalmente fornecem ambientes parcialmente protegidos, como câmaras de polietileno ou estufas com irrigação por nebulização, visando proporcionar condições adequadas para o enraizamento adventício (MCNABB et al., 2002; ASSIS et al., 2004; SAYA et al., 2008). No entanto, o controle ambiental é muitas vezes insatisfatório para promover o crescimento das estacas.

O uso de estufas e túneis plásticos tem sido proposto, o que muda consideravelmente os ambientes disponíveis para o crescimento e propagação das plantas, oferecendo controle parcial dos efeitos adversos das condições climáticas, aumentando a produtividade, acelerando o crescimento das plantas e diminuindo o tempo de coleta de estacas (WASSNER; RAVETTA, 2000; BATISTA et al., 2015). Melhora significativa já foi observada na produtividade, taxa de enraizamento e qualidade da raiz, com redução da formação de calos em clones de algumas espécies de *Eucalyptus* (ASSIS, 2011).

Para a maioria das espécies lenhosas, um fator limitante no sucesso da estaquia é a juvenilidade do material a ser propagado. Estacas de mudas juvenis enraízam facilmente, enquanto outras provenientes de plantas mais velhas o fazem com maior dificuldade, ou não enraízam (MAJADA et al., 2011; HUSEN; GONDAR, 2012; XAVIER et al., 2013). A perda de competência de enraizamento relacionada à maturação é um fator limitante importante na propagação clonal de espécies lenhosas (PIJUT et al., 2011; HUSEN; GONDAR, 2012; BACCARIN et al., 2015).

Dentre os principais fatores que afetam o enraizamento das estacas estão os relacionados com o genótipo, as condições fisiológicas e de nutrição mineral da planta matriz, o armazenamento e sanidade das estacas, as condições ambientais, o teor de carboidratos dos propágulos vegetativos (HARTMANN et al., 2011; XAVIER et al.,

2013). Assim, o manejo das plantas fornecedoras de estacas e a manipulação das condições ambientais afetam o enraizamento das estacas produzidas.

Para o gênero *Eucalyptus*, a clonagem de plantas adultas com o uso da técnica de estaquia somente foi realizada com sucesso no início dos anos 70. Inicialmente, as mudas clonais eram produzidas por enraizamento de estacas, atualmente denominadas macroestacas, obtidas a partir de brotações colhidas em áreas de campo (ALFENAS et al., 2009). As dificuldades de propagação vegetativa encontradas no processo envolvendo material adulto foram fatores importantes para transição da estaquia para processos denominados de miniestaquia e microestaquia (XAVIER et al., 2013; BRONDANI et al., 2017).

A miniestaquia e microestaquia são variações da técnica de estaquia desenvolvidas para produção comercial de mudas clonais de *Eucalyptus*. A miniestaquia apresenta variações metodológicas, quando comparada à estaquia, que permitem a otimização do enraizamento e qualidade da muda clonal. A microestaquia foi desenvolvida com o mesmo objetivo de aproveitar o máximo da juvenildade fisiológica dos propágulos vegetativos utilizando-se de estruturas de laboratório de micropropagação. Assim, operacionalmente, a microestaquia diferencia-se da miniestaquia basicamente pela origem do material que compõe o jardim clonal (SANTOS et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; ALFENAS et al., 2009; XAVIER et al., 2013).

Em termos gerais, como principais vantagens da miniestaquia e microestaquia em relação à estaquia convencional podem-se citar: redução dos efeitos de variações sazonais no enraizamento dos propágulos; maior facilidade no controle de patógenos, das condições nutricionais e hídricas; maior produtividade, maior produção de propágulos por área; melhor resposta de enraizamento; formação de muda em menor tempo e redução do uso de reguladores de crescimento (XAVIER et al., 2013).

#### **2.4. Micropropagação**

A micropropagação está certamente entre as principais técnicas disponíveis para a produção de materiais vegetativos. Dentre as suas vantagens, merecendo destaque a produção rápida de materiais propagativos, livres de doenças e pragas, com elevada qualidade genética, em tempo e espaço reduzido, sendo possível produzir grandes quantidades de plantas uniformes, sob condições controladas, sem a influência

das variações climáticas (ROCHA, 2009). Pode, ainda, ser utilizada tanto no resgate quanto no rejuvenescimento de árvores adultas (ALFENAS et al., 2009).

O sucesso da micropropagação depende não só dos fatores inerentes ao tecido vegetal (HAYASHI et al., 2002; SCHUCH et al., 2008; BORGES et al., 2012) como também do meio de cultura utilizado, reguladores de crescimento e condições de incubação (BASSAN et al., 2006; JARDIM et al., 2010; GOLLE et al., 2012). As exigências requeridas em condições *in vitro* variam muito entre as espécies/clones.

Na silvicultura clonal de *Eucalyptus*, a micropropagação tem sido usada como técnica de revigoração/rejuvenescimento de clones selecionados, objetivando a melhoria do enraizamento no processo de produção de mudas por microestaquia (XAVIER; COMÉRIO, 1996; TITON et al., 2002; XAVIER et al., 2007). Além disso, tem sido utilizada como técnica de limpeza clonal na eliminação de patógenos e como base para outras técnicas biotecnológicas, como a propagação de plantas transgênicas e poliploidização de clones (XAVIER et al., 2013).

O processo de micropropagação usado para rejuvenescimento consiste basicamente das seguintes fases: (i) seleção, desinfestação, indução e cultivo de explantes em meio nutritivo sob condições assépticas; (ii) multiplicação dos propágulos a partir de sucessivos subcultivos em meio adequado de multiplicação; e (iii) cultivo de propágulos vegetativos em meio de enraizamento e subsequente transplântio da microestaca enraizada para substrato apropriado (DUTRA et al., 2009; XAVIER et al., 2013)

O uso da micropropagação na produção comercial de mudas de *Eucalyptus* é indicada, principalmente, para o revigoração/rejuvenescimento de clones selecionados em laboratório, para espécies e híbridos de alto valor comercial e de difícil enraizamento. Embora a micropropagação tenha inúmeras vantagens na propagação, em muitos casos ainda é inviável sob ponto de vista econômico para uso em larga escala (ASSIS; MAFIA, 2007).

Mesmo com suas limitações, a micropropagação de espécies e híbridos de *Eucalyptus* faz parte do processo de produção de mudas em algumas empresas florestais. Normalmente, as mudas obtidas por micropropagação são mantidas em condições *in vitro* por questões estratégicas, no caso de material vegetal superior, ou servem para abastecer o microjardim clonal (DUTRA et al., 2009).

## 2.5. Propagação fotoautotrófica *in vitro*

Uma tendência a seguir em relação às condições de cultivo para reduzir os desafios criados pelo crescimento tradicional *in vitro*, está relacionada ao melhor aproveitamento de luz, aumento da concentração de CO<sub>2</sub>, redução ou eliminação da concentração de sacarose e retirada de componentes orgânicos do meio de cultivo, tornando assim o crescimento fotoautotrófico (KOZAI, 2010).

O conceito de micropropagação fotoautotrófica é derivado de uma pesquisa que revelou que as plantas clorofiladas como explantes de folhas e plântulas possuíam elevada capacidade fotossintética, quando cultivadas *in vitro* em meio sem sacarose (ZOBAYED et al. 2001; KOZAI, 2010). Várias espécies de plantas tem sido cultivadas em sistema fotoautotrófico com sucesso: *Hypericum perforatum* L. (COUCEIRO et al., 2006); *Dendrobium candidum* Wall (XIAO et al., 2007); *Momordica grosvenori* Swingle (ZHANG et al., 2009); *Uniola paniculata* L. (VALERO-ARACAMA et al., 2007); *Mouriri elliptica* Mart. (ASSIS et al., 2016); *Scenedesmus* sp. (DI CAPRIO et al., 2018). O crescimento fotoautotrófico pode ser mais produtivo que o sistema tradicional e ser usado para obtenção de plântulas de qualidade em larga escala, em menor espaço físico e mais facilmente adaptáveis às condições *ex vitro* (XIAO et al., 2011),

Diferentes práticas têm sido testadas para promover o crescimento fotoautotrófico das plantas *in vitro* e, conseqüentemente, reduzir os custos de produção. Entre elas, destacam-se a eliminação total ou parcial da sacarose do meio de cultura (MOSALEEYANON et al., 2004; NGUYEN; KOZAI, 2005); o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> (SALDANHA et al., 2014; JIMÉNEZ et al., 2015; TISARUM et al., 2018), a redução da umidade relativa e da concentração de etileno do frasco de cultivo (SALDANHA et al., 2012; MARTINS et al., 2015), o aumento da intensidade luminosa (ASSIS et al., 2016; JEONG; SIVANESAN, 2018) e a substituição do ágar por materiais de suporte fibrosos ou porosos (DEB; PONGENER, 2013; SALDANHA et al., 2014; GALLO et al., 2017), que mostram ser benéficos ao enraizamento sob condições de alta concentração de CO<sub>2</sub>.

A sacarose é a fonte de carbono mais comum usada no cultivo de planta, tecido e cultura de órgãos em sistema heterotrófico. Em geral 3% de sacarose é adicionado ao meio desde que Murashige e Skoog, em 1962, descreveram o seu meio MS. Altos teores de sacarose durante o processo de cultura de tecidos vegetais são usados como

fonte de energia para sustentar o metabolismo heterotrófico e fotomixotrófico (GAGO et al., 2014). Condições *in vitro* são estressantes para o crescimento das plantas e o açúcar exógeno é a principal causa de estresse da planta durante o cultivo *in vitro* (GASPAR et al., 2002; DESJARDINS et al., 2007). O alto teor de açúcar exógeno no meio pode reduzir a capacidade fotossintética da planta (HAZARIKA, 2006; BADR et al., 2011).

A atmosfera interna em recipientes convencionais *in vitro* consiste em alta umidade relativa do ar, concentrações variáveis de CO<sub>2</sub> e potencial de acúmulo de etileno e outros gases (KOZAI, 2010). A elevada inserção de CO<sub>2</sub> *in vitro* aumenta as taxas de fixação de carbono fotossintético, que estimula o crescimento e desenvolvimento da planta. Além disso, foi relatado que as plantas geralmente respondem ao enriquecimento de CO<sub>2</sub> atmosférico por meio da mitigação de estresse hídrico (WALL et al., 2006; VU; ALLEN JUNIOR, 2009). Esta capacidade de resposta das plantas ao teor elevado de CO<sub>2</sub> na condição *in vitro* tem sido usado para acelerar o crescimento e produtividade da planta, com melhoria na fase subsequente de aclimação (RODRIGUEZ et al., 2008; SHIN et al., 2014).

O aumento da concentração de CO<sub>2</sub>, no interior do recipiente de cultura em condições assépticas, e simultaneamente, a redução da umidade relativa e da concentração de etileno ao redor da planta, têm-se conseguido de forma natural ou forçada. A ventilação natural pode ser obtida através dos discos de filtro nas laterais do recipiente ou sobre a tampa (KITAYA et al., 1995). Tampas de fechamento dos frascos de cultivo mais permeáveis, ou outro material que permita a troca gasosa do exterior para o interior, ou enriquecimento da sala de crescimento com CO<sub>2</sub>, tem sido muito utilizados.

O decréscimo na umidade relativa com a maior troca gasosa no frasco aumenta significativamente a taxa de transpiração da planta, e conseqüentemente a absorção de água e de nutrientes. Ao mesmo tempo, a redução da umidade relativa reduz a incidência de hiperhidricidade nas plantas, favorece a formação de cutícula nas folhas e o funcionamento normal dos estômatos, aumentando a tolerância ao estresse hídrico (ZOBAYED et al., 2001) e facilitando a aclimação das plantas. Com o aumento das trocas gasosas no recipiente de cultivo, a concentração de etileno tende a ser reduzida, minimizando os efeitos adversos quanto ao desenvolvimento das plantas relativos à diferenciação, ao desenvolvimento, à morfologia e ao crescimento das plantas.

A técnica de micropropagação convencional é realizada utilizando pequenos recipientes de cultura contendo ágar ou outros agentes gelificantes, nos quais se encontram os nutrientes e sacarose em uma situação de baixa atividade fotossintética (XIAO et al., 2011). Prevê-se que a utilização de recipientes maiores para a propagação em escala comercial pode reduzir os custos de produção significativamente, tornando o custo de trabalho cerca de metade do sistema convencional (KOZAI et al., 2005), pode melhorar a qualidade de transplantes e a sobrevivência *ex vitro*, diminuir o período de produção, e simplificar o processo de propagação.

A qualidade e a quantidade de luz são alguns dos principais fatores relacionados ao sucesso da propagação *in vitro*, sendo importante na propagação em larga escala. Com o advento da tecnologia de diodos emissores de luz (LED), houve progresso no controle das condições ambientais e respostas morfogênicas das plantas, especialmente em sistemas de propagação fotoautotrófica (BATISTA et al., 2018).

## **2.6. Jardim clonal**

O jardim clonal é uma área de grande importância para os viveiros clonais com grande volume de produção de mudas, por terem a finalidade de gerar as brotações para obtenção de estacas para propagação vegetativa pela estaquia. Esta área constitui-se dos clones já selecionados originados da propagação vegetativa, em local específico do viveiro ou em campo, onde as cepas são mantidas sob podas constantes (HIGASHI et al., 2000; XAVIER et al., 2013).

Inicialmente, os jardins clonais eram plantados numa razão de 1:100, ou seja, para se plantar 100 ha de floresta era necessária uma área de 1 ha de jardim clonal (CAMPINHOS; IKEMORI, 1983). Essas áreas de jardins eram implantadas em um local específico próximo ao viveiro, visando reduzir custos com transporte de pessoal e com o material a ser propagado e podendo ser implantado diretamente no campo, com espaçamentos variados conforme a espécie (CAMPINHOS; IKEMORI, 1983; XAVIER et al., 2013). Posteriormente, a implantação de jardim clonal mais adensado foi sendo adotada, assim como o processo de rejuvenescimento proporcionado pela micropropagação foi desenvolvido (HIGASHI et al., 2000; XAVIER et al., 2013; VENTURIN et al., 2014).

No Brasil, o sistema de jardim clonal foi praticamente substituído pelo minijardim clonal, principalmente para o gênero *Eucalyptus*, em razão de suas



vantagens técnicas, econômicas e operacionais (XAVIER et al., 2013). A mudança da denominação foi devida à mudança no sistema de cultivo das cepas, do processo de coleta e produção de mudas e das características dos propágulos produzidos.

Com o advento da miniestaquia e microestaquia, os jardins clonais tem sido implantados em locais protegidos e em condições envasadas, onde o manejo das cepas é constante por meio de podas, adubações, irrigações e controle de doenças, pragas e plantas daninhas (XAVIER et al., 2013). A redução da área do jardim clonal proporcionou maior controle ambiental, fitopatológico e nutricional das miniestacas, resultando em: aumento da produtividade por unidade de área, aumento da taxa de enraizamento; redução do uso de reguladores vegetais e maior uniformidade e revigoramento/rejuvenescimento das miniestacas (HIGASHI et al., 2000).

Contudo, pode-se dizer que a evolução do jardim clonal foi concomitante com a evolução dos processos de estaquia, apenas, sofrendo modificações e adaptações. Atualmente, a produção de mudas de *Eucalyptus* é em sua maioria realizada por enraizamento de miniestacas advindas do minijardim clonal localizado em viveiro, entretanto, inovações são constantemente exigidas buscando contornar desafios encontrados para alguns clones com maior dificuldade de propagação vegetativa, assim como minimização dos efeitos ambientais em regiões do país com variações drásticas de temperatura.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZAL, A.; MUNIR, A.; GHAFOR, A.; ALVARADO, J. L. Development of hybrid solar distillation system for essential oil extraction. **Renewable Energy**, v. 113, p. 22-29, 2017

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

AMRI, E.; LYARUU, H. V. M.; NYOMORA, A. S.; KANYEKA, Z. L. Vegetative propagation of African Blackwood (*Dalbergia melanoxylon* Guill. & Perr.): effects of age of donor plant, IBA treatment and cutting position on rooting ability of stem cuttings. **New Forests**, v. 39, n. 2, p. 183–194, 2010

ARENCIBIA, A. D.; GÓMEZ, A.; POBLETE, M.; VERGARA, C. Highperformance micropropagation of dendroenergetic poplar hybrids in photomixotrophic temporary immersion bioreactors (TIBs). **Industrial crops and products**, v. 96, p. 102–109, 2017

ARENCEBIA, A. D.; VERGARA, C.; QUIROZ, K.; CARRASCO, B.; GARCÍA-GONZALES, R. Establishment of photomixotrophic cultures for raspberry micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). **Scientia Horticulturae**, v. 160, p. 49-53, 2013

ASSIS, E. S.; RUBIO NETO, A.; DE LIMA, L. R.; SILVA, F. G.; ROSA, M.; VASCONCELOS FILHO, S. C.; LEITE, M. S. *In vitro* culture of *Mouriri elliptica* (Mart.) under conditions that stimulate photoautotrophic behavior. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, n. 2, p. 229-236, 2016

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

ASSIS, T. F.; FETT-NETO, A. G.; ALFENAS, A. C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: WALTER, C.; CARSON, M. **Plantation forest biotechnology for the 21st century**. Research Signpost, Trivandrum, 2004, p. 303-333

ASSIS, T. F. Hybrids and mini-cutting: a powerful combination that has revolutionized the *Eucalyptus* clonal forestry. **BMC Proceedings**, v. 5 (Suppl 7), I18, 2011

ATANGANA, A. R.; TCHOUNDJEU, Z.; ASAAH, E. K.; SIMONS, A. J.; KHASA, D. P. Domestication of *Allanblackia floribunda*: amenability to vegetative propagation. **Forest Ecology and Management**, v. 237, n. 1-3, p. 246-251, 2006

BACCARIN, F. J. B.; BRONDANI, G. E.; DE ALMEIDA, L. V.; VIEIRA, I. G.; DE OLIVEIRA, L. S.; DE ALMEIDA, M. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, v. 46, n. 4, p. 465-483, 2015

BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, n. 1, p. 13-24, 2011

BARRALES-LÓPEZ, A.; ROBLEDO-PAZ, A.; TREJO, C.; ESPITIA-RANGEL, E.; RODRÍGUEZ-DE LA, O. J. L. Improved *in vitro* rooting and acclimatization of *Capsicum chinense* Jacq. plantlets. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 3, p. 274-283, 2015

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P., FLORES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006

BATISTA, D. S.; FELIPE, S. H. S.; SILVA, T. D.; DE CASTRO, K. M.; MAMEDES-RODRIGUES, T. C.; MIRANDA, N. A.; RÍOS-RÍOS, A. M.; FARIA, D. V.; FORTINI, E. A.; CHAGAS, K.; TORRES-SILVA, G.; XAVIER, A.; ARENCIBIA, A. D.; OTONI, W. C. Light quality in plant tissue culture: does it matter? **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, n. 3, p. 195-215, 2018

- BATISTA, A. F.; SANTOS, G. A.; SILVA, L. D.; QUEVEDO, F. F.; ASSIS, T. F. The use of mini-tunnels and the effects of seasonality in the clonal propagation of *Eucalyptus* in a subtropical environment. **Australian Forestry**, v. 78, n. 2, p. 65-72, 2015
- BISHT, P.; SHARMA, V. K.; JOSHI, I.; KAPOOR, M. L. Micropropagation of newly produced F1 hybrid of *Eucalyptus* (*E. tereticornis* Sm. x *E. camaldulensis* Dehn. Southern Form). **Silvae Genetica**, v. 48, n. 2, p. 104-108, 1999
- BOLAND, D. J.; BROOKER, M. I. H.; CHIPPENDALE, G. M.; HALL, N. HYLAND, B. P. M.; JOHNSTON, R. D.; KLEINING, D. A.; MCDONALD, M. W.; TURNER, J. D. **Forest trees of Australia**. 5 ed. CSIRO, 2006, 736p.
- BORGES, S. R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S. DE; LOPES, A. P., OTONI, W. C., TAKAHASHI, E. K., MELO, L. A. DE. Estabelecimento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 3, p. 605-616, 2012
- BRONDANI, G. E.; DE WIT ONDAS, H. W.; BACCARIN, F. J. B.; GONÇALVES, A. N.; DE ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 48, n. 5, p. 478-487, 2012
- BRONDANI, G. E.; OLIVEIRA, L. S.; KONZEN, E. R.; SILVA, A. L. D.; COSTA, J. L. Mini-incubators improve the adventitious rooting performance of *Corymbia* and *Eucalyptus* microcuttings according to the environment in which they are conditioned. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, p. 1-16, 2017
- BUSINGE, E.; TRIFONOVA, A.; SCHNEIDER, C.; RÖDEL, P.; EGERTSDOTTER, U. Evaluation of a New Temporary Immersion Bioreactor System for Micropropagation of Cultivars of *Eucalyptus*, Birch and Fir. **Forests**, v. 8, n. 6, p. 196, 2017
- CAMPINHOS, E. J.; IKEMORI, Y. K. Nova técnica para produção de mudas de essências florestais. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF**, v. 23, p. 47-52, 1983
- CASTRO, C. A. D. O.; RESENDE, R. T.; BHERING, L. L.; CRUZ, C. D. Brief history of *Eucalyptus* breeding in Brazil under perspective of biometric advances. **Ciência Rural**, v. 46, n. 9, p. 1585-1593, 2016
- CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, 2010
- COUCEIRO, M. A.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A.; KOZAI, T. Enhanced growth and quality of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) under photoautotrophic *in vitro* conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 42, n. 3, p. 278-282, 2006
- CUNHA, A. C. M. C. M.; DE PAIVA H. N.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Papel da nutrição mineral na formação de raízes adventícias em plantas lenhosas. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 58, p. 35-47, 2009a

CUNHA, A. C. M. C. M.; PAIVA, H. N. de; BARROS, N. F. de; LEITE, H. G.; LEITE, F. P. Influência do estado nutricional de minicepas no enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 33, p. 607–615, 2009b

DEB, C. R.; PONGENER, A. A study on the use of low cost substrata against agar for non-symbiotic seed culture of *Cymbidium iridioides*. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 5, p. 642-649, 2013

DESJARDINS, Y.; DUBUC, J.; BADR, A. *In vitro* culture of plants: a stressful activity! **Acta Horticulturae**, v. 812, p. 29-50, 2007

DI CAPRIO, F.; ALTIMARI, P.; PAGNANELLI, F. Effect of Ca<sup>2+</sup> concentration on *Scenedesmus* sp. growth in heterotrophic and photoautotrophic cultivation. **New biotechnology**, v. 40, p. 228-235, 2018

DIAS, M. C.; CORREIA, C.; MOUTINHO-PEREIRA, J.; OLIVEIRA, H.; SANTOS, C. Study of the effects of foliar application of ABA during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 2, p. 213-224, 2014

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A Micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 58, p. 49-59, 2009

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

FERREIRA, G. W.; GONZAGA, J. V.; FOELKEL, C. E. B.; ASSIS, T. F.; RATNIEKS, E.; SILVA, M. C. M. Qualidade da celulose kraft-antraquinona de *Eucalyptus dunnii* plantado em cinco espaçamentos em relação ao *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*. **Ciência Florestal**, v. 7, n. 1, p. 41-63, 1997

GAGO, J.; MARTÍNEZ-NÚÑEZ, L.; LANDÍN, M.; FLEXAS, J.; GALLEGO, P. P. Modeling the effects of light and sucrose on *in vitro* propagated plants: a multiscale system analysis using artificial intelligence technology. **PLoS One**, v. 9, e85989, 2014

GALLO, R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, B. A.; MOURA, L. C. DE, MIRANDA, N. A.; GATTI, K. C.; OTONI, W. C. Micro-cutting propagation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* through clumps of axillary buds using different containers and substrates. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 10, p. 1327-1333, 2017

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J. F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regul**, v. 37, n. 3, p. 263-285, 2002

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LEÓN, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012

HAFSA, J.; ALI SMACH, M.; KHEDHER, M. R. B.; CHARFEDDINE, B.; LIMEM, K.; MAJDOUB, H.; ROUATBI, S. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. **LWT-Food Science and Technology**, v. 68, p. 356-364, 2016

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; JUNIOR DAVIES, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8.ed. New Jersey: Englewood Clippis, 2011, 900p.

