

RICARDO GALLO

**PRODUÇÃO DE MICROESTACAS DE CLONES HÍBRIDOS DE
Eucalyptus spp. PELA MICROPROPAGAÇÃO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

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

T

G172p Gallo, Ricardo, 1990-
2014 Produção de microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus*
spp. pela micropropagação / Ricardo Gallo. – Viçosa, MG, 2014.
x, 80f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Aloísio Xavier.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Propagação in vitro. 2. Clonagem. 3. Tecidos
vegetais - Cultura e meios de cultura. 4. . *Eucalyptus*
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia
Florestal. Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal.
II. Título.


CDD 22. ed. 634.9232328


RICARDO GALLO

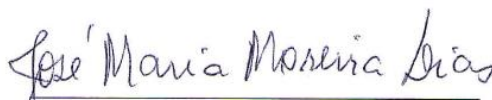
**PRODUÇÃO DE MICROESTACAS DE CLONES HÍBRIDOS DE
Eucalyptus spp. PELA MICROPROPAGAÇÃO**

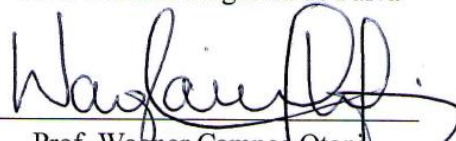
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

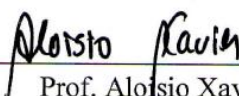
APROVADA: 10 de dezembro de 2014.


Prof. Eduardo Euclydes de Lima e Borges


Prof. Haroldo Nogueira de Paiva


Prof. José Maria Moreira Dias


Prof. Wagner Campos Ottoni
(Coorientador)


Prof. Aloisio Xavier
(Orientador)

*Aos meus pais Maria e Osmar,
irmãs Carina e Maraisa,
e à namorada Heloisa,
pelo incentivo, amor e orações.*

*Ao meu orientador Aloisio Xavier
E ao conselheiro Wagner Campos Otoni.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e ao Viveiro de Pesquisas Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da UFV, pela realização do mestrado e deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro ao trabalho desenvolvido.

Aos meus orientadores Aloisio Xavier e Wagner Campos Otoni, pelos ensinamentos e pela confiança. Serei eternamente grato.

Aos meus pais, pela educação, pelo exemplo de vida e por todas as orações.

Às minhas irmãs, pelo incentivo e preocupação.

À minha namorada Heloisa, por todo amor, companheirismo e ajuda nessa etapa.

À professora Isane Vera Karsburg, pelo incentivo à pesquisa e apoio durante a graduação.

Aos inúmeros amigos do LCT II, pelo companheirismo, ajuda e brincadeiras.

Aos amigos do grupo de Pesquisa em Silvicultura Clonal, pela troca de experiências e ajuda.

Aos amigos do grupo de estudos em Silvicultura, pela troca de experiências, companheirismo e amizade.

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

BIOGRAFIA

RICARDO GALLO, filho de Osmar Aparecido Gallo e de Maria de Lourdes Martins Gallo, nasceu em 23 de janeiro de 1990, em Potirendaba, São Paulo.

Concluiu o 1º grau em 2004, na Escola Municipal Maestro Antônio Amato em Potirendaba, São Paulo, e o 2º grau em 2007, na Escola Cenicista Fraternidade Francisco de Assis, em Alta Floresta, Mato Grosso.

Em março de 2008, ingressou no Curso de Engenharia Florestal da Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, campus de Alta Floresta, Mato Grosso, concluindo o curso em fevereiro de 2012.