HAYASHI, T. K.; MOREIRA, A.; AMARAL, A.; MELO, M. Tratamento de matrizes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L., Caryophyllaceae) com nitrogênio e calogênese in vitro. **Scientia Agrícola**, v. 59, n. 1, p. 47-52, 2002

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006

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

HUSEN, A.; GONDAR, E. Changes of soluble sugars and enzymatic activities during adventitious rooting in cuttings of *Grewia optiva* as affected by age of donor plants and auxin treatments. **American Journal of Plant Physiology**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2012

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES – IBÁ. **Relatório anual 2017**. Disponível em: <[iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2017.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf)>. Acesso em: 15 maio 2018

JARDIM, L. S.; SAMPAIO, P. DE T. B.; COSTA, S. DE S.; GONÇALVES, C. DE Q. B.; BRANDÃO, H. L. M. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 40, n. 2, p. 275-280, 2010

JEONG, B. R.; SIVANESAN, I. Impact of light quality and sucrose on adventitious shoot regeneration and bioactive compound accumulation in *Ajuga multiflora* Bunge. **Scientia Horticulturae**, v. 236, p. 222-228, 2018

JIMÉNEZ, M. P.; PÉREZ, A. J. L.; ÁLCON, G. O.; NICOLÁS, D. M.; PIÑERO, M. C.; AMOR, F. M. DEL. A regime of high CO<sub>2</sub> concentration improves the acclimatization process and increases plant quality and survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, n. 3, p. 547-557, 2015

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

KAUR, A.; SANDHU, J. S. High throughput *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from spindle leaf roll segments: cost analysis for agri-business industry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 1, p. 339-350, 2015

KIRDMANEE, C.; MOSALEEYANON, K. Environmental engineering for transplant production. In: KUBOTA, C.; CHUN, C. (eds) **Transplant production in the 21st century**. Springer, Dordrecht, 2000, p. 78–82

KITAYA, Y.; FUKUDA, O.; KOZAI, T.; KIRDMANEE, C. Effects of light intensity and lighting direction on the photoautotrophic growth and morphology of potato plantlets *in vitro*. **Scientia horticultrae**, v. 62, n. 1, p. 15-24, 1995

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. **Prop Ornam Plants**, v. 10, p. 188-204, 2010

KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Springer (eds), 2005, 307p.

LEAKEY, R. R. B. Physiology of vegetative reproduction. In: BURLEY, J.; EVANS, J.; YOUNGQUIST, J. A. (eds). **Encyclopaedia of forest sciences**. Academic Press, London, 2004, p 1655–1668

LIMA, C.K.P.; MORI, F.A., MENDES, L.M., CARNEIRO, A.C.O. Características anatômicas e química da madeira de clones de *Eucalyptus* e sua influência na clonagem. **Cerne**, v. 13, n. 2, p. 123-129, 2007

MADHIBHA, T.; MUREPA, R.; MUSOKONYI, C.; GAPARE, W. Genetic parameter estimates for interspecific *Eucalyptus* hybrids and implications for hybrid breeding strategy. **New Forests**, v. 44, n. 1, p. 63-84, 2013

MAJADA, J.; MARTÍNEZ-ALONSO, C.; FEITO, I.; KIDELMAN, A.; ARANDA, I.; ALÍA, R. Mini-cuttings: an effective technique for the propagation of *Pinus pinaster*. **New Forests**, v. 41, p. 399–412, 2011

MARTINS, J. P. R.; PASQUAL, M.; MARTINS, A. D.; RIBEIRA, S. F. Effects of salts and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 1, p. 85-91, 2015

MARTINS, S. V. A contribuição do eucalipto para a restauração e a conservação de florestas nativas. In: MACHADO, C.; PIRES, J.; VILAR, M.; COSTA, C.; NACIF, A. **Eucaliptocultura no Brasil, silvicultura, manejo e ambiência**. Viçosa: SIF, 2014, p. 517-525

MCNABB, K.; GONÇALVES, N.; GONÇALVES, J. Clonal propagation of *Eucalyptus* in Brazilian nurseries. In: DUMROESE, R. K.; RILEY, L. E.; LANDIS, T. D. (eds) **National proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations - 1999, 2000 and 2001**. Proceedings RMRS-P-24. USDA Forest Service, Ogden, UT, 2002, p. 165–168

MERCHANT, A.; RICHTER, A.; POP, M.; ADAMS, M. Targeted metabolite profiling provides a functional link among eucalypt taxonomy, physiology and evolution. **Phytochemistry**, v. 67, n. 4, p. 402-408, 2006

MIRANDA, I.; LIMA, L.; QUILHÓ, T.; KNAPIC, S.; PEREIRA, H. The bark of *Eucalyptus sideroxylon* as a source of phenolic extracts with anti-oxidant properties. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 81-87, 2016

MOSALEEYANON, K.; CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO<sub>2</sub>-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, v. 103, n. 1, p. 51-63, 2004

MOURA, V. P. G. **O Germoplasma de *Eucalyptus urophylla* ST Blake no Brasil**. EMBRAPA, Boletim Técnico, n. 111, 2004, 12p.

MOURA, V. P. G.; GUIMARÃES, D. P. **Produção de mudas de *Eucalyptus* para o estabelecimento de plantios florestais**. Brasília: Embrapa, Boletim Técnico, n. 85, 2003, 9p.

MÜLLER, B. S.; NEVES, L. G.; DE ALMEIDA FILHO, J. E.; RESENDE JÚNIOR, M. F.; MUÑOZ, P. R.; DOS SANTOS, P. E.; PALUDZYSZYN FILHO, E.; KIRST, M.; GRATTAPAGLIA, D. Genomic prediction in contrast to a genome-wide association study in explaining heritable variation of complex growth traits in breeding populations of *Eucalyptus*. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 524-540, 2017

MURASHIGE, T.; SKOOG, M. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962

MYERSCOUGH, P. J. Ecology of Myrtaceae with special reference to the Sydney region. **Cunninghamia**, v. 5, n. 4, p. 787-807, 1998

NAVARRETE-CAMPOS, D.; BRAVO, L. A.; RUBILAR, R. A.; EMHART, V.; SANHUEZA, R. Drought effects on water use efficiency, freezing tolerance and survival of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus globulus* x *nitens* cuttings. **New Forests**, v. 44, n. 1, p. 119-134, 2013

NGUYEN, Q. T.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Springer Netherlands, Dordrecht, 2005, p. 123-146

NUNES, S.; SOUSA, D.; PEREIRA, V. T.; CORREIA, S.; MARUM, L.; SANTOS, C.; DIAS, M. C. Efficient protocol for *in vitro* mass micropropagation of slash pine. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, n. 2, p. 175-183, 2018

OBERSCHELP, G. P. J.; GONÇALVES, A. N.; MENEGHETTI, E. C.; GRANER, É. M.; DE ALMEIDA, M. *Eucalyptus dunnii* Maiden plant regeneration via shoot organogenesis on a new basal medium based on the mineral composition of young stump shoots. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 51, n. 6, p. 626-636, 2015

OLIVEIRA, M. L. D.; XAVIER, A.; SANTOS, A. P. D.; ANDRADE, H. B. Efeito da estaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones híbridos de *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, v. 30, n. 4, p. 503-512, 2006

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2013, 52p.

PIJUT, P. M.; WOWSTE, K. E.; MICHLER, C. H. (2011) Promotion of adventitious root formation of difficult-to-root hardwood tree species. **Horticultural reviews**, v. 38, p. 213–251, 2011

POHIO, K. E.; WALLACE, H. M.; PETERS, R. F.; SMITH, T. E.; TRUEMAN, S. J. Cuttings of Wollemi pine tolerate moderate photoinhibition and remain highly capable of root formation. **Trees**, v. 19, n. 5, p. 587–595, 2005

PRYOR, L. *Biology of Eucalyptus*. London: Edward Arnold, 1976, 82p.

READ, P. E.; PREECE, J. E. Cloning: Plants - Micropropagation/Tissue Culture. In: VAN ALFEN, N. K. **Encyclopedia of agriculture and food systems**. Elsevier, 2014, p. 317-336

RIBEIRO, M. D. D. S. B.; JORGE, L. A. B.; MISCHAN, M. M.; SANTOS, A. L. D.; BALLARIN, A. W. Evaluation of the biomass production of the main stem of a hybrid *Eucalyptus* clone under different spacings. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 1, p. 31-45, 2017

ROCHA, H. S. Biofábricas: estrutura física e organização. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. DA S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 121-152, 2009

ROCHA, M. P. DA; TOMASELLI, I. Efeito do modelo de desdobro na qualidade da madeira serrada de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus dunnii*. **Cerne**, v. 8, n. 2, p. 70-83, 2002

ROCHA, M. P. DA; TRUGILHO, P. F. Qualidade de Madeira serrada de *Eucalyptus dunnii* em função do método de desdobro e condição de umidade. **Cerne**, v. 12, n. 4, p. 314-321, 2006

RODRIGUEZ, R.; ARAGON, C. E.; ESCALONA, M.; GONZALEZ-OLMEDO, J. L.; DESJARDINS, Y. Carbon metabolism in leaves of micropropagated sugarcane during acclimatization phase. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 44, p. 533–539, 2008

ROJO, E.; ALONSO, M.; SAZ-OROZCO, D.; OLIET, M.; RODRIGUEZ, F. Optimization of the silane treatment of cellulosic fibers from *Eucalyptus* wood using response surface methodology. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 26, 2015

SÁEZ, P. L.; BRAVO, L. A.; LATSAGUE, M. I.; TONEATTI, M. J.; COOPMAN, R. E.; ÁLVAREZ, C. E. A.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. G. Influence of *in vitro* growth conditions on the photosynthesis and survival of *Castanea sativa* plantlets during *ex vitro* transfer. **Plant Growth Regulation**, v. 75, n. 3, p. 625–639, 2015

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L. F. DE; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M. DO; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012



SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; ROCHA, D. I.; CAVATTE, P. C.; DETMANN, K. S. C.; TANAKA, F. A. O.; DIAS, L. L. C.; DAMATTA, F. M.; OTONI, W. C. CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (spreng.) pedersen] plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 87-99, 2014

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

SANTOS, G. A.; RESENDE, M. D. V.; SILVA, L. D.; HIGA, A.; ASSIS, T. F. Genotypes x environments interaction for productivity of *Eucalyptus* l'hér. clones in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, p. 81-91, 2015

SARTORI, C. J.; MOTA, G. S.; MIRANDA, I.; MORI, F. A.; PEREIRA, H. Tannin Extraction and Characterization of Polar Extracts from the Barks of Two *Eucalyptus urophylla* Hybrids. **BioResources**, v. 13, n. 3, p. 4820-4831, 2018

SAYA, R. A.; MANKESSI, F.; TOTO, M.; MARIEN, J. N.; MONTEUUIS, O. Advances in mass clonal propagation of *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* in Congo. **Bois et Forêts des Tropiques**, v. 297, n. 3, p. 15-26, 2008

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

SHANTHI, K.; BACHPAI, V. K. W.; ANISHA, S.; GANESAN, M.; ANITHAA, R. G.; SUBASHINI, V.; CHAKRAVARTHI, M.; SIVAKUMAR, V.; YASODHA, R. Micropropagation of *Eucalyptus camaldulensis* for the production of rejuvenated stock plants for microcuttings propagation and genetic fidelity assessment. **New Forests**, v. 46, n. 3, p. 357-371, 2015

SHIN, K. S.; PARK, S. Y.; PAEK, K. Y. Physiological and biochemical changes during acclimatization in a *Doritaenopsis* hybrid cultivated in different microenvironments *in vitro*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 26-33, 2014

SHUKLA, M. R.; SINGH, A. S.; PIUNNO, K.; SAXENA, P. K.; JONES, A. M. P. Application of 3D printing to prototype and develop novel plant tissue culture systems. **Plant Methods**, v. 13, p. 6-15, 2017

SILVA, R. L. DA; XAVIER, A.; GARCIA, H.L.; PIRES, I. E. Determinação do tamanho ótimo da parcela experimental pelos métodos de máxima curvatura modificado, do coeficiente de correlação intraclasse e da análise visual em testes clonais de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 27, n. 5, p. 669-676, 2003

SNEDDEN, J.; LANDHÄUSSER, S. M.; LIEFFERS, V. J.; CHARLESON, L. R. Propagating trembling aspen from rootcuttings: impact of storage length and phenological period of root donor plants. **New Forests**, v. 39, n. 2, p. 169-182, 2010

STEANE, D. A.; NICOLLE, D.; SANSALONID, C. P.; PETROLID, C. D.; CARLINF, J.; KILIANF, A.; MYBURGG, A. A.; GRATTAPAGLIAD, D.; VAILLANCOURTA, R. E. Population genetic analysis and phylogeny reconstruction in *Eucalyptus* (Myrtaceae) using high-throughput, genome-wide genotyping. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 59, p. 206-224, 2011

TISARUM, R.; SAMPHUMPHUNG, T.; THEERAWITAYA, C.; PROMMEE, W.; CHA-UM, S. *In vitro* photoautotrophic acclimatization, direct transplantation and *ex vitro* adaptation of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 133, n. 2, p. 215-223, 2018

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

TRUEMAN, S. J.; RICHARDSON, D. M. *In vitro* propagation of *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (Myrtaceae) via cytokinin-free node culture. **Australian Journal of Botany**, v. 55, n. 4, p. 471-481, 2007

TRUEMAN, S. J.; RICHARDSON, D. M. Relationships between indole-3-butyric acid, photoinhibition and adventitious rooting of *Corymbia torelliana*, *C. citriodora* and F1 hybrid cuttings. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 26-33, 2008

TRUEMAN, S. J. Cytokinin and auxin effects on survival and rooting of *Eucalyptus pellita* and *E. grandis* x *E. pellita* cuttings. **Rhizosphere**, v. 6, p. 74-76, 2018

VALERO-ARACAMA, C.; WILSON, S. B.; KANE, M. E.; PHILMAN, N. L. Influence of *in vitro* growth conditions on *in vitro* and *ex vitro* photosynthetic rates of easy- and difficult-to-acclimatize sea oats (*Uniola paniculata* L.) genotypes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 43, n. 3, p. 237-246, 2007

VENTURIN, N.; CAMPINHOS JUNIOR, E.; MACEDO, R. L. G.; VENTURIN, R. P. Histórico. In: MACHADO, C.; PIRES, J.; VILAR, M.; COSTA, C.; NACIF, A. **Eucaliptocultura no Brasil, silvicultura, manejo e ambiência**. Viçosa: SIF, 2014, p. 17-36

VU, J. C. V.; ALLEN JUNIOR, L. H. Growth at elevated CO<sub>2</sub> delays the adverse effects of drought stress on leaf photosynthesis of the C<sub>4</sub> sugarcane. **Journal of plant physiology**, v. 166, n. 2, p. 107-116, 2009

WALL, G. W.; GARCIA, R. L.; KIMBALL, B. A.; HUNSAKER, D. J.; PINTER, P. J.; LONG, S. P.; OSBORNE, C. P.; HENDRIX, D. L.; WECHSUNG, F.; WECHSUNG, G.; LEAVITT, S. W.; LAMORTE, R. L.; IDSO, S. B. Interactive effects of elevated carbon dioxide and drought on wheat. **Agronomy Journal**, v. 98, n. 2, p. 354-381, 2006

WASSNER, D.; RAVETTA, D. Vegetative propagation of *Grindelia chiloensis* (Asteraceae). **Industrial Crops and Products**, v. 11, n. 1, p. 7-10, 2000

- WATT, M.P.; BERJAK, P.; MAKHATHINI, A.; BLAKEWAY, F. In vitro field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, n. 3, p. 233-240, 2003
- WENDLING, I.; BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A. Mini-cuttings technique: a new *ex vitro* method for clonal propagation of sweetgum. **New Forests**, v. 39, n. 3, p. 343–353, 2010
- WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Colombo: Embrapa Florestas, Documentos, n. 130, 2006, 55p.
- WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência do ácido indolbutírico e da miniestaquia seriada no vigor radicular de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 681–689, 2005
- WU, S.; XU, J.; LI, G.; RISTO, V.; DU, Z.; LU, Z.; LI, B.; WANG, W. Genotypic variation in wood properties and growth traits of *Eucalyptus* hybrid clones in southern China. **New Forests**, v. 42, n. 1, p. 35–50, 2011
- XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2.ed. Viçosa: Ed UFV, 2013, 279p.
- XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia Florestal**. Suprema Gráfica e Editora: Viçosa, 2007, p. 53-74
- XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 2, p. 149-158, 2011
- XIAO, Y.; ZHANG, Y.; DANG, K.; WANG, D. Growth and photosynthesis of *Dendrobium candidum* Wall. Ex Lindl. plantlets cultured photoautotrophically. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 7, n. 2, p. 89-96, 2007
- ZANUNCIO, A. J. V.; CARVALHO, A. G.; TRUGILHO, P. F.; MONTEIRO, T. C. Extractives and energetic properties of wood and charcoal. **Revista Árvore**, v. 38, n. 2, p. 369-374, 2014
- ZHANG, M.; ZHAO, D.; MA, Z.; LI, X.; XIAO, Y. Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. **HortScience**, v. 44, n. 3, p. 757–763, 2009
- ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 37, n. 6, p. 807-813, 2001

## PARÂMETROS GENÉTICOS, RECIPIENTES E SUBSTRATOS NA PROPAGAÇÃO *in vitro* DE CLONES DE *Eucalyptus*

**Resumo** - Para viabilizar a propagação *in vitro* de clones de *Eucalyptus* em larga escala, é preciso tornar a técnica produtiva e vantajosa quando comparada ao sistema atual de produção por miniestquia. Entre os fatores importantes, deve-se considerar a seleção de clones com alta capacidade de produção de microestacas e boa propagação *in vitro*, além de determinar os melhores ambientes para condução desses genótipos selecionados. Neste trabalho, objetivou-se estimar parâmetros genéticos no crescimento das plantas *in vitro* e avaliar diferentes recipientes e substratos para formação de jardim clonal *in vitro* de clones de *Eucalyptus*. Explantes de dez clones de *Eucalyptus* foram cultivados em quatro recipientes (potes, frascos, Agripot e tubo de ensaio) em meio semissólido JADS. Foram avaliados o número de brotações maiores que 0,5 cm, o número de microestacas maiores que 2 cm, o comprimento da maior microestaca, enraizamento e vigor das brotações. Também se testou o desempenho destes dez clones cultivados em cinco substratos (ágar, areia, fibra de celulose, substrato comercial e vermiculita) com adição de meio líquido JADS. Foram avaliados o número de brotações maiores que 0,5 cm, número de microestacas maiores que 2 cm, comprimento da maior microestaca, enraizamento, vigor das brotações, massa fresca da parte aérea e área foliar. Para estimativas de componentes de variância e parâmetros genéticos, empregou-se a metodologia de modelos mistos, procedimento REML/BLUP. Há efeito dos genótipos no crescimento das plantas, permitindo a seleção de clones mais responsivos à propagação *in vitro*. Os ambientes mais favoráveis para o crescimento dos genótipos foram em frascos de vidro de 250 mL, potes de polipropileno de 500 mL e a utilização dos substratos ágar e vermiculita.

**Palavras-chave:** Propagação vegetativa, silvicultura clonal, jardim clonal *in vitro*.

### 1. Introdução

O setor florestal brasileiro conta com uma área de 7,8 milhões de hectares plantados com árvores, dos quais 5,7 milhões de hectares são ocupados por plantios de *Eucalyptus*. Este setor representa um importante segmento na geração de renda e no desenvolvimento nacional (IBÁ, 2017).

A crescente demanda por produtos e subprodutos florestais estimula o aumento dos plantios de *Eucalyptus*, bem como a busca pelo aumento da produtividade por meio da combinação de diversos fatores. Ressalta-se a implantação de programas de melhoramento genético, produção de híbridos e clones elites, assim como os avanços do conhecimento de tecnologias da propagação vegetativa na produção de mudas clonais para atendimento aos programas de plantios florestais (FERRARI et al., 2004; XAVIER et al., 2013; PARK et al. 2016).

Entre as técnicas de propagação clonal, a micropropagação é uma alternativa para produção de mudas de *Eucalyptus*, que permite a propagação massal de clones em tempo e espaço físico reduzidos, maior controle nutricional, ambiental e fitossanitário, rejuvenescimento/revigoramento clonal, armazenamento por longos períodos e retenção do vigor híbrido (XAVIER et al., 2013; WATT, 2014).

A micropropagação de *Eucalyptus* tem recebido considerável atenção nas últimas décadas e estudos de novas técnicas e procedimentos têm sido realizados para produzir plantas clonais em escala. Propostas de manipulação da atmosfera e/ou do ambiente *in vitro* como a propagação fotoautotrófica (KOZAI, 2010; ASSIS et al. 2016; HOANG et al., 2017), o uso de biorreatores de imersão temporária (OLIVEIRA et al., 2011; MENDONÇA et al., 2016), automatização e mecanização das operações dos sistemas (PENCHEL et al., 2007) são alguns exemplos.

Apesar das vantagens potenciais da micropropagação, a propagação de clones comercialmente importantes ainda é principalmente realizada pela miniestaquia. Alguns fatores podem ser citados como desafios para uso da micropropagação, como o alto investimento (CHEN, 2016), contaminação por microrganismos e desenvolvimento de protocolos diferenciados para espécies ou grupos de clones (XAVIER et al., 2013).

Atualmente, existem protocolos de propagação *in vitro* bem estabelecidos para alguns genótipos, englobando poucas espécies de *Eucalyptus* e seus híbridos. Porém a variação genotípica entre os clones de cada híbrido exige, muitas vezes, a otimização e implementação de protocolos específicos (WATT, 2014).

Para viabilizar a técnica de micropropagação em larga escala, é preciso torná-la produtiva e vantajosa quando comparada ao sistema atual de produção de miniestacas em minijardins clonais. O desenvolvimento de jardim clonal *in vitro* para produção de microestacas surge como alternativa a ser testada a fim de unir as vantagens da propagação *in vitro* com a funcionalidade do jardim clonal.

Estudos básicos para a maximização da produção de microestacas são necessários, como por exemplo, o tamanho e tipo de frascos para desenvolvimento das culturas, visto que o espaço de cultivo influencia na composição da fase gasosa do frasco, e, conseqüentemente, o crescimento e o desenvolvimento das culturas (XIAO et al., 2011). O uso de substratos alternativos em substituição ao ágar, pode reduzir o custo de produção, havendo a possibilidade de melhores resultados quanto ao desenvolvimento das plantas (OLIVEIRA et al., 2014; CURTI, REINIGER, 2014).

Assim, este trabalho teve como objetivo estimar parâmetros genéticos das características de crescimento das plantas *in vitro* e avaliar diferentes recipientes e substratos para formação de jardim clonal *in vitro* de *Eucalyptus*.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Material vegetal e condições de cultivo**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa.

Utilizou-se como explantes segmentos nodais ou um conjunto de brotações com gemas diferenciadas de dez clones de *Eucalyptus* spp. (Tabela 1). Estes materiais genéticos foram selecionados visando avaliar, quanto a resposta no cultivo *in vitro*, espécies importantes de *Eucalyptus* cultivadas no país, contemplando genótipos que possuem bom desempenho na produção de mudas clonais e aqueles que apresentam desafios principalmente no enraizamento adventício.

As brotações contendo gemas diferenciadas, estabelecidas *in vitro* em tubos de ensaio, foram mantidas em 10 mL meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995), adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6- benzilaminopurina), 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético) e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. Os segmentos nodais, com cerca de 3 cm contendo 2 a 3 pares de folhas, foram obtidas *in vitro* em meio JADS com a adição de 0,25 mg L<sup>-1</sup> de AIB e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,80±0,02 antes da inclusão do ágar ou substratos. Fez-se esterilização por autoclavagem a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 20 minutos. Os cultivos foram mantidos em sala de

crescimento a  $25\pm 2$  °C por um fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil).

**Tabela 1.** Identificação de clones de *Eucalyptus* utilizados nesse trabalho.

Clone	Origem genética
C1	<i>Eucalyptus urophylla</i>
C2	<i>Eucalyptus urophylla</i>
C3	<i>Eucalyptus urophylla</i>
C4	<i>Eucalyptus urophylla</i>
C5	<i>Eucalyptus benthamii</i>
C6	<i>Eucalyptus benthamii</i>
C7	<i>Eucalyptus dunnii</i>
C8	<i>Eucalyptus dunnii</i>
C9	<i>Eucalyptus dunnii</i>
C10	<i>(E. grandis x E. urophylla) x E. viminalis</i>

## 2.2. Recipientes

Brotações contendo de quatro a seis gemas diferenciadas de dez clones de *Eucalyptus* (Tabela 1) obtidos *in vitro* foram transferidas para os recipientes: potes de polipropileno (500 mL de capacidade), frascos de vidro (250 mL de capacidade), Agripot (frasco de acrílico de 250 mL de capacidade com troca gasosa) e tubo de ensaio (55 mL de capacidade) (Figura 1).



**Figura 1.** Recipientes utilizados no cultivo *in vitro* de clones de *Eucalyptus*. Na sequência, Agripot, tubo de ensaio, frasco de vidro e potes de polipropileno. Barra = 2 cm

A quantidade de meio de cultura em cada recipiente foi variável de acordo com o número de explantes, consistindo em 100 mL e 10 explantes para o pote de

polipropileno; 40 mL e 4 explantes para o frasco de vidro; 30 mL e 3 explantes para o Agripot; e 10 mL e 1 explante para o tubo de ensaio.

Utilizou-se meio de cultura JADS, adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,25 mg L<sup>-1</sup> de AIB e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. Adotou-se o delineamento em blocos ao acaso com quatro tratamentos, quatro repetições e uma observação por parcela, obtida pela média dos explantes.

### 2.3. Substratos

Segmentos nodais de dez clones de *Eucalyptus* spp. (Tabela 1) obtidos *in vitro* foram transferidos para frascos de vidro (250 mL de capacidade) contendo 50 cm<sup>3</sup> dos substratos areia, vermiculita, fibra de celulose, substrato comercial (Tropstrato Vida Verde) e meio semissólido com uso de ágar (Merck) (Figura 2). Em cada frasco foi inoculado dois segmentos nodais de *Eucalyptus*. Utilizou-se meio líquido JADS, adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,25 mg L<sup>-1</sup> de AIB e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar apenas para o tratamento contendo o meio semissólido.

Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso com cinco tratamentos, cinco repetições e uma observação por parcela, obtida pela média de dois explantes.



**Figura 2.** Substratos utilizados no cultivo *in vitro* de clones de *Eucalyptus*. Na sequência, ágar, areia, fibra de celulose, substrato comercial e vermiculita. Barra = 2 cm.

### 2.4. Coleta e análise de dados

Após 30 dias de cultivo avaliou-se, para recipientes e substratos, o número de brotações maiores que 0,5 cm (NB), número de microestacas maiores que 2 cm (NM),



comprimento da maior microestaca (CM), enraizamento (R%) e vigor das brotações, avaliado com base em uma escala de notas de 1 a 3, onde 1 (Baixo), 2 (Médio) e 3 (Alto). Para análise dos substratos também foram avaliadas a massa fresca da parte aérea (MFA) e área foliar (AF).

Para estimativas de componentes de variância e parâmetros genéticos utilizou-se a metodologia REML/BLUP, baseada na estimação de componentes de variância via máxima verossimilhança residual (REML) e predição de valores genéticos e a seleção via melhor predição linear não viesada (BLUP). Houve uma medição simultânea de estabilidade, adaptabilidade e produtividade pela média harmônica do desempenho relativo dos valores genotípicos (MHPRVG) (RESENDE, 2007). O modelo utilizado, considerando vários ambientes (recipientes ou substratos) e uma única observação por parcela (média dos explantes) foi:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xr} + \mathbf{Zg} + \mathbf{Wi} + \mathbf{e}$$

Em que  $\mathbf{y}$  é o vetor de dados;  $\mathbf{r}$  é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral;  $\mathbf{g}$  é o vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios);  $\mathbf{i}$  é vetor dos efeitos da interação genótipo x ambiente (aleatórios); e  $\mathbf{e}$  é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios).

Realizou-se análise de deviance (ANADEV) (RESENDE, 2007). As análises foram realizadas mediante software SELEGEN-REML/BLUP (RESENDE, 2016).

### **3. Resultados**

#### **3.1. Recipientes**

O efeito de genótipos e a interação genótipos x recipientes foi significativo para todas as características analisadas, de acordo com a análise de deviance.

Com a estimativa dos parâmetros genéticos obteve-se altos valores de herdabilidade ( $h^2g$ ) para todas as variáveis (Tabela 2). Os valores de acurácia encontrados foram de 0,97, 0,95, 0,93, 0,95 e 0,97 para vigor, NB, NM, CM e R%, respectivamente.

Em relação às médias gerais, o número médio de brotações maiores que 0,5 cm foi de 3,96, enquanto o número de microestacas maiores que 2 cm foi de 1,50. A média de enraizamento nos ambientes para os dez genótipos foi de 11,2%.

**Tabela 2.** Estimativa de parâmetros genéticos para as características vigor das brotações, número de brotações maiores que 0,5 cm (NB), número de microestacas maiores que 2 cm (NM), comprimento da maior microestaca (CM) e enraizamento (R%) avaliadas em 10 genótipos de *Eucalyptus* spp., após 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes recipientes.

Parâmetros	Vigor	NB	NM	CM	R%
<i>Vg</i>	0,08	1,05	0,28	1,80	354,02
<i>Vint</i>	0,01	0,34	0,13	0,64	77,22
<i>Ve</i>	0,03	0,34	0,14	0,35	62,84
<i>Vf</i>	0,12	1,73	0,55	2,79	494,07
<i>h<sup>2</sup>g</i>	0,63±0,18	0,61±0,17	0,51±0,16	0,64±0,18	0,72±0,19
<i>Acgen</i>	0,97	0,95	0,93	0,95	0,97
<i>M</i>	2,67	3,96	1,50	3,67	11,18

*Vg*: variância genotípica; *Vint*: variância da interação genótipos x ambientes; *Ve*: variância residual; *Vf*: variância fenotípica individual; *h<sup>2</sup>g*: herdabilidade individual no sentido amplo (dos efeitos genotípicos totais); *Acgen*: acurácia da seleção de genótipos, assumindo sobrevivência completa; *M*: Média geral do experimento.

Na análise conjunta dos diferentes recipientes utilizados, para a característica NM, o clone C1 (*Eucalyptus urophylla*) apresentou o maior valor genético (Tabela 3), sendo que outros genótipos de *Eucalyptus urophylla* (C2, C3 e C4) apresentaram valores negativos. Os dois clones de *Eucalyptus benthamii* (C5 e C6) utilizados na análise apresentaram o segundo e terceiro maiores valores genéticos na classificação.

**Tabela 3.** Classificação dos valores genotípicos (g), médias genotípicas (u + g), ganhos genéticos preditos e nova média para o caráter número de microestacas maiores que 2 cm (NM) para dez genótipos de *Eucalyptus*, após 30 dias de cultivo *in vitro* considerando diferentes recipientes.

Genótipo	G	u+g	Ganho	Nova média
C1	0,90	2,40	0,90	2,40
C5	0,68	2,18	0,79	2,29
C6	0,23	1,74	0,60	2,11
C9	0,15	1,65	0,49	1,99
C7	0,00	1,50	0,39	1,90
C8	-0,19	1,31	0,30	1,80
C2	-0,33	1,18	0,21	1,71
C10	-0,37	1,13	0,13	1,64
C3	-0,49	1,02	0,06	1,57
C4	-0,58	0,92	0,00	1,50

Os recipientes que representaram ambientes mais favoráveis para produção de microestacas maiores que 2 cm foram os frascos de vidro e potes de polipropileno (Tabela 4), sendo os frascos considerados ambientes superiores para oito dentre os dez clones avaliados.

**Tabela 4.** Recipientes superiores para cada genótipo de *Eucalyptus* considerando valores genotípicos e valores preditos para a variável número de microestacas maiores que 2 cm (NM), após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Genótipo	Recipiente	Ganho	Nova média
C1	Pote	1,73	3,42
C2	Frasco	0,32	2,14
C3	Pote	0,23	1,93
C4	Frasco	0,00	1,82
C5	Frasco	0,98	2,80
C6	Frasco	0,89	2,71
C7	Frasco	0,60	2,42
C8	Frasco	0,45	2,27
C9	Frasco	0,76	2,57
C10	Frasco	0,19	2,01

Segundo os critérios PRVG, MHVG e MHPRVG, os quatro melhores clones são C1 (*E. urophylla*), C6 (*E. benthamii*) C5 (*E. benthamii*) e C9 (*E. dunnii*) (Tabela 5). Estes clones, pelo critério MHPRVG, apresentaram superioridade média de 61% (C1), 49% (C5), 11% (C6) e 10% (C9) sobre a média geral dos quatro recipientes. Com a seleção desses quatro melhores clones para a variável NM há um ganho de 32,7% sobre a média geral dos ambientes, considerando simultaneamente a produtividade, estabilidade e adaptabilidade nos locais.

**Tabela 5.** Classificação da estabilidade de valores genotípicos (MHVG), adaptabilidade de valores genotípicos (PRVG e PRVG\*MG), estabilidade e adaptabilidade de valores genotípicos (MHPRVG e MHPRVG\*MG) para número de microestacas maiores que 2 cm (NM) dos dez genótipos de *Eucalyptus* cultivados em diferentes recipientes.

Genótipo	MHVG	PRVG	PRVG*MG	Genótipo	MHPRVG	MHPRVG*MG
C1	2,33	1,66	2,49	C1	1,61	2,42
C5	2,21	1,53	2,30	C5	1,49	2,24
C6	1,64	1,18	1,78	C6	1,11	1,66
C9	1,60	1,11	1,67	C9	1,10	1,66
C7	1,44	0,99	1,50	C7	0,99	1,49
C8	1,25	0,86	1,29	C8	0,86	1,29
C10	1,08	0,75	1,12	C2	0,72	1,09
C2	1,03	0,75	1,12	C10	0,72	1,08
C4	0,80	0,62	0,94	C3	0,57	0,85
C3	0,80	0,56	0,84	C4	0,55	0,83

### 3.2.Substratos

De acordo com a análise de deviance, as diferenças observadas entre os substratos são devido ao efeito dos genótipos, havendo interação significativa entre genótipos e ambientes (substratos) apenas para as características NB, MFA e R%. A herdabilidade ( $h^2g$ ) foi baixa ou moderada para todas as variáveis (Tabela 6).

Os maiores valores de acurácia foram encontrados para as variáveis NB, MFA e R%. Em relação às médias gerais, o número médio de brotações maiores que 0.5 cm foi de 2,48, o número de microestacas maiores que 2 cm foi de 0,85 e com enraizamento de 18,78%.

**Tabela 6.** Estimativa de parâmetros genéticos (Par) para as características vigor da brotações, número de brotações maiores que 0,5 cm (NB), número de microestacas maiores que 2 cm (NM), comprimento da maior microestaca (CM), massa fresca da parte aérea (MFA), enraizamento (R%) e área foliar (AF) avaliadas em dez genótipos de *Eucalyptus* depois de 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes substratos.

Par	Vigor	NB	NM	CM	MFA	R%	AF
<i>Vg</i>	0,02	0,29	0,07	0,02	0,03	520,61	11,06
<i>Vint</i>	0,19	0,47	0,32	0,58	0,02	278,87	33,88
<i>Ve</i>	0,15	0,69	0,57	0,44	0,02	350,02	48,05
<i>Vf</i>	0,36	1,46	0,97	1,04	0,07	1149,49	92,99
$H^2g$	0,05±0,04	0,21±0,09	0,08±0,06	0,02±0,02	0,38±0,12	0,45±0,13	0,12±0,07
<i>Acgen</i>	0,52	0,84	0,67	0,32	0,91	0,94	0,74
<i>M</i>	2,28	2,48	0,85	1,95	0,31	18,78	13,60

*Vg*: variância genotípica; *Vint*: variância da interação genótipos x ambientes; *Ve*: variância residual; *Vf*: variância fenotípica individual;  $h^2g$ : herdabilidade individual no sentido amplo (dos efeitos genotípicos totais); *Acgen*: acurácia da seleção de genótipos, assumindo sobrevivência completa; *M*: Média geral do experimento.

Na classificação dos valores genotípicos para NM, os quatro genótipos de *Eucalyptus urophylla* (C2, C3, C1 e C4) ficaram entre os cinco clones com maior ganho na análise conjunta envolvendo substratos (Tabela 7). Os dois clones que apresentaram menor ganho foram o C10 e C9.

Médias gerais das variáveis vigor, NM, CM e AF para os dez genótipos de *Eucalyptus* nos diferentes substratos foram semelhantes com o uso de ágar ou vermiculita. O vigor médio dos dez genótipos em ágar foi de 2,57 e em vermiculita de 2,61. Os valores médios de NM foram de 1,75 para ágar e 1,13 para vermiculita. Os

demais substratos apresentaram médias gerais inferiores quando comparados ao uso de ágar ou vermiculita.

**Tabela 7.** Valores genotípicos (g), médias genotípicas (u + g), ganhos genéticos preditos e nova média para o caráter número de microestacas maiores que 2 cm (NM) para dez genótipos de *Eucalyptus*, após 30 dias de cultivo *in vitro* considerando diferentes substratos.

Ordem	Genótipo	g	u+g	Ganho	Nova média
1	C2	0,33	1,18	0,33	1,18
2	C3	0,24	1,09	0,28	1,13
3	C8	0,10	0,95	0,22	1,07
4	C1	0,06	0,91	0,18	1,03
5	C4	-0,01	0,84	0,14	0,99
6	C7	-0,06	0,79	0,11	0,96
7	C5	-0,10	0,75	0,08	0,93
8	C6	-0,10	0,75	0,06	0,90
9	C10	-0,22	0,62	0,03	0,87
10	C9	-0,24	0,61	0,00	0,85

Na análise do enraizamento, maiores valores genotípicos foram obtidos no substrato vermiculita para todos os dez genótipos de *Eucalyptus*. Para a variável NB houve maior ganho com uso de ágar, em todos os dez genótipos avaliados.

O substrato vermiculita foi superior para os genótipos C1, C2, C3, C6 e C10 na produção de massa fresca de parte aérea. Com o uso de ágar, maiores valores para esta variável são observados nos clones C4, C5, C7, C8 e C9 (Tabela 8).

**Tabela 8.** Substratos superiores para cada genótipo de *Eucalyptus* considerando valores genotípicos e valores preditos para a variável massa fresca da parte aérea (MFA), após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Genótipo	Substrato	Ganho	Nova média
C1	Vermiculita	0,21	0,69
C2	Vermiculita	0,63	1,11
C3	Vermiculita	0,57	1,05
C4	Ágar	0,13	0,65
C5	Ágar	0,04	0,57
C6	Vermiculita	0,10	0,58
C7	Ágar	0,39	0,91
C8	Ágar	0,28	0,80
C9	Ágar	0,18	0,69
C10	Vermiculita	0,29	0,77

#### 4. Discussão

As diferenças observadas no desenvolvimento do material vegetal podem ser atribuídas à interação genótipo x ambiente. No presente estudo, os ambientes considerados representam os substratos e recipientes utilizados. Estudos sobre a interação genótipo x ambiente são importantes e têm sido realizados principalmente visando otimizar recomendações de materiais melhorados (BRAWNER et al., 2013, OGUT et al., 2014; GEZAN et al., 2017).

A seleção dos genótipos com desempenho superior pode ser realizada considerando todos os recipientes ou pode-se selecionar genótipos considerando um recipiente específico. Dos recipientes testados, o frasco de vidro proporcionou melhores condições de desenvolvimento para grande parte dos clones, seguido dos potes de polipropileno. A seleção dos melhores genótipos em frascos de vidro pode melhorar a produtividade e qualidade de microestacas de *Eucalyptus*.

Em estudo semelhante realizado por Gallo et al. (2017), o melhor recipiente para produzir microestacas foi o pote de polipropileno, porém o frasco de vidro de 250 mL de capacidade foi considerado o mais vantajoso por proporcionar maior produção de microestacas por metro quadrado, devido ao adensamento proporcionado pela melhor acomodação em prateleiras de salas de crescimento. Cada recipiente utilizado proporciona uma condição de cultivo diferente para as plantas, que podem estar relacionadas com as concentrações de dióxido de carbono, concentrações de etileno, irradiação de luz, temperatura do ar e umidade relativa (MCCLELLAND, SMITH, 1990; HAZRA et al., 2000; XIAO et al., 2011; POISSON et al., 2016; OZUDOGRU et al., 2017).

McClelland e Smith (1990) em seu trabalho com cinco espécies florestais observaram melhor produção de microestacas nos recipientes de maior volume. Outros estudos também mostraram maior produção *in vitro* em recipientes de grande volume (HAZRA et al., 2000). Montalbán e Moncalean (2018) avaliaram a influência de três frascos no cultivo de embriões somáticos de *Pinus radiata*, e concluíram que o tipo de recipiente utilizado no cultivo *in vitro* tem forte efeito nas porcentagens de enraizamento *in vitro* e aclimação *ex vitro*. Esses resultados podem estar relacionados a fatores ambientais internos que afetam o desenvolvimento de explantes, onde frascos menores tendem a ter baixas concentrações de dióxido de carbono e altas

concentrações de etileno, bem como também podem ser afetados por irradiação de luz, temperatura do ar e umidade relativa (ZIMMERMAN, 1995; XIAO et al., 2011).

Com a estimativa dos parâmetros genéticos, nos diferentes recipientes, obteve-se altos valores de herdabilidades ( $h^2g$ ) para todas as características, indicando que há controle genético dessas características. De acordo a classificação proposta por Resende (2002), para espécies perenes, valores de herdabilidade de 0 a 0,15 são considerados baixos, entre 0,15 e 0,50 são moderados e acima de 0,50 são considerados altos.

Os quatro clones com melhor desempenho de produção de microestacas foram C1, C5, C6 e C9. Maior confiabilidade na seleção é dada quando altos valores de acurácia são obtidos na análise (RESENDE, 2002). Os altos valores de acurácia encontrados para as características vigor, NB, NM, CM e R% conferem segurança nos valores genéticos estimados.

Existem diferentes estratégias para selecionar os melhores materiais genéticos. O método MHPRVG apresenta a vantagem adicional de selecionar materiais genéticos de acordo com sua adaptabilidade e estabilidade fenotípica (ROSADO et al., 2012; FARIAS NETO et al., 2013). Contudo, a seleção de clones com base no desempenho médio em todos os ambientes e seleção pelo método de estabilidade e adaptabilidade (MHPRVG), neste estudo, resultaram na escolha dos mesmos materiais genéticos para a característica NM.

A capacidade de materiais genéticos se comportarem bem em grande amplitude de condições ambientais e sua capacidade de resposta à melhoria do ambiente podem ser fatores essenciais em programas de melhoramento genético. Neste contexto, a análise da estabilidade e adaptabilidade dos materiais genéticos torna-se relevante (RESENDE, 2007).

A ausência de interação significativa entre os genótipos e substratos avaliados para as características vigor, NM, CM e AF juntamente com a existência de diferença significativa entre os materiais genéticos permite realizar seleção baseada no desempenho médio dos genótipos na análise conjunta dos locais.

A proximidade entre os valores genéticos preditos e os valores genéticos verdadeiros dos indivíduos pode ser avaliada com base na acurácia (RESENDE, 2002). Para as características NB, MFA e R% avaliadas neste trabalho, observou-se altos valores de acurácia, tornando essas características mais importantes na seleção dos genótipos e substratos mais indicados no cultivo *in vitro*.

No geral, o uso de ágar e vermiculita permitiram melhor desenvolvimento dos clones *in vitro*. Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos com *Eucalyptus*, onde os substratos ágar e vermiculita, em frascos que permitiam troca gasosa, proporcionaram maior produção de microestacas (GALLO et al., 2017). O ágar é amplamente utilizado na cultura de tecidos, no entanto, a sua principal desvantagem é o custo mais elevado. Alternativas de baixo custo, aplicáveis à cultura *in vitro* têm sido buscadas para permitir a aplicação em larga escala dessa tecnologia (OGERO et al., 2012; ESSERTI et al., 2017).

No presente trabalho, o enraizamento das plantas, para todos os clones, foi superior com o uso de vermiculita. Tuan et al. (2016) obtiveram melhor proliferação da espécie estudada com o uso de ágar, porém a adição de vermiculita ao meio de cultura mostrou-se mais eficaz no enraizamento das plantas por proporcionar um bom equilíbrio entre aeração e disponibilidade de água e nutrientes. Kirdmanee et al. (1995), no cultivo fotoautotrófico de *Eucalyptus camaldulensis* com substratos alternativos, também encontraram melhores resultados de crescimento com uso de vermiculita.

Alguns tipos de substratos, como fibra de celulose, pode levar a maior dificuldade na inoculação dos explantes devido à sua textura, e muitas vezes pode levar os explantes a apresentarem dificuldades de permanecer no meio, resultando em menores taxas de crescimento (AFREEN-ZOBAYED et al., 1999). Resultados semelhantes foram observados, com o uso do substrato celulose, no presente estudo e no trabalho de Gallo et al. (2017).

Na formação do jardim clonal *in vitro* é importante que haja o enraizamento dos explantes. No presente estudo, os substratos comercial, celulose e areia utilizados apresentaram desempenho inferior ao ágar e vermiculita. A porosidade do substrato é fator importante no desenvolvimento de raízes. A disponibilidade de água e de ar no substrato afetam a qualidade da planta, que necessita de água para manter seu metabolismo, e em condições de baixa aeração, torna deficiente a absorção de água pelas raízes (HARTMANN et al., 2011). Portanto, a porosidade dos substratos pode influenciar a formação de um sistema radicular. Tuan et al. (2016) destacaram que um dos principais problemas com uso de areia no cultivo *in vitro* relaciona-se a sua compactação, o que diminui a indução e desenvolvimento de raízes adventícias.



## 5. Conclusões

Há controle genético para as características de crescimento das plantas *in vitro* o que permite a seleção de clones de *Eucalyptus* mais responsivos à micropropagação. Os ambientes mais favoráveis para o desenvolvimento dos genótipos foram proporcionados por frascos de vidro de 250 mL ou potes de polipropileno de 500 mL e a utilização dos substratos ágar ou vermiculita.

## 6. Referências bibliográficas

AFREEN-ZOBAYED, F.; ZOBAYED, S. M. A.; KUBOTA, C.; KOZAI, T.; HASEGAWA, O. Supporting material affects the growth and development of *in vitro* sweet potato plantlets cultured photoautotrophically. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 35, n. 6, p. 470–474, 1999

ASSIS, E. S. DE; RUBIO NETO, A.; LIMA, L. R. de; SILVA, F. G.; ROSA, M.; VASCONCELOS FILHO, S. C.; LEITE, M. S. *In vitro* culture of *Mouriri elliptica* (Mart.) under conditions that stimulate photoautotrophic behavior. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, n. 2, p. 229-236, 2016

BRAWNER, J. T.; LEE, D. J.; MEDER, R.; ALMEIDA, A. C.; DIETERS, M. J. Classifying genotype by environment interactions for targeted germplasm deployment with a focus on *Eucalyptus*. **Euphytica**, v. 191, n. 3, p. 403–414, 2013

CHEN, C. Cost analysis of plant micropropagation of *Phalaenopsis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 126, n. 1, p. 167-175, 2016

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

CURTI, A. R.; REINIGER, L. R. S. Formação *in vitro* de raízes em canafístula: o efeito de diferentes meios de cultivo. **Ciência Rural**, v. 44, n. 2, p. 314-320, 2014

ESSERTI, S.; FAIZE, M., RIFAI, L.A.; SMAILI, A.; BELFAIZA, M.; FAIZE, L.; ALBURQUERQUE, N.; BURGOS, L.; KOUSSA, T.; MAKROUM, K. Media derived from brown seaweeds *Cystoseira myriophylloides* and *Fucus spiralis* for *in vitro* plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 2, p. 437-446, 2017

FARIAS NETO, J. T. DE; MOURA, E. F.; RESENDE, M. D. V. DE; CELESTINO FILHO, P.; AUGUSTO, S. G. Genetic parameters and simultaneous selection for root yield, adaptability and stability of cassava genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 12, p. 1562-1568, 2013

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

GALLO, R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, B. A.; MOURA, L. C.; MIRANDA, N. A.; GATTI, K. C.; OTONI, W.C. Micro-cutting propagation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* through clumps of axillary buds using different containers and substrates. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 10, p. 1327-1333, 2017

GEZAN, S. A.; CARVALHO, M. P. DE; SHERRILL, J. Statistical methods to explore genotype-by-environment interaction for loblolly pine clonal trials. **Tree Genetics & Genomes**, v.13, n. 1, p. 1-11, 2017

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; JUNIOR DAVIES, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8.ed. New Jersey: Englewood Clippings, 2011, 900p.