Em novembro de 2012, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa da dissertação em 10 de dezembro de 2014.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
AIB E COLETAS SUCESSIVAS DE MICROESTACAS EM TUFOS DE GEMAS EM MULTIPLICAÇÃO NA MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES HÍBRIDOS DE <i>Eucalyptus</i> spp.	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1 Material vegetal e condições de cultivo <i>in vitro</i>	10
2.2 Enraizamento <i>ex vitro</i> das microestacas.....	11
2.3 Avaliações experimentais e análise dos dados	12
3. RESULTADOS	13
3.1 Clone de <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	13
3.2 Clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. globulus</i>	16
4. DISCUSSÃO.....	20
5. CONCLUSÕES.....	23
6. AGRADECIMENTOS.....	23
7. REFERÊNCIAS	23
RECIPIENTES E SUBSTRATOS NA PRODUÇÃO DE MICROESTACAS PELA MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	27
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Material vegetal e condições de cultivo <i>in vitro</i>	29
2.2 Tratamentos envolvendo recipientes	30
2.3 Tratamentos envolvendo substratos em sistema Agripot®	30
2.4 Delineamento experimental.....	31
2.5 Avaliações experimentais.....	31
3. RESULTADOS	31
3.1 Tratamentos envolvendo recipientes	31
3.2 Tratamentos envolvendo substratos em sistema Agripot®	33
4. DISCUSSÃO.....	36
4.1 Tratamentos envolvendo recipientes	36
4.2 Tratamentos envolvendo substratos em sistema Agripot®	37
5. CONCLUSÕES.....	38
6. AGRADECIMENTOS.....	39

7. REFERÊNCIAS	39
SACAROSE E TROCAS GASOSAS NA PRODUÇÃO DE MICROESTACAS PELA MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 Material vegetal e condições de cultivo <i>in vitro</i>	44
2.2 Tratamentos com trocas gasosas e concentrações de sacarose.....	45
2.3 Enraizamento <i>ex vitro</i> das microestacas.....	45
2.4 Avaliações experimentais <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i>	46
2.5 Delineamento experimental das condições <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i>	47
3. RESULTADOS.....	47
4. DISCUSSÃO.....	51
5. CONCLUSÕES.....	53
6. AGRADECIMENTOS.....	54
7. REFERÊNCIAS	54
DENSIDADE DE MICROCEPAS, QUALIDADE DE LUZ E SUBSTRATO NA PRODUÇÃO DE MICROESTACAS NA MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Eucalyptus</i> <i>grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	
1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1 Material vegetal e condições de cultivo <i>in vitro</i>	61
2.2 Alongamento das gemas.....	62
2.3 Posição de origem das microcepas	62
2.4 Densidade de microcepas e qualidade de luz	63
2.5 Substratos	64
2.6 Delineamento e avaliações experimentais.....	64
3. RESULTADOS.....	65
3.1 Posição de origem das microcepas	65
3.2 Densidade de microcepas e qualidade de luz	66
3.3 Substratos	68
4. DISCUSSÃO.....	71
4.1 Posição de origem das microcepas	71
4.2 Densidade de microcepas e qualidade de luz	71
4.3 Substratos	72
5. CONCLUSÕES.....	73
6. AGRADECIMENTOS.....	73
7. REFERÊNCIAS	74
CONCLUSÕES GERAIS	80

RESUMO

GALLO, Ricardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2014. **Produção de microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus* spp. pela micropropagação.** Orientador: Aloisio Xavier. Coorientador: Wagner Campos Otoni.

Este trabalho visou avaliar a produção de microestacas obtidas pela micropropagação de clones híbridos de *Eucalyptus* spp., tendo como objetivos específicos avaliar: 1) o efeito de doses de AIB e de coletas sucessivas de microestacas em tufo de gemas em multiplicação na micropropagação de clones híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* e *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*; 2) a produção de microestacas em sistema de micropropagação via tufo de gemas axilares em um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, em diferentes recipientes e substratos; 3) o efeito de trocas gasosas e concentrações de sacarose na produção de microestacas oriundas da micropropagação via proliferação de gemas axilares em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*; e 4) a produção de microestacas em sistema de micropropagação via microcepas em um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, considerando-se posições de origem das microcepas, densidades de microcepas, qualidades de luz e de substratos. O material experimental utilizado neste trabalho foi proveniente da fase de multiplicação *in vitro* de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e de um clone de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*, com 25 e 72 subcultivos, respectivamente. Os experimentos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizado no município de Viçosa/MG, e os experimentos *ex vitro* foram conduzidos no Viveiro de Pesquisas do Departamento de Engenharia Florestal da UFV. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que: 1) as microestacas *in vitro* apresentaram boa produção no decorrer das coletas sucessivas, bem como foram ajustados os níveis de AIB para cada clone, variando de 0,25 a 0,50 mg L⁻¹ de AIB para o clone *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* e de 0,75 a 1,0 mg L⁻¹ para o clone *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*; nas condições *ex vitro*, a dosagem de AIB apresentou efeito residual, proporcionando bom enraizamento e sobrevivência nas dosagens de 0,25 a 0,50 mg L⁻¹ de AIB para o clone *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* e de 0,50 a 1,0 mg L⁻¹ para o clone *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*; 2) o melhor recipiente para produção de brotos