HAZRA, S.; KULKARNI, A. V.; NALAWADE, S. M.; BANERJEE, A. K.; AGRAWAL, D. C.; KRISHNAMURTHY, K. V. Influence of explants, genotypes and culture vessels on sprouting and proliferation of pre-existing meristems of cotton (*Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium arboreum* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 36, n. 6, p. 505-510, 2000

HOANG, N. N.; KITAYA, Y.; MORISHITA, T.; ENDO, R.; SHIBU YA. T. A comparative study on growth and morphology of wasabi plantlets under the influence of the micro-environment in shoot and root zones during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 130, n. 2, p. 255-263, 2017

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ. **Relatório anual 2017**. Disponível em: <[iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2017.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf)>. Acesso em: 15 maio 2018.

KIRDMANEE, C.; KITAYA, Y.; KOZAI, T. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 31, n. 3, p. 144-149, 1995

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. **Prop Ornam Plants**, v. 10, p. 188-204, 2010

MCCLELLAND, M. T.; SMITH, M. A. L. Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. **HortScience**, v. 25, n. 7, p. 797-800, 1990

MENDONÇA, E. G.; STEIN, V. C.; CARVALHO, H. H. de; SANTOS, B. R.; BEIJO, L. A.; PAIVA, L. V. The use of continuous, temporary immersion bioreactor system and semisolid culture medium for the production of *Eucalyptus camaldulensis* clones. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 4, p. 1211-1224, 2016

MONTALBÁN, I. A.; MONCALEÁN, P. Rooting of *Pinus radiata* somatic embryos: factors involved in the success of the process. **Journal of Forestry Research**, p. 1-7, 2018

- OGERO, K. O.; MBURUGU, G. N.; MWANGI, M.; OMBORI, O.; NGUGI, M. *In vitro* micropropagation of cassava through low cost tissue culture. **Asian Journal of Agricultural Sciences**, v. 4, n. 3, p. 205-209, 2012
- OGUT, F.; MALTECCA, C.; WHETTEN, R.; MCKEAND, S.; ISIK, F. Genetic analysis of Diallel progeny test data using factor analytic linear mixed models. **Forest Science**, v. 60, n. 1, p.119–127, 2014
- OLIVEIRA, K. S. DE; OLIVEIRA, M. DA S.; PEREIRA, E. C.; LIMA, S. C. DE; ALOUFA, M. A. I. Efeito de diferentes meios de cultura na germinação *in vitro* de sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Árvore**, v. 38, n. 4, p. 601-607, 2014
- OLIVEIRA, M. L. D.; XAVIER, A.; PENCHEL FILHO, R. M.; OTONI, W. C.; TEIXEIRA, J. B. Effects of culture medium and BAP/NAA ratio on *in vitro* multiplication of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clones in a temporary immersion bioreactor. **Revista Árvore**, v. 35, n. 6, p. 1207-1217, 2011
- OZUDOGRU, E. A.; BENELLI, C.; DRADI, G.; LAMBARDI, M. Effect of culture container and carbohydrate content on *in vitro* slow growth storage of the cherry rootstock ‘Gisela®5’. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 4, p. 94-101, 2017
- PARK, Y. S.; BONGA, J. M.; MOON, H. K. **Vegetative propagation of forest trees**. National Institute of Forest Science, 2016, 49p.
- PENCHEL, R.M.; OTONI, W.C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação *in vitro*. In: BORÉM, A. (Ed.) **Biotechnology florestal**. Viçosa: UFV, 2007, p.75-92
- POISSON, A. S.; BERTHELOT, P.; LE BRAS, C.; GRAPIN, A.; VERGNE, E.; CHEVREAU, E. A droplet-vitrification protocol enabled cryopreservation of doubled haploid explants of *Malus × domestica* Borkh. ‘Golden Delicious’. **Scientia Horticulturae**, v. 209, p. 187-191, 2016
- RESENDE, M. D. V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002, 975p.
- RESENDE, M. D. V. **Matemática e Estatística na Análise de Experimentos e no melhoramento genético**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007, 535p.
- RESENDE, M. D. V. Software Selegen-REML/BLUP: A useful tool for plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 330–339, 2016
- ROSADO, A. M.; ROSADO, T. B.; ALVES, A. A.; LAVIOLA, B. G.; BHERING, L. L. Seleção simultânea de clones de eucalipto de acordo com produtividade, estabilidade e adaptabilidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 7, p. 964-971, 2012
- TUAN, P. N.; MEIER-DINKEL, A.; HÖLTKEN, A. M.; WENZLITSCHKE, I.; WINKELMANN, T. Paving the way for large-scale micropropagation of *Juglans x intermedia* using genetically identified hybrid seed. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 126, n. 1, p. 153-166, 2016

WATT, M. P. Genotypic-unspecific protocols for the commercial micropropagation of *Eucalyptus grandis* × *nitens* and *E. grandis* × *urophylla*. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 38, n. 1, p. 125-133, 2014

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2.ed. Viçosa: Ed. UFV, 2013, 279p.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 2, p. 149-158, 2011

ZIMMERMAN, R. H. Environmental effects and their control in plant tissue culture - review. **Acta Horticultura**, v. 393, p. 11-14, 1994

## TROCAS GASOSAS E SACAROSE NO DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE MICROCEPAS DE *Eucalyptus urophylla*

**Resumo** - O objetivo do trabalho foi avaliar o desenvolvimento de microcepas de um clone de *Eucalyptus urophylla* mantidas *in vitro*, sob influência de três sistemas de trocas gasosas e de concentrações de sacarose. Os três sistemas de trocas gasosas testados foram: uso de tampas com membrana (CM); uso de tampas sem membrana (SM) e cultivo parcial usando tampas sem membrana (SCM). As concentrações de sacarose testadas foram de 0, 7, 15 e 30 g L<sup>-1</sup>. Após 70 dias as plantas foram avaliadas quanto ao número de brotações maiores que 0,5 cm, número de microestacas produzidas e a quantificação de clorofila total e de carotenoides nas microestacas. Após 150 dias de cultivo, fez-se a quantificação estomática e avaliou-se a sobrevivência de microestacas em condição *ex vitro*. Foram observados efeitos significativos das concentrações de sacarose e dos sistemas de trocas gasosas. Após 70 dias, o número de brotações maiores que 0,5 cm foi maior quando utilizou-se 7 e 15 g L<sup>-1</sup> em sistema CM. Maiores taxas de sobrevivência *ex vitro* foram proporcionadas pelos sistemas que permitiam maiores trocas gasosas *in vitro*. A sacarose é importante no desenvolvimento inicial das plantas, com resultados crescentes para todas as características com o uso de concentrações até 20 g L<sup>-1</sup>, exceto para número de estacas obtidas aos 150 dias, onde maiores valores foram obtidos com maiores concentrações de sacarose sob sistemas SCM e SM. A redução de sacarose e o uso de sistema que permite maior troca gasosa representam ambiente mais adequado para o estabelecimento de microcepas do clone de *Eucalyptus urophylla* mantidas na condição *in vitro*.

**Palavras-chave:** Propagação *in vitro*, micropropagação, sistema fotoautotrófico.

### 1. Introdução

A micropropagação, enquanto técnica de propagação vegetativa *in vitro*, destaca-se no setor florestal por sua aplicação relacionada à preservação de germoplasma, aceleração de programas de melhoramento, multiplicação de clones superiores, rejuvenescimento/revigoramento de material adulto, produção de plantas livres de doenças, além de constituir base para outras biotecnologias (XAVIER et al., 2013).

No sistema convencional de propagação de plantas *in vitro*, o material vegetal é cultivado em recipientes que restringem as trocas gasosas, caracterizados por elevada umidade relativa, elevada concentração de etileno, baixos níveis de CO<sub>2</sub>, e utilização de altas concentrações de sacarose como principal fonte de energia metabólica. Essas características podem causar alterações anatômicas e fisiológicas nas plantas, interferindo diretamente na taxa fotossintética *in vitro* e em seu processo de aclimação *ex vitro* (TANAKA et al., 2005; ARAGÓN et al., 2010; XIÃO et al., 2011; ALVAREZ et al., 2012; KUMAR; RAO 2012).

Para contornar estes desafios algumas técnicas têm sido utilizadas, estimulando o cultivo fotoautotrófico, como o enriquecimento da atmosfera com CO<sub>2</sub> (SALDANHA et al., 2013; SALDANHA et al., 2014; JIMÉNEZ et al., 2015; TISARUM et al., 2018), substituição de ágar por substratos alternativos (DEB; PONGENER, 2013; SALDANHA et al., 2014; GALLO et al., 2017), uso de fontes luminosas mais eficientes (ASSIS et al., 2016; JEONG; SIVANESAN, 2018), redução ou eliminação de sacarose no meio de cultura (MOSALEEYANON et al., 2004; NGUYEN; KOZAI, 2005) e uso de tampas com membranas porosas (IAREMA et al., 2012; SALDANHA et al., 2012; MARTINS et al., 2015).

A micropropagação fotoautotrófica possui vantagens em relação à micropropagação convencional. Essas vantagens incluem a promoção do crescimento e fotossíntese de plantas *in vitro*; prevenção de distúrbios morfológicos e fisiológicos; diminuição de contaminação microbiana; maior taxa de sobrevivência de plantas cultivadas *in vitro* quando transferidas para ambiente *ex vitro*; simplificação do sistema de micropropagação; flexibilidade para produção de plantas *in vitro* em larga escala; aumento anual do rendimento de produção por unidade de área útil; redução de custo e maior possibilidade de automação do sistema (NGUYEN et al., 2016). O modo de cultivo (fotoautotrófico ou heterotrófico, por exemplo) também altera níveis finais de metabólitos nas plantas (PAL et al., 2018).

Para tornar a aplicação de sistemas fotoautotróficos viável na produção de plantas de qualidade em grande escala, principalmente para as espécies de interesse no setor florestal, é necessário mais estudos sobre os fatores que podem ser manipulados *in vitro* e o comportamento das plantas sob tais condições. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar concentrações de sacarose e o uso de diferentes sistemas de trocas gasosas no estabelecimento de microcepas de um clone de *Eucalyptus urophylla* *in vitro*, para estimular o comportamento fotoautotrófico.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Material vegetal e condições de cultivo

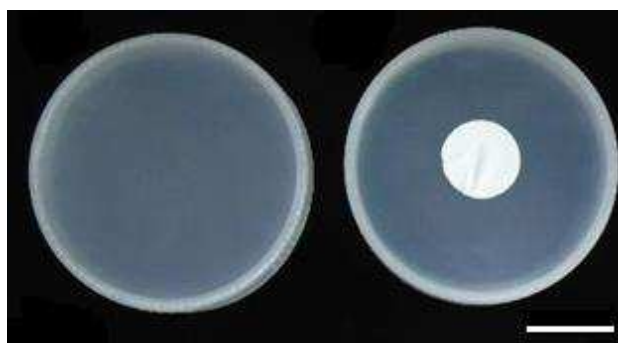
Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, localizada em Viçosa - MG.

Para a obtenção dos explantes (segmentos nodais) utilizados no presente trabalho, gemas diferenciadas de um clone de *Eucalyptus urophylla* foram alongadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995), adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina), 0,25 mg L<sup>-1</sup> de AIB (ácido 3-indolbutírico) e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar.

Os segmentos nodais, retirados da gemas alongadas *in vitro*, contendo dois pares de folhas foram inoculados em frascos de vidro (250 mL de capacidade), usando como substrato 50 cm<sup>3</sup> de vermiculita de granulometria média e meio líquido JADS, adicionado de 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,25 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Testou-se as concentrações 0, 7, 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e três sistemas de vedação dos frascos. No primeiro sistema (CM) utilizou-se tampas de polipropileno com um orifício (10 mm) coberto com membrana MilliSeal (com taxa de troca de CO<sub>2</sub> de 21 µL L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>); no segundo (SM), os frascos foram vedados com tampas de polipropileno sem membrana (com taxa de troca de CO<sub>2</sub> de 14 µL L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>); e no terceiro (SCM) utilizou-se inicialmente tampas sem membrana, que foram substituídas por tampas com uma membrana após 50 dias de cultivo (Figura 1). O substrato e o meio de cultura utilizados foram esterilizados em autoclave a pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C durante 20 minutos.

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 25±2°C e irradiância de 70 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fornecida por tubos fluorescentes (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil). Aos 50 dias de cultivo fez-se uma poda para formação das microcepas (para retirada de brotações maiores que 2 cm e para estimular a brotação das gemas axilares na porção remanescente) e reposição do meio líquido. Para reposição utilizou-se meio líquido JADS autoclavado, contendo apenas macro e micronutrientes, sem adição de sacarose. Antes de ser acrescido nos frascos, 600 µL L<sup>-1</sup> de cloro ativo (2,5%) era adicionado ao meio líquido.

A reposição do meio de cultura foi realizada a cada 20 dias nos frascos que apresentavam consumo do meio contido.



**Figura 1.** Padrões de vedação empregados nos sistemas de trocas gasosas no cultivo *in vitro* de microcepas de *Eucalyptus urophylla*. À esquerda, tampa de polipropileno sem membrana, seguida por tampa de polipropileno com uma membrana. Barra = 2 cm.

## 2.2. Análise de crescimento e pigmentos fotossintéticos

Após 70 e 150 dias de cultivo foram feitas avaliações quanto ao número de brotações com comprimento acima de 0,5 cm (NB), número de brotações acima de 2 cm (microestacas) e quantificação de clorofila total e carotenoides. Microestacas foram cortadas e retiradas dos frascos aos 70, 100 e 150 dias de cultivo.

Para quantificação dos pigmentos fotossintéticos, foram retirados cinco discos foliares (5 mm de diâmetro), da terceira folha expandida a partir do meristema apical, e inoculados em 5 mL de solução de DMSO (saturado com carbonado de cálcio) por 48 horas no escuro (SANTOS et al., 2008). A absorbância das amostras foi determinada em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico, em espectrofotômetro Genesys 10UV (ThermoScientific, EUA). Os comprimentos de onda (665, 649 e 480 nm) e as equações para o cálculo das concentrações de clorofilas e carotenoides totais foram baseados no método descrito por Wellburn (1994).

## 2.3. Contagem estomática

A análise da epiderme do material vegetal *in vitro* foi realizada após 150 dias de cultivo. Foram preparadas secções paradérmicas a partir de fragmentos da região mediana de folhas do segundo par a partir do meristema apical, que foram diafanizadas utilizando-se hidróxido de sódio (2,5%) e hipoclorito de sódio (20%). O material foi desidratado em série etanólica e corado com fucsina alcoólica (50%). As lâminas



foram montadas com glicerina gelatinosa e seladas com esmalte incolor (KRAUS; ARDUIN, 1997).

Para calcular a densidade estomática foi realizada a contagem de estômatos na face abaxial das folhas, em doze observações por tratamento, em campos com área correspondente a 0,137 mm<sup>2</sup> projetada em superfície plana. As imagens foram capturadas em microscópio Micros MCX51 (Micros Lotus, Áustria) com sistema Image-Pro Insight, acoplado à câmera fotográfica digital (Moticam 580, 5.0 MP, National Optical & Scientific Instruments, Inc.). A contagem e cálculo da densidade estomática foram realizados com o auxílio do programa ImageJ (SCHNEIDER et al., 2012).

#### **2.4. Sobrevivência de microestacas *ex vitro***

Os experimentos foram conduzidos no Viveiro de Pesquisas do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa-UFV. Microestacas, coletadas na condição *in vitro* após 150 dias de cultivo, foram transferidas para o viveiro em recipiente com água visando manter a turgescência. Foram estaqueadas em tubetes plásticos de 55 cm<sup>3</sup> de capacidade, contendo substrato comercial (Tropstrato Vida Verde) e vermiculita de granulometria média, na proporção de (2:1). Após serem estaqueadas, as microestacas foram acondicionadas em casa de vegetação climatizada (temperatura de 20 a 30 °C e umidade relativa do ar  $\geq$  80 %). Nos primeiros 15 dias em casa de vegetação, foi mantida uma cobertura com Aluminet (50 %) sobre as microestacas, a 20 cm de altura sobre os recipientes. Após 30 dias de permanência na casa de vegetação, o material foi transferido para casa de sombra, sendo realizada a adubação de cobertura, constituída pela aplicação de 2 mL por muda de solução de fosfato monoamônico (MAP), na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>. As mudas permaneceram em casa de sombra (50 % de sombreamento) por 30 dias, sendo em seguida transferidas para área de pleno sol.

#### **2.5. Delineamento experimental e análise de dados**

Para o experimento em laboratório foi adotado esquema fatorial 4x3, sendo quatro concentrações de sacarose e três sistemas de vedação, com 8 repetições (microcepas), em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Em viveiro, o experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados (DBC),

apresentando os tratamentos advindos das condições *in vitro*, em três repetições contendo um número variável de microestacas de acordo com a produção *in vitro* de cada tratamento.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, testes de média e análise de regressão (ajustada com todos os dados) com o auxílio do software estatístico R versão 3.5.0 (R CORE TEAM, 2018), utilizando o pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA et al., 2013).

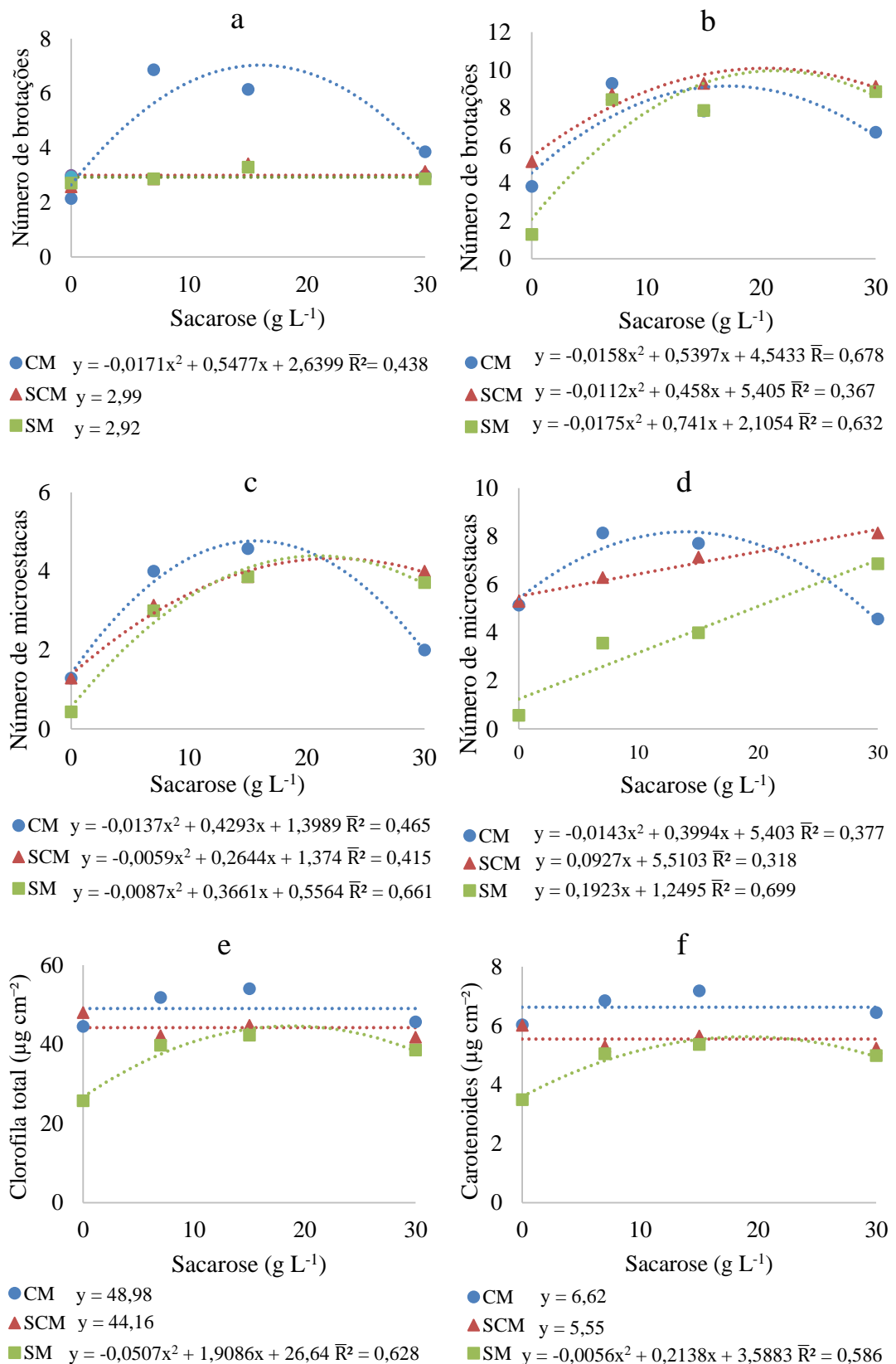
### 3. Resultados

De acordo com os resultados obtidos, todas as características avaliadas indicaram influência significativa dos tratamentos. Para as características NB e número de microestacas produzidas houve interação entre os fatores concentração de sacarose e sistema de trocas gasosas, aos 70 e 150 dias de cultivo (Tabela 1, Figura 2).

**Tabela 1.** Valores médios do número de brotações maiores que 0,5 cm (NB), de microestacas por microcepa e de clorofila total e carotenoides avaliados aos 70 e 150 dias de cultivo *in vitro* de microcepas do clone de *Eucalyptus urophylla*, sob diferentes concentrações de sacarose e sistemas de trocas gasosas (CM- com membrana; SM- sem membrana e SCM- cultivo parcial sem membrana).

NB								
Troca gasosa	Avaliação 1 (70 dias)				Avaliação 2 (150 dias)			
	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )				Sacarose (g L <sup>-1</sup> )			
	0	7	15	30	0	7	15	30
CM	2,1 a	6,9 a	6,1 a	3,9 a	3,8 a	9,3 a	7,8 a	6,7 b
SCM	2,6 a	2,9 b	3,4 b	3,1 a	5,1 a	8,7 a	9,3 a	9,1 a
SM	2,7 a	2,9 b	3,3 b	2,9 a	1,3 b	8,4 a	7,9 a	8,9 ab
Número de microestacas								
Troca gasosa	Avaliação 1 (70 dias)				Avaliação 2 (150 dias)			
	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )				Sacarose (g L <sup>-1</sup> )			
	0	7	15	30	0	7	15	30
CM	1,3 a	4,0 a	4,6 a	2,0 b	5,1 a	8,1 a	7,7 a	4,6 b
SCM	1,3 a	3,1 a	3,9 a	4,0 a	5,3 a	6,3 a	7,1 a	8,1 a
SM	0,4 a	3,0 a	3,9 a	3,7 a	0,6 b	3,6 b	4,0 b	6,9 a
Avaliação 1 (70 dias)								
Troca gasosa	Clorofila Total (µg cm <sup>-2</sup> )				Carotenoides (µg cm <sup>-2</sup> )			
	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )				Sacarose (g L <sup>-1</sup> )			
	0	7	15	30	0	7	15	30
CM	44,5 a	51,8 a	54,0 a	45,7 a	6,0 a	6,9 a	7,2 a	6,4 a
SCM	48,0 a	42,1 b	44,8ab	41,8 a	6,0 a	5,3 b	5,6 b	5,2 b
SM	25,7 b	39,7 b	42,3 b	38,5 a	3,5 b	5,0 b	5,3 b	5,0 b

Médias seguidas por letras iguais na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.



**Figura 2.** Número médio de brotações maiores que 0,5 cm aos 70 dias (a) e 150 dias (b); Número médio de microestacas aos 70 dias (c) e 150 dias (d); Clorofila total (e) e carotenoides (f) aos 70 dias, em função da sacarose e sistemas de trocas gasosas CM (com membrana), SM (sem membrana) e SCM (cultivo parcial sem membrana).

Maiores valores de NB após 70 dias de cultivo foram obtidos em sistemas que permitiam maiores trocas gasosas (CM e SCM) combinados com concentrações de 7 e 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Na ausência de sacarose, o sistema que permite menor troca gasosa foi responsável pelos menores valores médios de NB e microestacas aos 150 dias. O número de microestacas produzidas, após 150 dias, é superior em sistemas que permitem maiores trocas gasosas, exceto quando se utiliza 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Na análise de pigmentos fotossintéticos, clorofila total e carotenoides, houve interação entre os fatores testados apenas na avaliação realizada aos 70 dias (Tabela 1). Após 150 dias de cultivo *in vitro*, os pigmentos fotossintéticos das folhas sofreram influência apenas do sistema de trocas gasosas (Tabela 2). Após 70 e 150 dias de cultivo *in vitro*, maiores valores de clorofila total e carotenoides foram observados sob sistemas que permitiam maior troca gasosa nos frascos.

O Número de brotações obtidas aos 70 dias em sistema CM e em todos os sistemas de trocas gasosas aos 150 dias seguiu tendência quadrática com as concentrações de sacarose (Figura 2). A mesma tendência foi observada para o número de microestacas em todos os sistemas de vedação aos 70 dias, e em CM aos 150 dias de cultivo. Em sistemas SM e SCM o número de microestacas tende a aumentar com as concentrações de sacarose. Na análise de pigmentos, clorofila total e carotenoides, apenas foi observada tendência quadrática dos valores em sistema SM, nas concentrações de sacarose.

**Tabela 2.** Valores médios de clorofila total e carotenoides aos 150 dias de cultivo de microcepas do clone de *Eucalyptus urophylla* sob diferentes sistemas de vedação (CM- com membrana; SM- sem membrana e SCM- cultivo parcial sem membrana) *in vitro*.

Sistema de trocas gasosas	Clorofila total (µg cm <sup>-2</sup> )	Carotenoides (µg cm <sup>-2</sup> )
CM	42,7 a	5,7 a
SCM	35,7 b	4,4 b
SM	32,2 b	4,3 b

Médias seguidas por letras iguais na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

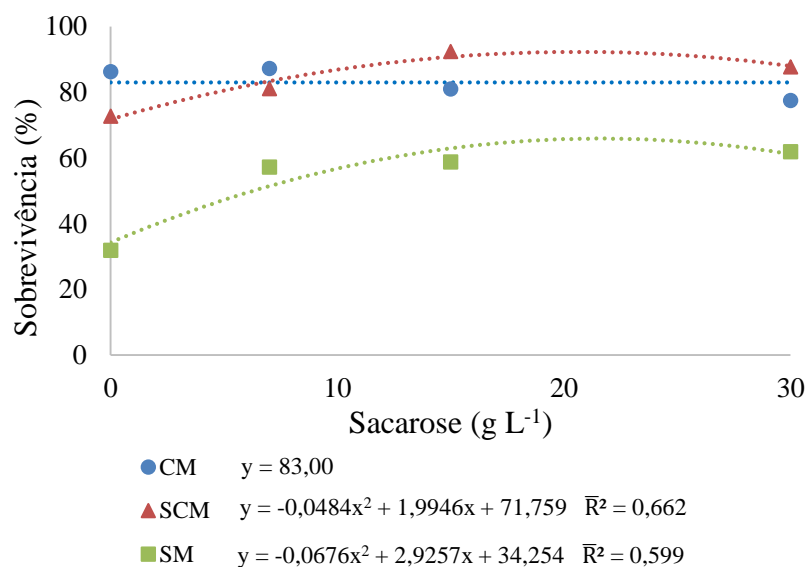
A taxa de sobrevivência das microestacas transplantadas para ambiente *ex vitro* foi influenciada pelos tratamentos. Para esta característica foi observada interação entre os fatores concentração de sacarose e sistemas de trocas gasosas testados. Microestacas produzidas em sistemas com maiores trocas gasosas apresentam maiores percentuais de sobrevivência em viveiro (Tabela 3).

Quando combinado o sistema SM e ausência de sacarose foi observado a menor taxa de sobrevivência das microestacas *ex vitro*. Em sistemas SM e SCM houve tendência quadrática da sobrevivência de microestacas obtidas em relação às concentrações de sacarose (Figura 3). Entre as plantas sobreviventes o crescimento foi semelhante sob as condições testadas, sem influência dos tratamentos.

**Tabela 3.** Valores médios de porcentagem de sobrevivência *ex vitro* de microestacas do clone de *Eucalyptus urophylla* após 60 dias de plantio, em função das condições de vedação estabelecidas *in vitro* (CM- com membrana; SM- sem membrana e SCM- cultivo parcial sem membrana).

Sistemas de trocas gasosas	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )			
	0	7	15	30
CM	86,3 a	87,3 a	81,0 a	77,5 a
SCM	72,7 b	81,1 a	92,4 a	87,8 a
SM	31,9 c	57,3 b	58,8 b	61,9 b

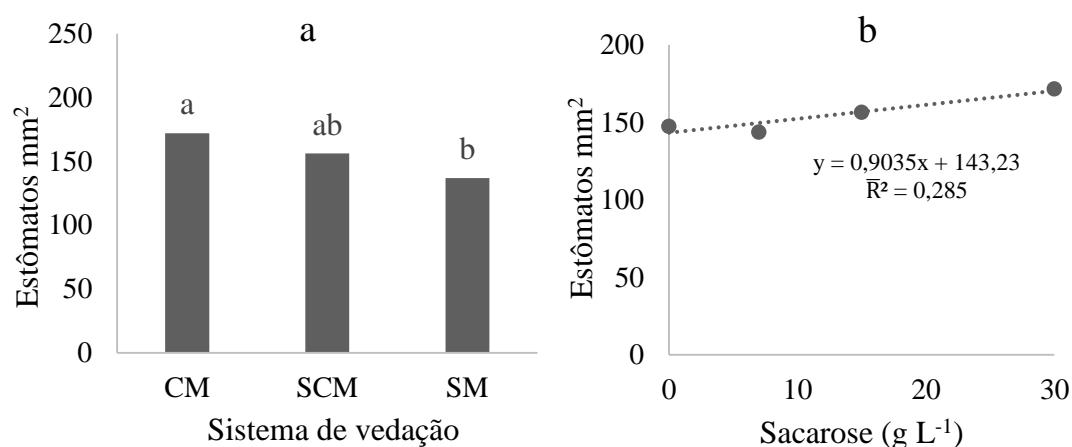
Médias seguidas por letras iguais na coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.



**Figura 3.** Porcentagem média de sobrevivência *ex vitro* de microestacas de *Eucalyptus urophylla* após 60 dias de plantio, em função da sacarose e sistemas de vedação CM (com membrana), SM (sem membrana) e SCM (cultivo parcial sem membrana).

A densidade estomática também foi influenciada pelos tratamentos impostos pela sacarose e sistema de vedação, sem interação entre os fatores. As maiores médias foram obtidas no tratamento CM quando comparado ao SM (Figura 4a). Com o

aumento das concentrações de sacarose é observado aumento da densidade estomática na face abaxial de folhas de *Eucalyptus urophylla in vitro* (Figura 4b).



**Figura 4.** Densidade estomática da face abaxial de folhas do clone de *Eucalyptus urophylla in vitro* sob diferentes sistemas de vedação (CM- com membrana; SM- sem membrana e SCM- cultivo parcial sem membrana) (a) e concentrações de sacarose (b), após 150 dias de cultivo. (Médias seguidas pelas mesmas letras, dentro dos tratamentos de sistema de vedação e de concentrações de sacarose, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade).

#### 4. Discussão

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que as diferentes quantidades de sacarose fornecidas inicialmente no estabelecimento de microcepas *in vitro* de um clone de *Eucalyptus urophylla*, juntamente com os sistemas de trocas gasosas testados, influenciaram o crescimento das microestacas *in vitro* e a sobrevivência *ex vitro*. Diferenças no crescimento estão relacionadas com a presença de uma fonte de carbono, seja pelo fornecimento direto de sacarose ou produção pela própria planta por meio da fotossíntese.

Com a utilização de recipientes fechados há elevada concentração de etileno e baixos níveis de CO<sub>2</sub> nos frascos. Estas condições, juntamente com o uso de altas concentrações de sacarose, podem causar distúrbios anatômicos e fisiológicos nas plântulas, dificultando o funcionamento normal do aparelho fotossintético (XIAO et al., 2011). No presente estudo, o cultivo sob sistemas que permitem maior troca gasosa possibilitou maior produção de microestacas, pigmentos fotossintéticos e sobrevivência *ex vitro*. Na ausência de sacarose combinada com sistema de menor

troca gasosa houve menor crescimento das plantas, devido possivelmente à falta de fonte de carbono no sistema.

Para maior produção de microestacas e emissão de brotações, o uso de sacarose e de um sistema que permita trocas gasosas é mais eficiente. Porém, pelos resultados avaliados, as concentrações de sacarose usadas inicialmente para o estabelecimento das microcepas podem ser reduzidas de 30 para concentrações entre 7 e 20 g L<sup>-1</sup>, sem prejuízo quanto ao crescimento das plantas. Efeito negativo da sacarose foi observado na cultura *in vitro* de *Billbergia zebrina*, onde o suprimento de sacarose reduziu pigmentos fotossintéticos nas plantas (MARTINS et al., 2015), sendo esta uma das características que podem causar perdas de plântulas durante o processo de aclimatação e aumentar os custos de produção. Contudo, no presente estudo, na ausência de sacarose, mesmo com o uso de membranas que permitem trocas gasosas, também houve menor crescimento das plantas, evidenciando a importância de uma fonte de carbono externa no crescimento inicial das plantas nestas condições.

O alto teor de sacarose no meio pode reduzir o crescimento fotossintético e a expressão de genes relacionados à fotossíntese (NGUYEN; KOZAI, 2005; BADR et al., 2011), e promover a formação de estômatos fisiologicamente e estruturalmente anormais (HAZARIKA, 2006). A redução de sacarose em biorreatores de 30 para 15 g L<sup>-1</sup> foi considerada como tratamento primordial para adaptabilidade ao ambiente *ex vitro* em híbridos de *Populus* (ARENCEBIA et al., 2017).

Na maioria das plantas, a exposição prolongada à sacarose aplicada exogenamente resulta em uma inibição da fotossíntese, que está associada à inibição da biossíntese da clorofila (SMITH; STITT, 2007; MARTINS et al., 2013; MCCARTHY et al., 2016). Em plantas de *Samanea saman* maior crescimento foi observado em meio sem sacarose, sendo a taxa fotossintética e a concentração de clorofila das plântulas também aumentada com a diminuição da concentração de sacarose no meio (MOSALEEYANON et al., 2004). O nível de sacarose juntamente com a qualidade de luz tiveram efeito na regeneração em tecidos da parte aérea e no teor de compostos bioativos em culturas de *Ajuga multiflora* (JEONG; SEVANESAN, 2018). Segundo Yuan et al. (2015), a biossíntese de carotenoides é também regulada pela sacarose presente. No presente trabalho, os teores de carotenoides foram influenciados principalmente pelo sistema de trocas gasosas utilizado.

A diminuição ou eliminação de sacarose, e o uso de sistemas que aumentem o fornecimento de CO<sub>2</sub> para as plantas *in vitro*, são condições que podem aumentar o

crescimento das plantas, melhorar as características fisiológicas e facilitar a aclimação das mudas às condições *ex vitro*, promovendo o desenvolvimento do aparato fotossintético (WALTERS, 2005; IAREMA et al., 2012). No cultivo *in vitro* de mudas de *Mouriri elliptica* sob condições que estimulam o comportamento fotoautotrófico, foi observado melhor crescimento nas plântulas cultivadas na ausência de sacarose com o aumento da intensidade luminosa (ASSIS et al., 2016).

O principal problema de adaptação *ex vitro* de plantas cultivadas *in vitro* está relacionada com controle da transpiração pelas plantas micropropagadas, mais especificamente pela funcionalidade estomática (DIAS et al., 2014a). O funcionamento estomático é uma característica importante para controlar a perda de água em ambientes *ex vitro*. Na maioria das vezes, as plântulas cultivadas *in vitro* não têm estômatos funcionais (DIAS et al., 2014b). Contudo, as plântulas micropropagadas apresentam frequentemente baixa taxa de sobrevivência devido a desordens anatômicas e fisiológicas induzidas por condições *in vitro* (MARTINS et al., 2015).

O uso de membranas porosas no cultivo de plantas é capaz de melhorar o processo de aclimação das mesmas, aumentando a porcentagem de sobrevivência. Esta condição está relacionada com a diminuição da perda de água durante a transferência para condições *ex vitro*, devido à deposição de cera epicuticular e à produção de estômatos funcionais (CHANDRA et al., 2010; MARTINS et al., 2015; HOANG et al., 2017). Algumas vezes a adaptação gradual à condição *ex vitro* pode ser requerida para que plantas cultivadas em sistemas fotomixotróficos *in vitro* passem para um crescimento autotrófico em casa de vegetação (SILVA et al., 2017a).

Os resultados do presente estudo evidenciaram que os níveis das trocas gasosas nos frascos de cultura contribuem para uma alteração da densidade estomática, sendo que os maiores valores foram encontrados em plantas cultivadas em sistemas com trocas gasosas. Essas plantas também apresentaram maior taxa de sobrevivência *ex vitro*.

Os melhores resultados em ambientes com membranas podem estar associados ao aumento da fotossíntese causada pelo aumento da disponibilidade de CO<sub>2</sub>. Na cultura *in vitro* de *Plectranthus amboinicus* foi observada melhoria no desenvolvimento das plantas com o uso de membranas nos recipientes (SILVA et al., 2017b). Para cultivo *in vitro* e aclimação *ex vitro* de *Hevea brasiliensis*, melhores resultados foram obtidos quando utilizou-se, na ausência de sacarose, frascos que



permitiam ventilação natural, não sendo necessário enriquecer o ambiente com CO<sub>2</sub> (TISARUM et al., 2018).

## 5. Conclusões

- Sacarose deve ser adicionada no meio de cultivo *in vitro* para o crescimento inicial de microcepas do clone de *Eucalyptus urophylla*, podendo ser reduzida para concentrações entre 7 e 20 g L<sup>-1</sup>.
- O uso de frascos com membranas que permitem trocas gasosas são alternativas para melhorar o crescimento *in vitro* das brotações e aclimação *ex vitro* das microestacas.

## 6. Referências bibliográficas

ALVAREZ, C.; SÁEZ, P.; SÁEZ, K.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 1, p. 93-101, 2012

ARAGÓN, C.; CARVALHO, L.; GONZÁLEZ, J.; ESCALONA, M.; AMÂNCIO, M. *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 237-244, 2010

ARENCIBIA, A. D.; GÓMEZ, A.; POBLETE, M.; VERGARA, C. High performance micropropagation of dendroenergetic poplar hybrids in photomixotrophic temporary immersion bioreactors (TIBs). **Industrial crops and products**, v. 96, p. 102–109, 2017

ASSIS, E. S.; RUBIO NETO, A.; DE LIMA, L. R.; SILVA, F. G.; ROSA, M.; VASCONCELOS FILHO, S. C.; LEITE, M. S. *In vitro* culture of *Mouriri elliptica* (Mart.) under conditions that stimulate photoautotrophic behavior. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, n. 2, p. 229-236, 2016

BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, n.1, p. 13–24, 2011

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 9, p. 1199–1205, 2010

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

DEB, C. R.; PONGENER, A. A study on the use of low cost substrata against agar for non-symbiotic seed culture of *Cymbidium iridioides*. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n. 5, p. 642-649, 2013

DIAS, G. M. G.; SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; SILVA, R. A. L.; RODRIGUES, L. C. A.; PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M. Photosynthesis and leaf anatomy of Anthurium cv. Rubi plantlets cultured *in vitro* under different silicon (Si) concentrations. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 8, p. 1160–1167, 2014b

DIAS, M. C.; CORREIA, C.; MOUTINHO-PEREIRA, J.; OLIVEIRA, H.; SANTOS, C. Study of the effects of foliar application of ABA during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 2, p. 213-224, 2014a

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes: Experimental Designs package**. R package version 1.1.2, 2013

GALLO, R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, B. A.; MOURA, L. C. DE; MIRANDA, N. A.; GATTI, K. C.; OTONI, W. C. Micro-cutting propagation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* through clumps of axillary buds using different containers and substrates. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 10, p. 1327-1333, 2017

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia horticultrae**, v. 108, n.2, p. 105–120, 2006

HOANG, N. N.; KITAYA, Y.; MORISHITA, T.; ENDO, R.; SHIBUYA, T. A comparative study on growth and morphology of wasabi plantlets under the influence of the micro-environment in shoot and root zones during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 130, n. 2, p. 255-263, 2017

IAREMA, L.; CRUZ, A. C. F.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; VIEIRA, R. F.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 2, p. 227–238, 2012

JEONG, B. R.; SIVANESAN, I. Impact of light quality and sucrose on adventitious shoot regeneration and bioactive compound accumulation in *Ajuga multiflora* Bunge. **Scientia Horticulturae**, v. 236, p. 222-228, 2018

JIMÉNEZ, M. P.; PÉREZ, A. J. L.; ÁLCON, G. O.; NICOLÁS, D. M.; PIÑERO, M. C.; AMOR, F. M. DEL. A regime of high CO<sub>2</sub> concentration improves the acclimatization process and increases plant quality and survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, n. 3, p. 547-557, 2015

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997, 198p.

KUMAR, K.; RAO, I. U. Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in-ex vitro conditions: a reviews. **Journal of Ornamental and Horticultural Plants**, v. 2, n. 4, p. 271–283, 2012

MARTINS, J. P. R.; PASQUAL, M.; MARTINS, A. D.; RIBEIRA, S. F. Effects of salts and sucrose concentrations on in vitro propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae). **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 1, p. 85-91, 2015

MARTINS, M. C. M.; HEJAZI, M.; FETTKE, J.; STEUP, M.; FEIL, R.; KRAUSE, U.; ARRIVAUULT, S.; VOSLOH, D.; FIGUEROA, C. M.; IVAKOV, A.; YADAV, U. P.; PIQUES, M.; METZNER, D.; STITT, M.; LUNN, J. E. Feedback inhibition of starch degradation in *Arabidopsis* leaves mediated bytrehalose 6-phosphate. **Plant Physiology**, v. 163, n. 3, p. 1142–1163, 2013

MCCARTHY, A.; CHUNG, M.; IVANOV, A. G.; KROL, M.; INMAN, M.; MAXWELL, D. P.; HÜNER, N. P. An established *Arabidopsis thaliana* var. Landsberg erecta cell suspension culture accumulates chlorophyll and exhibits a stay-green phenotype in response to high external sucrose concentrations. **Journal of plant physiology**, v. 199, p. 40-51, 2016

MOSALEEYANON, K.; CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO<sub>2</sub>-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, v. 103, n. 1, p. 51-63, 2004

NGUYEN, Q. T.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. (ed) **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Springer Netherlands, Dordrecht, 2005 p. 123-146

NGUYEN, Q. T.; XIAO, Y.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. In: KOZAI, T.; NIU, G.; TAKAGAKI, M. (eds) **Plant factory**. Academic Press, Burlington, 2016, p. 271–283

PAL, T.; PADHAN, J. K.; KUMAR, P.; SOOD, H.; CHAUHAN, R. S. Comparative transcriptomics uncovers differences in photoautotrophic versus photoheterotrophic modes of nutrition in relation to secondary metabolites biosynthesis in *Swertia chirayita*. **Molecular biology reports**, v. 45, n. 2, p. 77-98, 2018

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L. F. DE; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M. DO; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; NOTINI, M. M.; KUKI, K. N.; CRUZ, A. C. F.; RUBIO NETO, A.; DIAS, L. L. C.; OTONI, W. C. A CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 49, n.4, p. 433-444, 2013

- SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; ROCHA, D. I.; CAVATTE, P. C.; DETMANN, K. S. C.; TANAKA, F. A. O.; DIAS, L. L. C.; DAMATTA, F. M.; OTONI, W. C. CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (spreng.) pedersen] plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 87-99, 2014
- SANTOS, P. R.; CRUZ, A. C. F.; IAREMA, L.; KUKI, K. N.; OTONI, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, v. 55, n.4, p. 356-364, 2008
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012
- SILVA, J. A. T. DA; HOSSAIN, M. M.; SHARMA, M.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; SONGJUN, Z. E. N. G. Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, n. 3, p. 110-124, 2017a
- SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DA CUNHA, S. H. B.; LAZZARINI, L. E. S.; TAVARES, M. C.; PINTO, J. E. B. P. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 3, p. 501-510, 2017b
- SMITH, A. M.; STITT, M. Coordination of carbon supply and plant growth. **Plant, cell & environment**, v. 30, n. 9, p. 1126–1149, 2007
- TANAKA, Y.; SANO, T.; TAMAOKI, M.; NAKAJIMA, N.; KONDO, N.; HASEZAWA, S. Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 138, n. 4, p. 2337-2343, 2005
- TISARUM, R.; SAMPHUMPHUNG, T.; THEERAWITAYA, C.; PROMMEE, W.; CHA-UM, S. *In vitro* photoautotrophic acclimatization, direct transplantation and *ex vitro* adaptation of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 133, n. 2, p. 215-223, 2018
- WALTERS, R. G. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. **Journal of experimental botany**, v. 56, n. 411, p. 435–447, 2005
- WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2.ed. Viçosa: Ed UFV, 2013, 279p.
- XIÃO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n.2, p. 149-158, 2011
- YUAN, H.; ZHANG, J.; NAGESWARAN, D.; LI, L. Carotenoid metabolism and regulation in horticultural crops. **Horticulture research**, v. 2, e.15036, 2015

# QUALIDADE E INTENSIDADE DE LUZ NO DESENVOLVIMENTO DE MICROCEPAS *in vitro* DE *Eucalyptus urophylla* EM SISTEMA FOTOAUTOTRÓFICO

**Resumo** – A qualidade e a intensidade da luz são fatores importantes no controle do crescimento de plantas em cultivo em sistemas fotoautotróficos *in vitro*. O objetivo do trabalho foi avaliar, em microcepas de um clone de *Eucalyptus urophylla* mantidas em sistema fotoautotrófico *in vitro*, a influência da qualidade de luz, bem como de intensidades de luz fluorescente (60, 85, 100 e 140  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) no crescimento e produção de microestacas. Para qualidade de luz foram testadas lâmpadas fluorescentes (FL), lâmpadas de diodos emissores de luz (LED) branca (LB), LED vermelha (LV), LED azul (LA), LED vermelha/azul (LVA) e LED vermelho distante (LVD), todas com a mesma irradiância. A qualidade da luz influenciou significativamente o crescimento das plantas do clone avaliado. A produção inicial de microestacas foi prejudicada sob LB, mas após 35 dias de cultivo, a taxa de produção de brotações nesta condição foi semelhante às demais. Também em luz LB foi produzido maior quantidade de carotenoides. Luz FL, tradicionalmente utilizada em salas de crescimento, levou a maiores teores de celulose quando comparada às luzes LB e LVA. Porém, diferentes intensidades de luz FL não alteraram o crescimento das microcepas. No geral, a qualidade e as intensidades de luz testadas permitiram crescimento do clone de *E. urophylla* cultivado *in vitro*, possibilitando obtenção de microestacas sob cultivo fotoautotrófico.

**Palavras-chave:** Propagação *in vitro*, micropropagação, jardim clonal.

## 1. Introdução

A técnica de micropropagação traz inúmeras vantagens ao processo de produção de mudas de *Eucalyptus*, como a propagação massal de clones em curto espaço de tempo, maior controle nutricional, ambiental e fitossanitário, transporte do material clonal por grandes distâncias sem danos, armazenamento por longos períodos, retenção do vigor híbrido e rejuvenescimento/revigoramento do material vegetal (XAVIER et al., 2013).