maiores que 0,5 cm, bem como microestacas maiores que 2 cm, é o pote de polipropileno (500 mL); no entanto, quando se deseja maior produção por m², o frasco de vidro (250 mL) é mais vantajoso diante da melhor possibilidade de adensamento; os melhores substratos para produção de brotos maiores que 0,5 cm, bem como microestacas maiores que 2 cm, utilizando o recipiente Agripot[®], são o ágar ou a vermiculita; 3) a redução para 15 g L⁻¹ de sacarose apresenta os melhores resultados; o sistema com troca gasosa atua negativamente no comprimento da maior microestaca; os tratamentos realizados *in vitro* apresentam efeito residual *ex vitro*, melhorando a sobrevivência das mudas durante todo seu processo de formação; 4) as microcepas oriundas de segmentos nodais basais de microestacas proporcionaram maior número de brotos bem como maior enraizamento; a densidade de três ou quatro microcepas por recipiente proporcionou os melhores resultados, e a iluminação 4 LEDs proporcionou maior vigor para as microestacas; o uso de ágar ou vermiculita apresentou as maiores médias para as características analisadas, porém o uso de ágar proporcionou baixas porcentagens de enraizamento.

ABSTRACT

GALLO, Ricardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2014. **Micro-cuttings production of *Eucalyptus* spp. hybrid clones via micropropagation.** Adviser: Aloisio Xavier. Co-adviser: Wagner Campos Otoni.

This paper aimed to evaluate the micro-cuttings production obtained by the micropropagation of *Eucalyptus* spp. hybrid clones, with the following evaluations as specific objectives: 1) effect of IBA doses and successive collections of micro-cuttings on bud stumps in the micropropagation of *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* and *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* hybrid clones; 2) micro-cuttings productivity in micropropagation system via stumps of axillary buds in a *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clone, in different types of containers and substrates; 3) effect of gas exchange and sucrose concentrations on the micro-cuttings productivity in micropropagation system via axillary bud proliferation in *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*; and 4) micro-cuttings productivity in micropropagation system via micro-stumps on *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clone, considering micro-stumps origin position, micro-stumps density, light quality and substrates. The experimental material used in this work derived from the *in vitro* multiplication phase of one *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clone and one *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* clone, with 25 and 72 subcultures, respectively. The experiments were carried out at the Plant Tissue Laboratory, Institute of Biotechnology Applied to Agriculture (BIOAGRO), Federal University of Viçosa, Viçosa/MG. Based on the results it may be concluded that: 1) *in vitro*, micro-cutting showed high yield after successive harvesting, as well as the IBA levels for each clone were adjusted, varying from 0.25 to 0.50 mg L⁻¹ of IBA in the *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* clone, from 0.25 to 0.50 mg L⁻¹ in the *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* clone, and from 0.75 to 1,0 mg L⁻¹ in the *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* clone; in *ex vitro* conditions the IBA dosage showed residual effect providing high rooting and survival, as well as other morphological parameters in dosages from 0.25 to 0.50 mg L⁻¹ in *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* clone, and from 0.50 to 1.0 mg L⁻¹ in *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* clone; 2) the polypropylene pot (500 mL) was the best container for production of shoots higher than 0.5 cm, as well as micro-cuttings larger than 2 cm, however, for increase the productivity per m², the glass flask (250 mL) are more favorable due to the best fit on the shelves. The agar and vermiculite were the best substrates for

production of shoots higher than 0.5 cm, as well as micro-cuttings larger than 2 cm, using the container AgripotTM; 3) the reduction to 15 g L⁻¹ sucrose provides the best results; the gas exchange system acts negatively on the length of the highest micro-cutting; and *in vitro*, treatments showed *ex vitro* residual effect, actively acting in the plantlets survival throughout their development process; 4) The micro-stumps originated from micro-cuttings basal nodal segments provide more shoots and roots; the density of three or four micro-stumps per container provided the best results and the 4 LEDs lighting provided more vigorous micro-cuttings; the use of agar or vermiculite showed the highest means for the evaluated parameters, however, the use of agar provided low rooting percentages.