Porém, a propagação *in vitro* ainda é um processo estressante para as plantas e apresenta algumas limitações como o alto custo de produção, a necessidade de

adaptação de protocolos e pouco investimento para desenvolvimento e inovação no processo de produção *in vitro* (KAUR; SANDHU, 2015; SHUKLA et al., 2017; NUNES et al., 2018). Com o objetivo de reduzir custos e melhorar a eficiência da produção e a qualidade das plantas lenhosas micropropagadas, a utilização de fontes de luz eficientes e sistema fotoautotrófico de cultivo têm surgido como importantes alternativas (ASSIS et al., 2016; BATISTA et al., 2018).

Com o avanço da tecnologia e a redução de preços de lâmpadas LED, há uma tendência para substituir as lâmpadas fluorescentes, visto essas fontes de luz serem mais versáteis e eficientes para regeneração e crescimento de plantas *in vitro*, oferecendo novas possibilidades para alcançar o sucesso na micropropagação em escala comercial (YEH; CHUNG, 2009; BIAN et al., 2015; MONTEUUIS, 2015; YEH et al. 2015; BATISTA et al., 2018). Diferentes estudos apontam melhor crescimento de plantas *in vitro* cultivadas sob condições de iluminação LED (HUNG et al., 2015; BATISTA et al., 2016; FERREIRA et al., 2017), porém avaliações do impacto das fontes de luz na morfogênese das espécies e clones de interesse para otimização de protocolos são necessários.

A intensidade e a qualidade da luz são os principais fatores que afetam a fotossíntese, que também tem efeitos sobre a forma da planta, seu desenvolvimento, floração e no metabolismo secundário (ALVARENGA et al., 2015; BASSOLINO et al., 2015; SINGH et al., 2015). Em baixa intensidade de luz a fotossíntese pode ser ineficiente e reduzir o crescimento, enquanto em excesso, a luz pode danificar estruturas fotossintéticas (SILVA et al., 2017).

Tradicionalmente, no sistema convencional de micropropagação, além de lâmpadas fluorescentes, utiliza-se recipientes fechados, caracterizados por elevada umidade relativa, elevada concentração de etileno e baixos níveis de CO<sub>2</sub>, além do fornecimento de altas concentrações de sacarose. Essas características podem causar alterações anatômicas, interferindo diretamente na taxa fotossintética das plantas *in vitro* e em seu processo de aclimação *ex vitro* (KOZAI et al., 2005; TANAKA et al., 2005; ARAGÓN et al., 2010; ALVAREZ et al., 2012). Assim, é possível reduzir os problemas criados pelo crescimento tradicional *in vitro*, possibilitando maiores intensidades luminosas, aumento da concentração de CO<sub>2</sub>, redução ou eliminação da concentração de sacarose e retirada de componentes orgânicos do meio de cultivo (NGUYEN; KOZAI, 2005; XIÃO et al., 2011). Em sistema fotoautotrófico as plantas

podem apresentar maior produtividade, e este pode ser usado para produzir em larga escala plântulas de qualidade (XIAO et al., 2011).

Nesse sentido, maior atenção deve ser dada para o controle eficiente de variáveis ambientais a fim de melhorar o desenvolvimento das plantas *in vitro*. O controle da iluminação deve ser incorporado ao desenvolvimento tecnológico relacionado a sistemas de micropropagação de plantas (KANIA; GIACOMELLI, 2000), inclusive em sistemas fotoautotróficos, a fim de superar as deficiências na produção em larga escala de plantas *in vitro* (GAGO et al. 2014; ARENCIBIA et al. 2017; SHUKLA et al. 2017). Mesmo com o recente avanço tecnológico das luzes LED, poucos estudos foram realizados com espécies lenhosas para investigar seus efeitos em comparação com lâmpadas fluorescentes na cultura *in vitro*.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de qualidade e intensidades de luz no crescimento de microcepas de um clone de *Eucalyptus urophylla in vitro* sob condições fotoautotróficas.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Material vegetal**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, localizada em Viçosa - MG.

Para a obtenção dos explantes (segmentos nodais) utilizados no presente trabalho, brotações contendo gemas diferenciadas de um clone de *Eucalyptus urophylla* foram alongadas em tubos de ensaio contendo 10 mL meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995), adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina), 0,25 mg L<sup>-1</sup> de AIB (ácido 3-indolbutírico) e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar.

Os segmentos nodais, retirados de gemas alongadas *in vitro*, contendo dois pares de folhas foram inoculados, para formação das microcepas *in vitro* (Figura 1), em frascos de vidro (250 mL de capacidade) contendo como substrato vermiculita de granulometria média e meio líquido JADS, adicionado de 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,25 mg L<sup>-1</sup> de AIB e 7 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Utilizou-se sacarose apenas na fase inicial de estabelecimento das microcepas. O meio

teve o pH ajustado para  $5,80 \pm 0,02$ . O substrato e o meio de cultura utilizados foram esterilizados em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e a uma temperatura de  $121^\circ\text{C}$  durante 20 minutos.

Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno (com taxa de troca de  $\text{CO}_2$  de  $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), e após 30 dias estas foram substituídas por tampas de polipropileno com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas MilliSeal (com taxa de troca de  $\text{CO}_2$  de  $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ ). Os frascos foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e irradiância de  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornecida por tubos fluorescentes. A cada 15 dias, após a troca de tampas, uma solução de meio JADS autoclavada, contendo macro e micronutrientes, e  $600 \mu\text{L L}^{-1}$  de cloro ativo, sem adição de sacarose, foi adicionada nos frascos contendo as microcepas.

Antes da instalação dos experimentos, foi realizada uma poda nas microcepas formadas, para retirada de brotações maiores que 2 cm e para estimular a brotação das gemas axilares na porção remanescente.



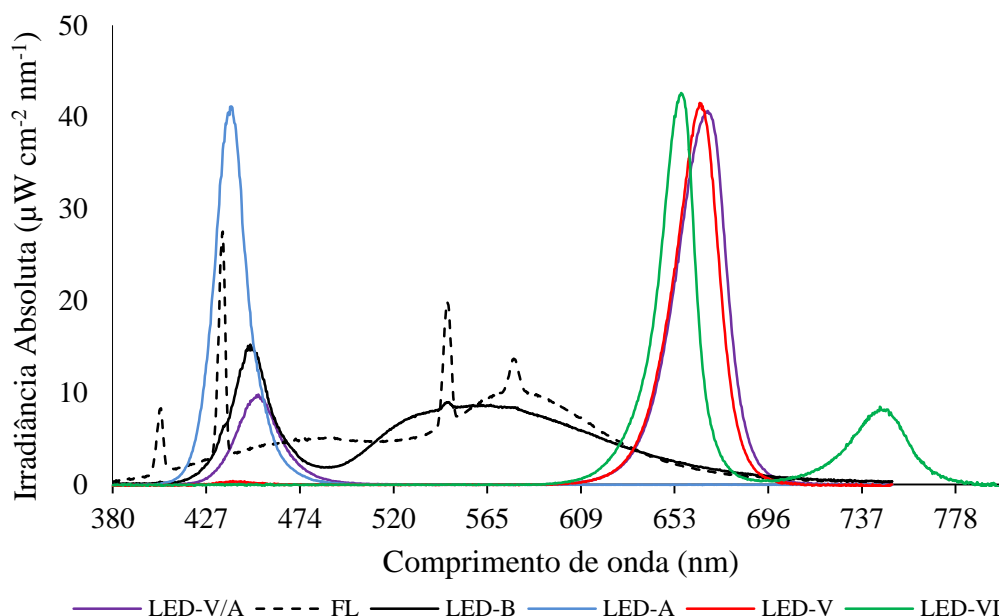
**Figura 1.** Microcepa de *Eucalyptus urophylla* formada *in vitro*. Barra = 1 cm.

## 2.2. Qualidade de luz

Utilizou-se no estudo microcepas *in vitro* com 60 dias de formação, que foram mantidas em sala de cultura sob fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e irradiância de  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornecida por 6 fontes de luz: LED Branco (SMD 100, 18 W, Vilux, Vitória, ES, Brasil), LED Vermelho/Azul (LabPAR LL-HR/DB-480,



11.6 W) (LabLumens, Carapicuíba, SP, Brasil), LED Azul (Labpar LL HR/dB 480, LabLumens), LED Vermelho Distante (Led Tec-LUX, Tecnal, Piracicaba, Brasil) e tubos fluorescentes (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil), conforme distribuições espectrais apresentadas na Figura 2.



**Figura 2.** Emissão espectral absoluta das fontes de luz Fluorescente (FL), LED branca (LED-B), LED vermelho/azul (LED-V/A), LED azul (LED-A), LED vermelho (LED-V), LED vermelho distante (LED-VD).

### 2.3. Intensidade de luz

Para testar o efeito das intensidades de luz 60, 85, 100 e 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  no cultivo *in vitro*, frascos contendo microcepas de um clone de *Eucalyptus urophylla*, com 130 dias de formação, foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , utilizando-se lâmpadas fluorescentes (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil).

### 2.4. Análise de crescimento

Para avaliar a qualidade de luz, após 15 dias de cultivo foram retiradas e contabilizadas das microcepas, brotações acima de 2 cm de comprimento (microestacas). Após 35 dias de cultivo, avaliou-se, além do número de microestacas, o número de brotações acima de 0,5 cm (NB) e o tamanho da maior brotação.

Na avaliação de intensidade luminosa, a cada 7 dias, durante 28 dias, foram coletadas e contabilizadas as microestacas produzidas.

## **2.5. Análise de pigmentos fotossintéticos**

Nos testes de qualidade e intensidade luminosa, ao final do tempo de cultivo (35 dias) sob as diferentes qualidades de luz, e sob as diferentes intensidades luminosas (28 dias), foram retirados cinco discos foliares (5 mm de diâmetro), da segunda folha expandida a partir do meristema apical, e inoculados em 5 mL de solução de DMSO (saturado com carbonado de cálcio) por 48 horas no escuro (SANTOS et al, 2008). A absorvância das amostras foi determinada em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico, em espectrofotômetro Genesys 10UV (ThermoScientific, EUA). Os comprimentos de ondas (665, 649 e 480 nm) e as equações para o cálculo das concentrações de clorofilas a, b e carotenoides totais foram baseados no método descrito por Wellburn (1994).

## **2.6. Quantificação de celulose**

A parede celular foi extraída de acordo com Van Acker et al. (2013) utilizando 10 mg de material da parte aérea (brotações emitidas) liofilizada. Com o resíduo da parede celular a composição da matriz de polissacarídeos foi estabelecida após tratamento com um ácido fraco (TFA 2M – ácido trifluoracético). O teor de celulose foi obtido por ensaio colorimétrico para determinação de glicose, calculado com base na absorvância 493 nm, baseado em curva padrão de glicose.

## **2.7. Delineamento experimental e análise de dados**

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis e quatro tratamentos para os experimentos de qualidade e intensidade de luz, respectivamente. Cada tratamento apresentava 10 repetições (microcepas). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste Tukey em nível de 5% de significância. A análise dos dados foi realizada no software estatístico R versão 3.5.0 (R CORE TEAM, 2018), utilizando o pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA et al., 2013).

### 3. Resultados

#### 3.1. Qualidade de luz

O número de microestacas coletadas aos quinze dias de cultivo foi afetado pela qualidade de luz sob a qual as microcepas foram cultivadas ( $p < 0,05$ ). Sob lâmpadas Fluorescente, LED azul e LED vermelho distante houve maior produção de microestacas quando comparadas às microcepas mantidas em LED branca (Tabela 1).

**Tabela 1.** Valores médios para o número de microestacas coletadas por microcepa, aos 15 dias de cultivo, de um clone de *Eucalyptus urophylla* em diferentes qualidades de luz.

Qualidade de luz	Número de microestacas/microcepa
LED azul	4,0 a
Fluorescente	4,0 a
LED vermelho distante	3,6 a
LED vermelho/azul	3,4 ab
LED vermelha	3,0 ab
LED branca	1,0 b

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

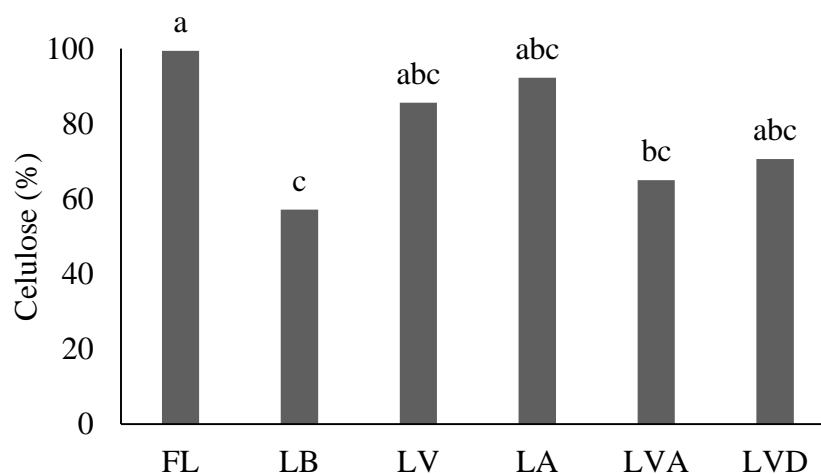
Após 35 dias de cultivo das microcepas sob diferentes qualidades de luz, foi observada diferença significativa para número de brotações maiores que 0,5 cm. As quantidades de clorofila b, carotenoides e teor de celulose também foram influenciados pelos tratamentos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores médios para número de brotações maiores que 0,5 cm (NB), clorofila a, clorofila b e carotenoides aos 35 dias de cultivo de microcepas de um clone de *Eucalyptus urophylla* sob luzes fluorescente (FL), LED branca (LB), LED vermelha (LV), LED azul (LA), LED vermelho/azul (LVA) e LED vermelho distante (LVD).

Fonte de Luz	NB	Clorofila a ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	Clorofila b ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	Carotenoides ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )
FL	9,8 ab	27,6 ab	12,5 a	4,9 b
LB	12,6 a	32,4 a	12,6 a	5,9 a
LV	12,6 a	26,7 b	11,1 ab	4,7 b
LA	8,2 b	23,4 b	9,3 b	4,2 b
LVA	9,8 ab	27,3 ab	11,3 ab	4,9 b
LVD	9,6 ab	26,0 b	10,0 ab	4,7 b

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

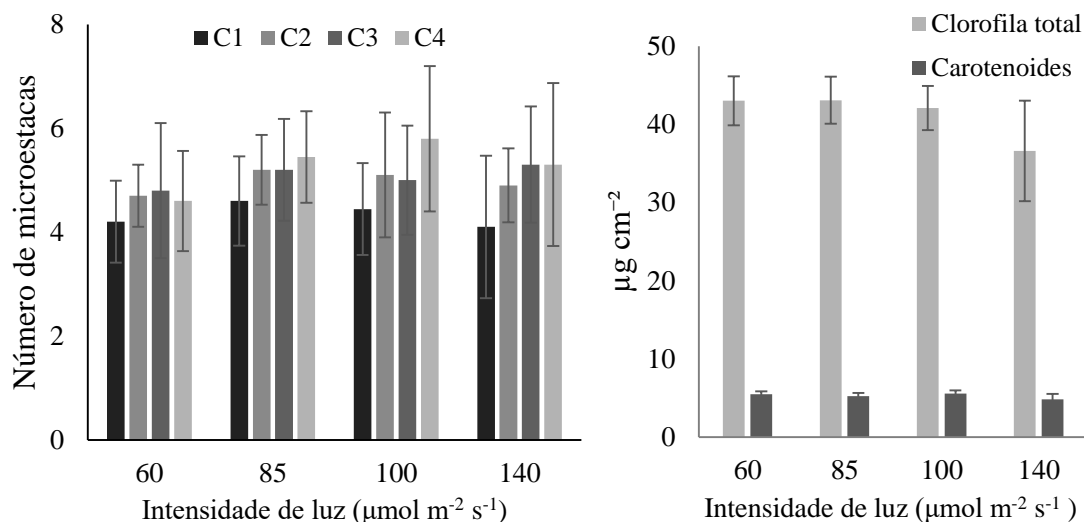
Microcepas mantidas em LED azul produziram menor número de brotações maiores que 0,5 cm e menor quantidade de clorofila a e b, quando comparadas à luz LED branca, onde houve menor produção de carotenoides. Nas folhas das microcepas mantidas sob lâmpadas LED vermelho e vermelho distante também foram observadas menor quantidade de clorofila a. Para a quantificação de celulose nos tecidos, maiores valores foram encontrados nas microcepas cultivadas em luz fluorescente em comparação às luzes LED branca e vermelho/azul (Figura 3). O número médio de microestacas obtido aos 35 dias de cultivo foi de 5,7 e as maiores brotações apresentaram, em média, comprimento de 5,6 cm.



**Figura 3.** Teores de celulose em massa seca de parede celular de um clone de *Eucalyptus urophylla* sob luzes fluorescente (FL), LED branca (LB), LED vermelha (LV), LED azul (LA), LED vermelho/azul (LVA) e LED vermelho distante (LVD). Letras diferentes identificam diferença entre si pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

### 3.2. Intensidade de luz

Entre as intensidades luminosas não foi observada diferença significativa para as características avaliadas (número de microestacas produzidas e quantidade de pigmentos fotossintéticos). O número médio de microestacas coletadas por microcepa após 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo foi de 4,3, 4,9, 5,0 e 5,2 respectivamente (Figura 4)



**Figura 4.** Número médio de microestacas produzidas por microcepas (a) e quantidade de clorofila total e carotenoides em folhas (b) de clone de *Eucalyptus urophylla* em resposta a diferentes intensidades de luz fluorescente, em 28 dias de cultivo. C1, C2, C3 e C4 representam as coletas semanais 1, 2, 3 e 4 respectivamente.

#### 4. Discussão

Os dados do presente estudo mostraram que a diferença na qualidade da luz possibilita diferentes respostas no crescimento *in vitro* do clone de *Eucalyptus urophylla*. As diferenças observadas no número de brotações emitidas podem estar relacionadas com os níveis endógenos de citocininas, que estimulam a multiplicação de gemas. A luz influencia as concentrações de reguladores de crescimento em plantas vasculares, e age como um sinal morfogênico no desencadeamento do crescimento de brotos, sendo que os passos iniciais na via de sinalização da luz envolvem citocininas (STIRK et al. 2014; ROMAN et al. 2016).

A luz azul é necessária durante o crescimento das plantas, para obter normal funcionamento fotossintético e medeia respostas foliares (HOGEWONING et al., 2012). A região do azul do espectro de luz (450 a 500 nm) também pode agir na inibição do alongamento do caule e no decréscimo na taxa de crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2013). A menor taxa de produção de brotações em microcepas do clone de *E. urophylla* foi obtida quando cultivadas sob luz azul, porém sem prejuízo no alongamento dos brotos.

Maiores níveis de pigmentos fotossintéticos em plantas cultivadas sob combinações de luzes azuis e vermelhas podem ser esperados devido ao fato dessas regiões do espectro visível da luz serem as mais usadas pelas plantas (MCCREE,

1971). Os pigmentos fotossintéticos primários em plantas superiores, clorofilas a e b, têm absorção nas regiões azul e vermelha, sendo que as regiões do azul, vermelho e vermelho distante desempenham papéis-chave no processo de controle da morfologia das plantas (RAJAPAKSE; SHAHAK, 2007).

Dentre as fontes de luz testadas neste estudo, a LED azul, LED vermelho e LED vermelho distante foram as que apresentaram menores valores de clorofila a. De acordo com a emissão espectral absoluta apresentada na Figura 2, essas fontes luminosas não apresentam um balanço de irradiância nas regiões do vermelho e do azul. No cultivo de *Withania somnifera* maior teor de clorofila e maior crescimento foi observado sob luz fluorescente e em mistura de LEDs azul com vermelho, quando comparados com resultados obtidos sob luzes monocromáticas (LEE et al., 2007). Plântulas de *oncidium* apresentaram maior teor de pigmentos sob LED azul quando comparadas ao LED amarelo e verde, ou lâmpadas fluorescentes (MENGXI et al., 2011). Para diferentes quimiotipos de *Lippia alba in vitro* os níveis de pigmentos fotossintéticos foram maiores nas plantas cultivadas sob LED vermelho/azul (BATISTA et al., 2016).

Os carotenoides desempenham um papel importante durante a fotossíntese, protegendo o fotossistema da foto-oxidação. A biossíntese de carotenoides é influenciada pela qualidade, intensidade da luz e fotoperíodo, e nem todos os comprimentos de onda de luz são necessários para uma igual eficiência (WU et al., 2007). Em *Fagopyrum tataricum* as quantidades de carotenoides em brotos expostos à luz LED branca foram relativamente maiores do que aqueles em brotos tratados com LED azul e LED vermelha (TUAN et al., 2013). Estes resultados corroboram com os encontrados no presente trabalho, onde maior quantidade de carotenoides foi obtida em LED branca. Porém, efeitos de diferentes comprimentos de onda de luz na biossíntese de carotenoide pode depender dos tecidos e plantas examinados (TUAN et al., 2013).

Segundo Mamedes-Rodrigues et al. (2018), diferença na qualidade de luz induziu mudanças na expressão de genes associados à via da celulose e conseqüentemente na deposição de celulose na parede celular, bem como na altura de plantas de *Brachypodium distachyon* cultivadas *in vitro*. Menores alturas e menor porcentagem de celulose foram obtidas com o uso de LED vermelho/azul. Ainda segundo os autores, os resultados sugerem que o padrão de deposição e lignificação da parede celular pode ser regulado por estímulos luminosos durante condições de cultivo

*in vitro*. Para as microcepas do clone de *E. urophylla* a qualidade de luz também influenciou o teor de celulose presente na parede celular, sendo encontrada maior quantidade com o uso de luz fluorescente quando comparada à luz LED branca.

Apesar da qualidade de luz ser fator importante no cultivo *in vitro*, ainda são poucos estudos envolvendo seu efeito em espécies lenhosas e incluindo lâmpadas LED. Em estudo com *Populus euramericana*, combinação de LED vermelha e azul produziu a maior porcentagem de regeneração de brotos em comparação às luzes monocromáticas ou fluorescente. No entanto, a luz influenciou a morfogênese de maneira dependente do genótipo (KWON et al., 2015). Lâmpadas LED com diferentes comprimentos de onda, podem ser usadas sozinhas ou combinadas para otimizar a fotossíntese (SINGH et al., 2015; SHENGXIN et al., 2016). Muitos trabalhos mostram a superioridade de lâmpadas LED no desenvolvimento *in vitro* de plantas quando comparadas à luzes fluorescentes (BATISTA et al., 2018), porém, não há um padrão de resposta. A resposta à luz é dependente do genótipo (ZIENKIEWICZ et al. 2015). No presente estudo, a luz fluorescente também permitiu crescimento de microcepas do clone de *E. urophylla* na condição *in vitro*.

Além da qualidade de luz, outro fator que afeta o crescimento das plantas é a intensidade luminosa (ALVARENGA et al., 2015). O controle da quantidade de luz sob o cultivo de plantas é importante pois em baixa intensidade a fotossíntese pode ser ineficiente e reduzir o crescimento, enquanto em excesso, a luz pode danificar estruturas fotossintéticas (SILVA et al., 2017). Plantas de *Withania somnifera* cultivadas sob diferentes intensidades luminosas (15, 30, 60 e 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) tiveram seu crescimento e fisiologia afetados. Foi observado maior crescimento de brotações sob 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e, aumentando a intensidade luminosa até 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  houve maior produção de clorofilas e carotenoides, densidade estomática, taxa de fotossíntese e transpiração, condutância estomática, e eficiência do uso da água (LEE et al., 2007). Singh et al. (2017) avaliaram desenvolvimento de plântulas de *Acer saccharum in vitro* cultivadas em três intensidades de luzes vermelho/azul e branca. Intensidades mais altas aumentaram biomassa, porém, segundo os autores, a acumulação de antocianinas nos tecidos, redução do teor de clorofila e aumento do estresse fisiológico, indicaram danos induzidos nos tecidos sob maiores intensidades de luz. No presente estudo, as plantas cultivadas nas intensidades de luz testadas apresentaram semelhantes valores nas características avaliadas, sem apresentar sinais de prejuízo no crescimento. Intervalos maiores de intensidade luminosa podem ser

testados a fim de verificar sua influência no crescimento *in vitro* de microcepas do clone de *E. urophylla*.

No estabelecimento de sistemas fotoautotróficos, tanto a qualidade quanto a intensidade de luz devem ser consideradas. Na análise do cultivo *in vitro* de *Mouriri elliptica* sob condições que estimulam o comportamento fotoautotrófico, plantas foram cultivadas na presença e ausência de sacarose e submetidas à diferentes intensidades luminosas. Com o aumento da intensidade da luz a suplementação do meio com sacarose tornou-se desnecessária (ASSIS et al., 2016). Em *Castanea sativa* o uso de ventilação nos frascos de cultura e o aumento da irradiância luminosa melhoraram o desempenho das brotações e a capacidade fotossintética em relação à cultura tradicional *in vitro* (SÁEZ et al., 2012). O conhecimento da relação entre a qualidade de luz e o padrão de crescimento das plantas *in vitro* fornece uma base para desenvolvimento de protocolos mais eficientes de cultivo *in vitro*, permitindo assim o planejamento de propagação em larga escala.

## 5. Conclusões

- Microestacas podem ser obtidas a partir de microcepas do clone de *Eucalyptus urophylla* mantidas em sistema fotoautotrófico *in vitro*;
- Lâmpadas fluorescentes e lâmpadas LED podem ser utilizadas no cultivo *in vitro*, sem prejuízo no desenvolvimento de brotações destinadas à obtenção de microestacas;
- Intensidades luminosas entre 60 e 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  promoveram, sem diferença, crescimento de microcepas de clone de *Eucalyptus urophylla in vitro*.

## 6. Referências bibliográficas

ALVARENGA, I. C. A.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, n. 2, p. 299–308, 2015

ALVAREZ, C.; SÁEZ, P.; SÁEZ, K.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 1, p. 93–101, 2012



ARAGÓN, C.; CARVALHO, L.; GONZÁLEZ, J.; ESCALONA, M.; AMÂNCIO, M. *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 237-244, 2010

ARENCIBIA, A. D.; GÓMEZ, A.; POBLETE, M.; VERGARA, C. Highperformance micropropagation of dendroenergetic poplar hybrids in photomixotrophic temporary immersion bioreactors (TIBs). **Industrial crops and products**, v. 96, p. 102–109, 2017

ASSIS, E. S.; RUBIO NETO, A.; DE LIMA, L. R.; SILVA, F. G.; ROSA, M.; VASCONCELOS FILHO, S. C.; LEITE, M. S. *In vitro* culture of *Mouriri elliptica* (Mart.) under conditions that stimulate photoautotrophic behavior. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, n. 2, p. 229-236, 2016

BASSOLINO, L.; GIACOMELLI, E.; GIOVANELLI, S.; RUFFONI, B. Tissue culture and aromatic profile in *Salvia dolomitica* Codd. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, n. 1, p. 83–95, 2015

BATISTA, D. S.; CASTRO, K. M.; SILVA, A. R.; TEIXEIRA, M. L.; SALES, T. A.; SOARES, L. I.; CARDOSO, M. G.; SANTOS, M. O.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. C. Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 52, n.3, p. 276–282, 2016

BATISTA, D. S.; FELIPE, S. H. S.; SILVA, T. D.; DE CASTRO, K. M.; MAMEDES-RODRIGUES, T. C.; MIRANDA, N. A.; RÍOS-RÍOS, A. M.; FARIA, D. V.; FORTINI, E. A.; CHAGAS, K.; TORRES-SILVA, G.; XAVIER, A.; ARENCIBIA, A. D.; OTONI, W. C. Light quality in plant tissue culture: does it matter? **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, n. 3, p. 195-215, 2018

BIAN, Z. H.; YANG, Q. C.; LIU, W. K. Effects of light quality on the accumulation of phytochemicals in vegetables produced in controlled environments: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 5, p. 869–877, 2015

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

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes: Experimental Designs package**. R package version 1.1.2, 2013

FERREIRA, L. T.; DE ARAÚJO SILVA, M. M.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R.; WILLADINO, L. Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 1, p. 211-221, 2017

GAGO, J.; MARTÍNEZ-NÚÑEZ, L.; LANDÍN, M.; FLEXAS, J.; GALLEGO, P. P. Modeling the effects of light and sucrose on *in vitro* propagated plants: a multiscale system analysis using artificial intelligence technology. **PLoS One**, v. 9, e85989, 2014

HOGEWONING, S. W.; WIJNTJES, E.; DOUWSTRA, P.; TROUWBORST, G.; VAN LEPEREN, W.; CROCE, R.; HARBINSON, J. Photosynthetic quantum yield dynamics: from photosystems to leaves. **The plant cell**, v. 24, n. 5, p. 1921-1935, 2012

HUNG, C. D.; HONG, C. H.; JUNG, H. B.; KIM, S. K.; VAN KET, N.; NAM, M. W.; CHOI, D. H.; LEE, H. I. Growth and morphogenesis of encapsulated strawberry shoot tips under mixed LEDs. **Scientia Horticulturae**, v. 194, p. 194-200, 2015

KANIA, S. T.; GIACOMELLI, G. A. Environmental control for improved plant quality within controlled environment plant production systems. In: KUBOTA, C.; CHUN, C. (eds) **Transplant production in the 21st century**. Springer, Dordrecht, p. 72-77, 2000

Kaur A, Sandhu JS (2015) High throughput *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from spindle leaf roll segments: cost analysis for Agri-business industry. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 120:339–350

KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Springer (eds), 2005, 307p.

KWON, A. R.; CUI, H. Y.; LEE, H.; SHIN, H.; KANG, K. S.; PARK, S. Y. Light quality affects shoot regeneration, cell division, and wood formation in elite clones of *Populus euramericana*. **Acta physiologiae plantarum**, v. 37, n. 3, p. 65-74, 2015

LEE, S. H.; TEWARI, R. K.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal. Plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 2, p. 141-151, 2007

MAMEDES-RODRIGUES, T. C.; BATISTA, D. S.; NAPOLEÃO, T. A.; CRUZ, A. C. F.; FORTINI, E. A.; NOGUEIRA, T. S.; ROMANEL, E.; OTONI, W. C. Lignin and cellulose synthesis and antioxidative defense mechanisms are affected by light quality in *Brachypodium distachyon*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 133, n. 1, p. 1-14, 2018

MCCREE, K. J. The action spectrum, absorptance and quantum yield of photosynthesis in crop plants. **Agricultural Meteorology**, v. 9, p. 191-216, 1971

MENGXI, L.; ZHIGANG, X.; YANG, Y.; YIJIE, F. Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, n. 1, p. 1-10, 2011

MONTEUUIS, O. Micropropagation and production of forest trees. In: PARK, Y. S.; BONGA, J. M.; MOON, H. K. (eds) **Vegetative propagation of forest trees**. National Institute of Forest Science (NIFoS), Seoul, p. 32-55, 2015.

NGUYEN, Q. T.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. (ed) **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Springer Netherlands, Dordrecht, p. 123-146, 2005

NUNES, S.; SOUSA, D.; PEREIRA, V. T.; CORREIA, S.; MARUM, L.; SANTOS, C.; DIAS, M. C. Efficient protocol for *in vitro* mass micropropagation of slash pine. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, n. 2, p. 175-183, 2018

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018

RAJAPAKSE, N. C.; SHAHAK, Y. Light-quality manipulation by horticulture industry. In: WHITELAM, G. C.; HALLIDAY, K. J. (ed) **Light and plant development** - Annual Plant Reviews Volume 30. Oxford: Blackwell, 2007, p. 290-312

ROMAN, H.; GIRAULT, T.; BARBIER, F.; PÉRON, T.; BROUARD, N.; PĚNČÍK, A.; NOVÁK, O.; VIAN, A.; SAKR, S.; LOTHIER, J.; LE GOURRIEREC, J. Cytokinins are initial targets of light in the control of bud outgrowth. **Plant physiology**, v. 172, n. 1, p. 489-509, 2016

SÁEZ, P. S.; BRAVO, L. A.; LATSANGUE, M. I.; SANCHEZ, M. E.; RIOS, D. G. Increased light intensity during *in vitro* culture improves water loss control and photosynthetic performance of *Castanea sativa* grown in ventilated vessels. **Scientia Horticulturae**, v. 138, p. 7-16, 2012

SANTOS, P. R.; CRUZ, A. C. F.; IAREMA, L.; KUKI, K. N.; OTONI, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, v. 55, n.4, p. 356-364, 2008

SHENGXIN, C.; CHUNXIA, L.; XUYANG, Y.; SONG, C.; XUELEI, J.; XIAOYING, L.; ZHIGANG, X.; RONGZHAN, G. Morphological, photosynthetic, and physiological responses of rapeseed leaf to different combinations of red and blue lights at the rosette stage. **Frontiers in plant science**, v. 7, n. 1144, 2016

SHUKLA, M. R.; SINGH, A. S.; PIUNNO, K.; SAXENA, P. K.; JONES, A. M. P. Application of 3D printing to prototype and develop novel plant tissue culture systems. **Plant Methods**, v. 13, p. 6-15, 2017

SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DA CUNHA, S. H. B.; LAZZARINI, L. E. S.; TAVARES, M. C.; PINTO, J. E. B. P. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 3, p. 501-510, 2017b

SINGH, A. S.; JONES, A. M. P.; SHUKLA, M. R.; SAXENA, P. K. High light intensity stress as the limiting factor in micropropagation of sugar maple (*Acer saccharum* marsh.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 2, p. 209-221, 2017

SINGH, D.; BASU, C.; WOLLWEBER, M. M.; ROTH, B. LEDs for energy efficient greenhouse lighting. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 139-147, 2015

STIRK, W. A.; BÁLINT, P.; TARKOWSKÁ, D.; NOVÁK, O.; MARÓTI, G.; LJUNG, K.; TURECKOVÁ, V.; STRNAD, M.; ÖRDÖG, V.; VAN STADEN, J.

Effect of light on growth and endogenous hormones in *Chlorella minutissima* (Trebouxiophyceae). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 79, p. 66-76, 2014

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, 918p.

TANAKA, Y.; SANO, T.; TAMAOKI, M.; NAKAJIMA, N.; KONDO, N.; HASEZAWA, S. Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 138, n. 4, p. 2337-2343, 2005

TUAN, P. A.; THWE, A. A.; KIM, Y. B.; KIM, J. K.; KIM, S. J.; LEE, S.; CHUNG, S. O.; PARK, S. U. Effects of white, blue, and red light-emitting diodes on carotenoid biosynthetic gene expression levels and carotenoid accumulation in sprouts of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 50, p. 12356–12361, 2013

VAN ACKER, R.; VANHOLME, R.; STORME, V.; MORTIMER, J. C.; DUPREE, P.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n.1, p. 46, 2013

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994

WU, M. C.; HOU, C. Y.; JIANG, C. M.; WANG, Y. T.; WANG, C. Y.; CHEN, H. H.; CHANG, H. M. A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1753-1758, 2007

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2.ed. Viçosa: Ed UFV, 2013

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 2, p. 149-158, 2011

YEH, N.; CHUNG, J. P. High-brightness LEDs-energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 8, p. 2175-2180, 2009

YEH, N.; DING, T. J.; YEH, P. Light-emitting diodes' light qualities and their corresponding scientific applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 55-61, 2015

ZIENKIEWICZ, M.; DROZAK, A.; WASILEWSKA, W.; BACŁAWSKA, I.; PRZEDPEŁSKA-WASOWICZ, E.; ROMANOWSKA, E. The short-term response of *Arabidopsis thaliana* (C3) and *Zea mays* (C4) chloroplasts to red and far red light. **Planta**, v. 242, n. 6, p.1479-1493, 2015

## APLICABILIDADE DO JARDIM CLONAL *in vitro* NA PROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus urophylla*

**Resumo** - O jardim clonal na condição *in vitro* tem como proposta contornar algumas dificuldades na propagação vegetativa encontradas no minijardim clonal localizado no viveiro florestal, agregando à técnica convencional de produção de mudas pela miniestaquia as vantagens da propagação *in vitro*. Nesse sentido, no presente estudo faz-se um comparativo de produtividade de minicepas/microcepas de clone de *Eucalyptus urophylla* em dois sistemas de cultivo: minijardim clonal localizado na condição *ex vitro* e o jardim clonal *in vitro* localizado em um laboratório de cultura de tecidos, sendo realizadas avaliações quanto a produção de brotações, enraizamento e sobrevivência de miniestacas/microestacas. A produção de miniestacas/microestacas por minicepas/microcepas foi semelhante, porém sendo maior a produtividade por área no sistema de jardim clonal *in vitro*. Em ambos os sistemas foi observada alta taxa de sobrevivência e enraizamento das mudas em viveiro. Contudo, o sistema de jardim clonal *in vitro* visa proporcionar uma nova forma de propagar plantas vegetativamente, o qual deve ser melhor estudado e aprimorado para tornar-se alternativa ao minijardim clonal para produção de mudas clonais de *Eucalyptus*.

**Palavras-chave:** Propagação vegetativa, micropropagação, miniestaquia e microestaquia.

### 1. Introdução

O sucesso da produtividade nos plantios de *Eucalyptus* no Brasil tem sido função da combinação de diversos fatores, entre os quais podem ser citados os programas de silvicultura clonal bem estabelecidos, as estratégias de melhoramento genético em constante desenvolvimento, a produção de híbridos específicos e a seleção de clones elite, assim como o avanço das tecnologias da propagação clonal na produção de mudas (FERRARI et al., 2004; XAVIER et al., 2013).

Sendo assim, a evolução das técnicas de propagação, aliada ao processo produtivo e ao desenvolvimento da ciência, é necessária para alcançar os objetivos almejados na multiplicação e preservação do material genético selecionado. Portanto, o conhecimento de algumas áreas da propagação de plantas é considerado

imprescindível ao bom desempenho no processo de multiplicação (XAVIER et al., 2013).

Dentre as técnicas de propagação vegetativa, a estaquia constitui-se em uma das principais na propagação de clones selecionados visando atender aos objetivos da silvicultura clonal. No Brasil esta técnica foi aperfeiçoada para contornar dificuldades como a obtenção de material vegetativo com grau de juvenilidade e vigor fisiológico adequado ao enraizamento de estacas, além de contornar dificuldades de manutenção das áreas de coletas das mesmas. Assim, o processo culminou no desenvolvimento da miniestaquia e no uso da micropropagação para desenvolvimento da microestaquia (XAVIER; COMÉRIO, 1996; ALFENAS et al., 2009), ambas técnicas, direcionadas para a otimização da clonagem de explantes oriundos de árvores adultas (DEL PONTE et al., 2001).

Atualmente, para produção de mudas do gênero *Eucalyptus*, o método mais utilizado para a clonagem de genótipos superiores por praticamente todas as empresas florestais tem sido a miniestaquia (FERREIRA et al., 2004; XAVIER et al., 2013). A produtividade de miniestacas por este sistema está intimamente ligada às condições de manejo adotado, ao tempo de cultivo, ao genótipo utilizado, aos aspectos ambientais e às condições nutricionais. O desequilíbrio desses aspectos afetam diretamente as minicepas, resultando muitas vezes em perda do vigor fisiológico e na formação de propágulos com baixos índices de enraizamento (MALAVASI, 1994; CUNHA et al., 2009).

A técnica de micropropagação, como ferramenta de produção de microestacas, tem sido relatada como aquela que traz inúmeras vantagens ao processo de produção de mudas de *Eucalyptus*, como a propagação massal de clones em curto espaço de tempo, maior controle nutricional, ambiental e fitossanitário, transporte do material clonal por grandes distâncias sem danos, armazenamento por longos períodos, retenção do vigor híbrido e rejuvenescimento/revigoração do material vegetal (BISHT et al., 1999; HARTMANN et al., 2011; XAVIER et al., 2013). Além disso, os problemas de enraizamento de estacas, principalmente observados em árvores adultas devido à alta produção de inibidores ao enraizamento, metabólitos secundários e fenóis, podem ser minimizados ou até solucionados pelo emprego da micropropagação como técnica de rejuvenescimento/revigoração do material clonal (JOSHI et al., 2003).

A propagação *in vitro* ainda é um processo estressante para as plantas, assim como ainda possui limitações técnicas e econômicas para uso em escala comercial de produção de mudas clonais de *Eucalyptus*. O alto custo de produção, a necessidade de adaptação de protocolos e pouco investimento para desenvolvimento e inovação no processo de produção *in vitro* são alguns fatores que dificultam a aplicação em larga escala (KAUR; SANDHU, 2015; SHUKLA et al., 2017; NUNES et al., 2018). Além disso, plantas com capacidade de sobrevivência limitada são frequentemente produzidas após sua transferência para condições *ex vitro* (CHANDRA et al., 2010; DIAS et al., 2014). Assim, o desenvolvimento de novos sistemas de controle ambiental *in vitro* tem sido mencionado como necessário para superar as dificuldades na produção *in vitro* em larga escala de plantas de alta qualidade (GAGO et al., 2014; ARENCIBIA et al., 2017; SHUKLA et al., 2017).

Até o momento, a relação entre a técnica de micropropagação e o jardim clonal é relatada apenas na formação de plantas para gerar microcepas, e estas são também mantidas em viveiro, assim como no sistema de minijardim clonal (BRONDANI et al., 2012a; CORREIA et al., 2015). A proposta de um jardim clonal *in vitro* para produção de microestacas surge como uma alternativa ao sistema de produção de miniestacas atualmente adotados nos sistemas de produção de mudas clonais pela miniestaquia. O jardim clonal *in vitro* consiste num sistema de produção de mudas clonais em condições *in vitro*, onde das microcepas formadas (mantidas sob condições assépticas, com temperatura, luminosidade e fotoperíodo controlados) são coletadas microestacas e estas são levadas às condições *ex vitro* (viveiro) para formação da muda.

Assim, objetiva-se com o trabalho comparar o sistema convencional de minijardim clonal em viveiro com um novo sistema de jardim clonal *in vitro* proposto quanto a produtividade de propágulos vegetativos para produção de mudas de um clone de *Eucalyptus urophylla*.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Formação do jardim clonal *in vitro***

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agricultura (BIOAGRO) e no Viveiro de Pesquisas do

Departamento de Engenharia Florestal, ambos da Universidade Federal de Viçosa, localizado em Viçosa – MG.

Segmentos nodais foram obtidos pelo cultivo de brotações, contendo gemas diferenciadas, de um clone de *Eucalyptus urophylla* em tubos de ensaio contendo 10 mL meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995), adicionado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina), 0,25 mg L<sup>-1</sup> de AIB (ácido 3-indolbutírico) e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar.

Para formação das microcepas *in vitro* (Figura 1b), segmentos nodais de 3 cm com dois pares de folhas, proveniente das brotações alongadas *in vitro*, foram inoculados em frascos de vidro (250 mL de capacidade) contendo como substrato vermiculita de granulometria média e meio de cultura líquido JADS, adicionado de 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP, 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,25 mg L<sup>-1</sup> de AIB e 7 g L<sup>-1</sup> de sacarose, com pH ajustado para 5,80±0,02. O substrato e o meio de cultura utilizados foram esterilizados em autoclave com pressão de 1,5 atm e temperatura de 121°C durante 20 minutos.

Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno (com taxa de troca de CO<sub>2</sub> de 14 µL L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>), e após 30 dias estas foram substituídas por tampas de polipropileno com um orifício (10 mm) coberto com membrana MilliSeal (com taxa de troca de CO<sub>2</sub> de 21 µL L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>). Foi realizada uma poda de formação das microcepas (para retirada de brotações maiores que 2 cm e para estimular a brotação das gemas axilares na porção remanescente) e, a cada 15 dias, uma solução de meio JADS autoclavada, contendo macro e micronutrientes, e 600 µL L<sup>-1</sup> de cloro ativo (2,5%), era adicionada nos frascos contendo as microcepas.

Microcepas com 180 dias de idade foram utilizadas para compor o jardim clonal *in vitro* (Figura 1a), o qual foi mantido em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 25±2°C e irradiância de 70 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fornecida por tubos fluorescentes (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil). O espaçamento entre microcepas foi de 7,1 x 8,3 cm, totalizando 168 plantas por m<sup>2</sup>.

## **2.2. Formação do minijardim clonal *ex vitro***

O trabalho foi conduzido no Viveiro de Pesquisas do Departamento de Engenharia Florestal da UFV. Brotações com cerca de 3 cm (microestacas) foram coletadas *in vitro* (microcepas) cultivadas em frascos de vidro (250 mL de capacidade)



com membrana para troca gasosa, tendo como substrato vermiculita de granulometria média e meio líquido JADS. As microestacas coletadas foram transferidas para o viveiro e plantadas em tubetes plásticos de 55 cm<sup>3</sup> de capacidade, contendo substrato comercial (Tropstrato Vida Verde) e vermiculita de granulometria média, na proporção de 2:1.

Após serem estaqueadas, as microestacas foram acondicionadas em casa de vegetação climatizada (temperatura de 20 a 30 °C e umidade relativa do ar  $\geq 80$  %). Nos primeiros 15 dias em casa de vegetação, foi mantida uma cobertura com Aluminet (50 %) sobre as microestacas, a 20 cm de altura sobre os recipientes. Após 30 dias de permanência na casa de vegetação, o material foi transferido para casa de sombra, sendo realizada adubação de cobertura, constituída pela aplicação de 2 mL por muda de solução de fosfato monoamônico (MAP), na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>. As mudas permaneceram em casa de sombra (50 % de sombreamento) por 30 dias, sendo em seguida transferidas para pleno sol, aplicando 5 mL por muda de solução do formulado NPK 20-5- 20 (Heringer), na concentração de 6 g L<sup>-1</sup>.

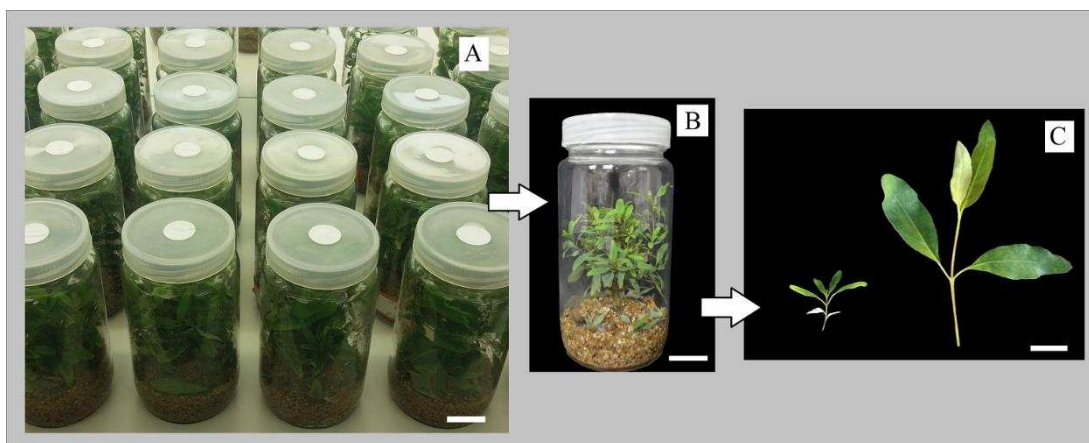
As mudas enraizadas e aclimatadas com 150 dias de idade foram transplantadas para canaletão de areia do minijardim clonal para formação das minicepas, adotando um espaçamento de 10 x 10 cm entre plantas, totalizando 100 plantas por m<sup>2</sup>. Após 10 dias do plantio em canaletão, fez-se a poda do ápice da muda, para estimular a emissão de novas brotações. Miniestacas foram coletadas semanalmente, sendo realizadas avaliações após 120 dias da implantação do minijardim clonal. O minijardim feito em alvenaria, fechado lateralmente com clarite, com teto plástico fixo e piso cimentado, sob iluminação natural, possuía leitos com dimensões de 0,8 x 15,6 m, inclinação de 1%, profundidade de 30 cm, sendo 5 cm de brita e 25 cm de areia. A irrigação e a nutrição mineral foram efetuadas com sistema automatizado de gotejamento, utilizando quatro fitas de irrigação com gotejadores, sendo a vazão de 5 L/m<sup>2</sup>/dia, distribuído em cinco aplicações diárias de três minutos de duração.

### **2.3. Coleta e enraizamento das miniestacas/microestacas**

Microestacas (brotações de aproximadamente 3 cm) e miniestacas (brotações de aproximadamente 6 cm) (Figura 1c) foram coletadas a cada sete dias e contabilizado o número produzido por microcepa e minicepa, respectivamente. Nas microcepas foram realizadas 10 coletas e nas minicepas foram feitas quatro coletas sucessivas. Em

duas das coletas realizadas, as microestacas e miniestacas foram plantadas em tubetes plásticos de 55 cm<sup>3</sup> de capacidade, contendo substrato comercial (Tropstrato Vida Verde) e vermiculita de granulometria média, na proporção de 2:1.

Após serem estaqueadas, as microestacas/miniestacas foram acondicionadas em casa de vegetação climatizada (temperatura de 20 a 30 °C e umidade relativa do ar  $\geq 80\%$ ). Nos primeiros 15 dias em casa de vegetação, foi mantida uma cobertura com Aluminet (50 %) sobre os propágulos, a 20 cm de altura sobre os recipientes. Após 30 dias de permanência na casa de vegetação, o material foi transferido para casa de sombra, sendo avaliado quanto à sobrevivência e enraizamento (raiz observada no fundo do tubete).



**Figura 1.** Produção em Jardim clonal *in vitro*. A: Disposição de frascos de cultivo contendo microcepas em bancada em laboratório; B: Frasco contendo microcepa; C: Padrão de microestaca e miniestaca, respectivamente, de *Eucalyptus urophylla*. Barra = 2 cm.

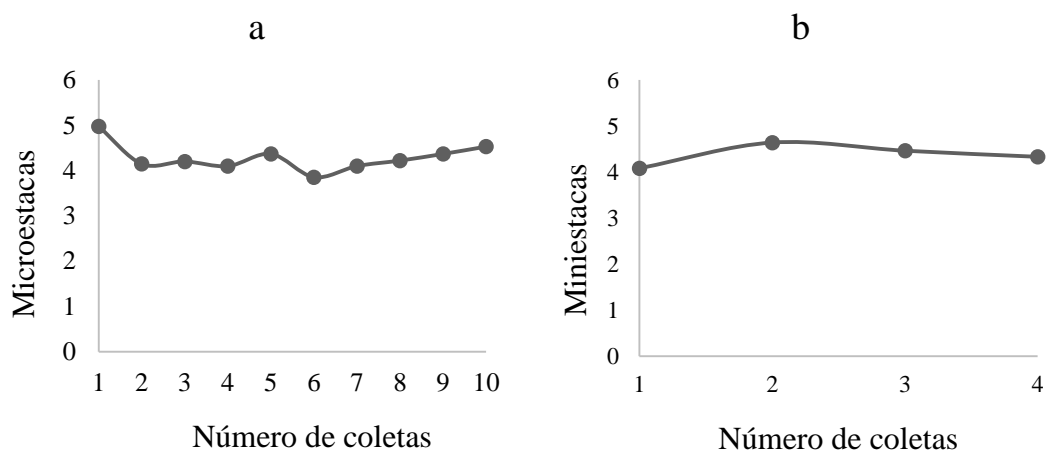
#### 2.4. Coleta e análise de dados

O jardim clonal *in vitro* foi formado por 42 microcepas e o minijardim em viveiro por 64 minicepas. Os experimentos em viveiro foram conduzidos em delineamento em blocos casualizados (DBC), constituído por dois tratamentos (microestacas e miniestacas), três repetições e parcelas contendo 30 microestacas/miniestacas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a análise dos dados foi realizada no software estatístico R versão 3.5.0 (R CORE TEAM, 2018), utilizando o pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA et al., 2013).

### 3. Resultados

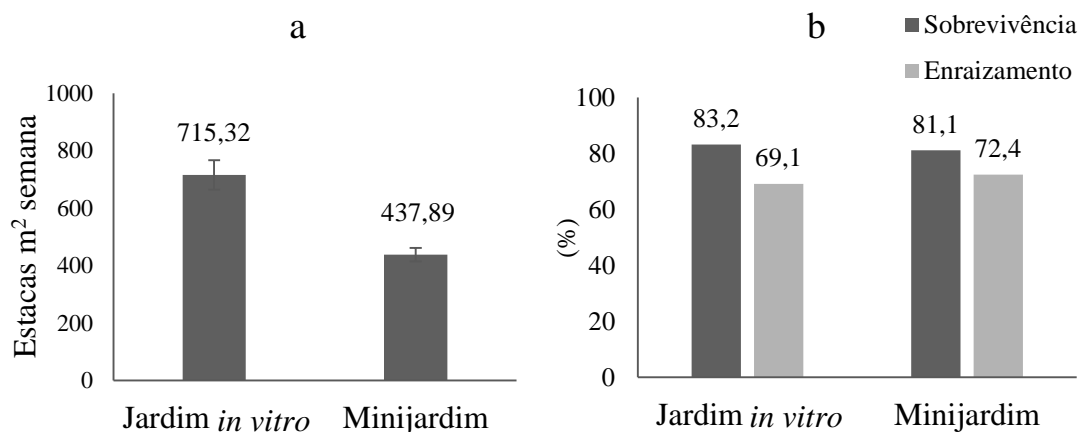
O número de microestacas/miniestacas produzidos por microcepa/minicepa não foi influenciado pelo sistema de cultivo adotado. Os valores médios de microestacas/miniestacas produzidos semanalmente variaram entre 3,9 e 5,0 no jardim clonal *in vitro* e entre 4,1 e 4,5 no minijardim clonal em viveiro (Figura 2).



**Figura 2.** Número médio de microestacas produzidas por microcepa em jardim clonal *in vitro* em dez coletas realizadas (a) e miniestacas produzidas por minicepa em minijardim clonal em viveiro em quatro coletas (b), de um clone de *Eucalyptus urophylla*.

Considerando o espaçamento utilizado, o número de microcepas por metro quadrado foi de 168, enquanto para o minijardim, no espaçamento adotado, é possível alocar 100 minicepas por metro quadrado. A partir da estimativa de produção de propágulos obtida por metro quadrado em cada sistema, observou-se maior produtividade no jardim clonal *in vitro* quando comparada aos valores de produção do minijardim em viveiro (Figura 3a).

As taxas de sobrevivência das miniestacas e microestacas foram semelhantes estatisticamente, sendo as médias em ambos os sistemas superiores a 80%. As taxas de enraizamento das microestacas/miniestacas também foram estatisticamente semelhante nos dois sistemas de produção (Figura 3b).



**Figura 3.** Em sistema de jardim clonal *in vitro* e minijardim clonal em viveiro para um clone de *Eucalyptus urophylla*: (a) Estimativa de produção média semanal de microestacas/miniastacas por metro quadrado; (b) Porcentagem média de sobrevivência e enraizamento de mudas após 30 dias de plantio.

#### 4. Discussão

Técnicas de micropropagação têm sido otimizadas para espécies e híbridos de *Eucalyptus* (HUNG; TRUEMAN, 2011; BRONDANI et al., 2012a; OLIVEIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015; SHANTHI et al., 2015), principalmente buscando o rejuvenescimento e revigoramento dos tecidos e, dessa forma, maximizando o enraizamento adventício de materiais com dificuldade de propagação vegetativa. Estes estudos e inúmeros outros que visam a melhoria da propagação vegetativa de espécies florestais trazem grandes benefícios para os sistemas de produção clonal em grande escala de materiais genéticos selecionados, tanto em qualidade quanto em quantidade (BRONDANI et al., 2017).

O jardim clonal *in vitro* proposto, com cultivo de microcepas em condições ambientais controladas em laboratório, sob sistema fotoautotrófico, é baseado no sistema proposto por Kozai et al. (2005), porém com manutenção das plantas (microcepas) nos recipientes para coletas sucessivas, com reposição de meio de cultura composto basicamente por água, macro e micronutrientes. Coleta sucessiva de microestacas em material vegetal de *Eucalyptus* mantido *in vitro* já foi relatada em estudo (GALLO et al., 2017) porém com uso de ágar, sacarose, reguladores de crescimento, com transferência para novos frascos com meio de cultura após cada coleta de material vegetal.

No presente trabalho, o jardim clonal *in vitro* possui vantagens advindas do sistema fotoautotrófico de cultivo, além das demais relativas ao cultivo em sistema de micropropagação convencional. Segundo Kozai (2010), estas condições são importantes para produção de plantas de qualidade, em larga escala, com altas taxas de sobrevivência *ex vitro* e redução de custos de produção.

Novos sistemas de micropropagação têm sido desenvolvidos na aquisição de melhorias do processo de produção vegetal e para buscar resolver as limitações atuais dos viveiros *ex vitro*, entre os quais pode-se citar o sistema de biorreatores, visando automatização e larga escala (PENCHEL et al., 2007). Em biorreatores também tem sido trabalhado o cultivo fotoautotrófico ou fotomixotrófico (ARENCIBIA et al., 2013; ARENCIBIA et al., 2017; REGUEIRA et al., 2018). Porém, ainda é preciso o desenvolvimento de protocolos eficientes para obter aumento na produtividade e redução nos custos, tornando o processo competitivo com os métodos tradicionais de produção (BUSINGE et al., 2017; MÁXIMO et al., 2018).

A produção de microestacas sob condições fotoautotróficas têm sido relatada como vantajosa em relação à micropropagação convencional. Essas vantagens incluem a promoção do crescimento e fotossíntese de plantas *in vitro*; prevenção de distúrbios morfológicos e fisiológicos; diminuição de contaminação microbiana; alta taxa de sobrevivência de plantas cultivadas *in vitro* quando transferidas para um ambiente *ex vitro*; simplificação do sistema de micropropagação; flexibilidade para produção de plantas *in vitro* em larga escala; aumento anual do rendimento de produção por unidade de área útil; redução de custo e maior possibilidade de automação do sistema (NGUYEN et al., 2016).

No presente estudo, no cultivo de microcepas em sistema de jardim clonal *in vitro* foram observadas algumas das principais vantagens relatadas para cultivos fotoautotróficos. Além da maior produtividade de microestacas e altas taxas de sobrevivência *ex vitro*, houve reduzida perda de microcepas por contaminação.

A miniestaquia tem sido a principal técnica de produção de mudas clonais de *Eucalyptus* no Brasil, tendo inúmeros trabalhos visando aumentar a produtividade das minicepas, taxa de enraizamento das miniestacas e qualidade de mudas produzidas (BRONDANI et al., 2012b; SOUZA et al., 2014; LOPES et al., 2016; FERREIRA et al., 2017). Os resultados do presente trabalho confirmam a eficiência do processo de produção de mudas advindas do minijardim clonal, porém, atesta a possibilidade da produção de mudas via jardim clonal *in vitro*.

Segundo Alfenas et al. (2009), a produtividade média de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em sistema tradicional de minijardim clonal (em leito de areia com fertirrigação por gotejamento, com espaçamento de minicepas de 10 x 10 cm) é em torno de 8.000 a 12.000 miniestacas/m<sup>2</sup>/ano. Com os resultados encontrados no presente estudo, a estimativa de produção anual de microestacas é de 37.180 microestacas/m<sup>2</sup> (715 microestacas/m<sup>2</sup>/semana x 52 semanas). Ao considerar a possibilidade de uso de mais de um nível de cultivo em laboratório, com a utilização de prateleiras, a estimativa de produtividade é cerca de 185.900 microestacas/m<sup>2</sup>/ano (37.180 microestacas/m<sup>2</sup>/ano x 5 níveis de prateleira). Assim, produtividade por área é superior no sistema *in vitro*, havendo maior aproveitamento do espaço físico, com controle das condições ambientais.

A alta taxa de sobrevivência das microestacas observadas em condição *ex vitro* pode ser devido à fácil adaptação deste material cultivado em ambiente fotoautotrófico, possivelmente com maior controle da transpiração e estômatos funcionais. O funcionamento estomático é uma característica importante para controlar a perda de água em ambientes *ex vitro*. Na maioria das vezes, as plântulas cultivadas *in vitro* não têm estômatos funcionais (DIAS et al., 2014), apresentando frequentemente baixa taxa de sobrevivência devido a desordens anatômicas e fisiológicas induzidas por condições *in vitro* (MARTINS et al., 2015). As mudas obtidas do jardim clonal *in vitro* são inicialmente mais sensíveis que as advindas do minijardim em viveiro. Porém, altas taxas de sobrevivência e enraizamento são observadas quando o manejo adequado é feito em casa de vegetação.

O jardim clonal *in vitro*, ainda precisa ser melhor desenvolvido mas já apresenta boas perspectivas na produção de mudas de *Eucalyptus*. Outras condições de cultivo *in vitro* podem ser manipuladas a fim de aumentar a produção de microestacas, como a temperatura e o enriquecimento da atmosfera com CO<sub>2</sub>, por exemplo. Uso de recipientes maiores, contendo várias microcepas, também é uma opção a ser testada, para principalmente, operacionalizar as coletas de microestacas, assim como explorar a utilização de espaços em salas de cultura de tecidos para aumentar ainda mais a produtividade, onde alocação das culturas pode ser adensada verticalmente.

Os resultados do presente trabalho demonstram que o sistema de jardim clonal *in vitro* pode tornar-se uma forma alternativa na produção de mudas clonais de *Eucalyptus*, com maior produtividade de microestacas. A evolução das técnicas de

propagação, aliada ao processo produtivo e ao desenvolvimento da ciência, é necessária para alcançar os objetivos almejados na multiplicação e preservação do material genético selecionado (XAVIER et al., 2013). O desenvolvimento de uma nova metodologia para propagação vegetativa, principalmente sob condições fotoautotróficas, abre novas perspectivas para a silvicultura clonal.

## 5. Conclusões

Em sistema de jardim clonal *in vitro* é possível obter maior número de microestacas por área quando comparada à produção de miniestacas em minijardim clonal na condição *ex vitro*; no entanto, as taxas de sobrevivência e enraizamento das microestacas foram semelhantes às das miniestacas em casa de vegetação nas condições de viveiro de produção de mudas clonais.

## 6. Referências bibliográficas

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

ARENCIBIA, A. D.; GÓMEZ, A.; POBLETE, M.; VERGARA, C. High performance micropropagation of dendroenergetic poplar hybrids in photomixotrophic temporary immersion bioreactors (TIBs). **Industrial Crops and Products**, v. 96, p. 102–109, 2017

ARENCIBIA, A. D.; VERGARA, C.; QUIROZ, K.; CARRASCO, B.; GARCÍA-GONZALES, R. Establishment of photomixotrophic cultures for raspberry micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). **Scientia Horticulturae**, v. 160, p. 49-53, 2013

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

BRONDANI, G. E.; DE WIT ONDAS, H. W.; BACCARIN, F. J. B.; GONÇALVES, A. N.; DE ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 48, n. 5, p. 478-487, 2012a

BRONDANI, G. E.; OLIVEIRA, L. S.; KONZEN, E. R.; SILVA, A. L. D.; COSTA, J. L. Mini-incubators improve the adventitious rooting performance of *Corymbia* and *Eucalyptus* microcuttings according to the environment in which they are conditioned. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, p. 1-16, 2017

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; DUTRA, L. F.; ARAUJO, M. A. DE. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*:(i) sobrevivência de minicepas e produção de miniestacas em função das coletas e estações do ano. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 11-21, 2012b

BUSINGE, E.; TRIFONOVA, A.; SCHNEIDER, C.; RÖDEL, P.; EGERTSDOTTER, U. Evaluation of a New Temporary Immersion Bioreactor System for Micropropagation of Cultivars of *Eucalyptus*, Birch and Fir. **Forests**, v. 8, n. 6, p. 196, 2017

CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, 2010

CORREIA, A. C. G.; XAVIER, A.; DIAS, P. C.; TITON, M.; SANTANA, R. C. Reduction in leaf of mini-cuttings and micro-cuttings of hybrid clones of *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, v. 39, n. 2, p. 295-304, 2015

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

CUNHA, A. C. M. C. M.; DE PAIVA H. N.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Papel da nutrição mineral na formação de raízes adventícias em plantas lenhosas. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 58, p. 35-47, 2009

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

DIAS, M. C.; CORREIA, C.; MOUTINHO-PEREIRA, J.; OLIVEIRA, H.; SANTOS, C. Study of the effects of foliar application of ABA during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 2, p. 213-224, 2014

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

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

FERREIRA, A. F.; PAIVA, H. N.; XAVIER, A.; NEVES, J. C. L. Produtividade de minicepas e enraizamento de miniestacas de híbridos de *Eucalyptus globulus* Labill. em resposta a nitrogênio. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 1, p. 193-202, 2017

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes: Experimental Designs package**. R package version 1.1.2, 2013

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



- GAGO, J.; MARTÍNEZ-NÚÑEZ, L.; LANDÍN, M.; FLEXAS, J.; GALLEGO, P. P. Modeling the effects of light and sucrose on *in vitro* propagated plants: a multiscale system analysis using artificial intelligence technology. **PLoS One**, v. 9, e85989, 2014
- GALLO, R.; XAVIER, A.; MOURA, L. C. D.; OLIVEIRA, B. D. A.; NASCIMENTO, H. R. D.; OTONI, W. C. IBA and microcutting collections in the micropropagation of *Eucalyptus* spp hybrid clones. **Revista Árvore**, v. 41, n. 6, 2017
- HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; JUNIOR DAVIES, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8.ed. New Jersey: Englewood Clippis, 2011, 900p.
- HUNG, C. D.; TRUEMAN, S. J. Topographic effects differ between node and organogenic cultures of the eucalypt *Corymbia torelliana* × *C. citriodora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, n. 1, p. 69-77, 2011
- JOSHI, I.; BISHT, P.; SHARMA, V.K.; UNIYAL, D.P. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). **Silvae Genetica**, v. 52, n. 3/4, p.110-113, 2003
- KAUR, A.; SANDHU, J. S. High throughput *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from spindle leaf roll segments: cost analysis for agribusiness industry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 1, p. 339-350, 2015
- KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. **Prop Ornam Plants**, v. 10, p. 188-204, 2010
- KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Springer (eds), 2005, 307p.
- LOPES, A. S.; TSUKAMOTO FILHO, A.; BRONDANI, G. E.; MATOS, S. E. DE; OLIVEIRA, T. M. DE; BARBOSA FILHO, J.; FONSECA, R. M. C.; NICÁCIO, P. R. Produtividade de minicepas de *Eucalyptus urophylla* S. T Blake em função da solução nutritiva e coleta de brotações. **Nativa**, v. 4, n. 1, p. 44-47, 2016
- MALAVASI, U. C. Macropropagação vegetativa de coníferas – perspectivas biológicas e operacionais. **Floresta e Ambiente**, v. 1, n. 1, p. 131-35, 1994
- MARTINS, J. P. R.; VERDOODT, V.; PASQUAL, M.; PROFT, M. de. Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, n. 1, p. 121–132, 2015
- MÁXIMO, W. P. F.; SANTOS, P. A. A.; MARTINS, G. S.; MENDONÇA, E. G.; PAIVA, L. V. *In vitro* multiplication of *Eucalyptus* hybrid via temporary immersion bioreactor: culture media and cytokinin effects. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 131-138, 2018

NGUYEN, Q. T.; XIAO, Y.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. In: KOZAI, T.; NIU, G.; TAKAGAKI, M. (eds) **Plant factory**. Academic Press, Burlington, p. 271-283, 2016

NUNES, S.; SOUSA, D.; PEREIRA, V. T.; CORREIA, S.; MARUM, L.; SANTOS, C.; DIAS, M. C. Efficient protocol for *in vitro* mass micropropagation of slash pine. In **Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, n. 2, p. 175-183, 2018

OLIVEIRA, L. S.; BRONDANI, G. E.; BATAGIN-PIOTTO, K. D.; CALSAVARA, R.; GONÇALVES, N. A.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. **Australian forestry**, v. 78, n. 4, p. 219-231, 2015

OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; DIAS, P. C.; CORREIA, A. C. G.; BORGES, S. R.; TAKAHASHI, E. K.; PAIVA, H. N. Enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus urophylla* × *E. globulus* e de *Eucalyptus grandis* × *E. globulus*. **Scientia Forestalis**, v. 40, n. 96, p. 507-516, 2012

PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. **Biotecnologia Florestal**, p. 75-92, 2017

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018

REGUEIRA, M.; RIAL, E.; BLANCO, B.; BOGO, B.; ALDREY, A.; CORREA, B.; VARAS, E.; SANCHEZ, C.; VIDAL, N. Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. **Trees**, v. 32, n. 1, p. 61-71, 2018

SHANTHI, K.; BACHPAI, V. K. W.; ANISHA, S.; GANESAN, M.; ANITHAA, R. G.; SUBASHINI, V.; CHAKRAVARTHI, M.; SIVAKUMAR, V.; YASODHA, R. Micropropagation of *Eucalyptus camaldulensis* for the production of rejuvenated stock plants for microcuttings propagation and genetic fidelity assessment. **New Forests**, v. 46, n. 3, p. 357-371, 2015

SHUKLA, M. R.; SINGH, A. S.; PIUNNO, K.; SAXENA, P. K.; JONES, A. M. P. Application of 3D printing to prototype and develop novel plant tissue culture systems. **Plant Methods**, v. 13, p. 6-15, 2017

SOUZA, C. C.; XAVIER, A.; LEITE, F. P.; SANTANA, R. C.; PAIVA, H. N. Densidade de minicepas em minijardim clonal na produção de mudas de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 34, n. 77, p. 49-56, 2014

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

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2.ed. Viçosa: Ed UFV, 2013, 279p.

## CONCLUSÕES GERAIS

Diante dos objetivos propostos e nas condições em que foram realizados os experimentos do presente estudo, buscando desenvolver o jardim clonal *in vitro* para a propagação vegetativa de clones de *Eucalyptus*, foi possível concluir:

- 1) A propagação *in vitro* de clones de *Eucalyptus* para obtenção de brotações alongadas (microestacas) pode ser realizada em diferentes recipientes, com diferentes capacidades e fabricados com materiais variados (vidro, polipropileno, acrílico). Frascos de vidro com capacidade de 250 mL proporcionaram melhores condições para crescimento *in vitro* de diferentes genótipos. O substrato afeta o crescimento das plantas *in vitro*, sendo que, como alternativa ao ágar, a vermiculita pode ser usada sem prejuízo no crescimento das plantas. As características de crescimento também são influenciadas pelo genótipo (clone) utilizado, sendo possível realizar seleção de clones mais adaptáveis às condições *in vitro*.
- 2) O uso de sacarose no meio de cultivo e de sistemas que permitam as trocas gasosas entre os recipientes e ambiente externo, como o uso de membranas, são fatores importantes a serem considerados no estabelecimento de cultivo fotoautotrófico. Para melhor crescimento e formação de microcepas de clones de *Eucalyptus urophylla*, a sacarose deve ser usada, em concentração inferior a 20 g L<sup>-1</sup>, sendo a mesma dispensável após formação (enraizamento) das microcepas. O uso de membranas que permitam maiores trocas gasosas melhora o crescimento *in vitro* das microestacas e aumenta o sucesso na aclimação *ex vitro*.
- 3) A qualidade da fonte de luz utilizada no cultivo *in vitro* de microcepas de *Eucalyptus urophylla* altera o crescimento das plantas. As lâmpadas fluorescentes, comumente utilizadas em salas de cultura de tecidos, permitem o crescimento de microcepas. Lâmpadas LED podem ser utilizadas, em substituição às lâmpadas fluorescentes, proporcionando resultados semelhantes quanto ao crescimento *in vitro* para clones de *Eucalyptus urophylla*. A intensidade luminosa, sob lâmpadas fluorescentes, entre 60 e 140

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , permite crescimento de microestacas *in vitro*, sem diferença observada neste intervalo.

- 4) O sistema de jardim clonal *in vitro* permite produção de mudas clonais de *Eucalyptus*, sendo uma alternativa ao sistema de ministaquia em viveiro devido à maior produção de microestacas por metro quadrado, conforme apresentado neste trabalho. No entanto, novos estudos devem ser conduzidos buscando extrapolar estes resultados para outros clones, assim como viabilidade econômica e operacional em larga escala.