INTRODUÇÃO GERAL

A formação de povoamentos florestais para produção de madeira visando à indústria tem sido estabelecida desde muito tempo na América do Norte e na Europa e há alguns séculos nas Regiões Tropicais (SANTIAGO, 2013). Estes plantios florestais representam grande fonte de recursos renováveis de elevada importância na demanda por produtos derivados de biomassa lenhosa, alimentando crescente competição de mercados, requerendo elevado aprimoramento dos produtos fornecidos, bem como dos serviços prestados (BRONDANI, 2012).

A demanda por produtos florestais tem sido alavancada nos últimos anos pela sua escassez e sua limitada oferta. Para solucionar o problema, a implantação de florestas vem apresentando relevante aumento, com intensificação da exploração de espécies dotadas de múltiplas aplicações de sua madeira, entre elas as espécies de *Eucalyptus*, que apresentam características favoráveis neste quesito, tornando-se aquelas com maior área de exploração em diversas partes do mundo (PRYOR, 1976; SANTIAGO, 2013; SFB, 2014).

A cobertura florestal no Brasil está estimada em 463 milhões de hectares, sendo 98,5 % desta cobertura constituída por florestas naturais e 1,5 % por florestas plantadas, que, embora reduzidas, apresentam relevantes indicadores de eficiência produtiva e notória participação socioeconômica no setor, com plantios predominantemente de espécies exóticas, como eucalipto e pinus, sendo estimados no ano de 2012, 6.664.812 ha de plantios com essas espécies: 76,6 % correspondentes à área de plantios de *Eucalyptus* e 23,4 %, aos plantios de *Pinus* (ABRAF, 2013; SFB, 2014).

Atualmente, a eucaliptocultura brasileira compreende 5.102.030 ha de áreas plantadas, distribuídas nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Espírito Santo, Paraná e Tocantins (ABRAF, 2013). Segundo o anuário estatístico da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF), o crescimento em 4,5 % das áreas plantadas com *Eucalyptus*, de 2011 a 2012, se deve à demanda futura dos projetos industriais do segmento de papel e celulose, sendo, de acordo com Carvalho et al. (2005), o setor mais bem-sucedido do âmbito florestal.

O aumento dos plantios de *Eucalyptus* no Brasil e no mundo, bem como seu aumento de produtividade, se verifica pela combinação de diversos fatores.

Destaques devem ser dados à implantação de programas de melhoramento, à produção de híbridos e clones elites e ao avanço do conhecimento de tecnologias da propagação vegetativa, sendo esse último um dos mais importantes, pois a propagação massal de clones elites, visando a atender aos programas de plantios florestais brasileiros hoje, se dá por métodos de propagação clonal (FERRARI et al., 2004, XAVIER et al., 2013).

O sucesso da propagação clonal para o gênero é devido aos pesquisadores franceses e australianos que, na década de 50, multiplicaram várias espécies de *Eucalyptus* por enraizamento de estacas obtidas de mudas de origem seminífera. Entretanto, a clonagem de árvores adultas por meio da estaquia somente foi obtida com sucesso no início da década de 70 na Austrália, sendo que, no Brasil, esta técnica começou a ser adotada em 1975 (ALFENAS et al., 2009; 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).

A propagação vegetativa de *Eucalyptus* pelo método da estaquia, no Brasil, foi aperfeiçoada, tendo em vista que havia muitas dificuldades para obtenção de material vegetativo com grau de juvenildade e vigor fisiológico adequados ao enraizamento de estacas. O processo avançou e culminou no desenvolvimento da miniestaquia e no uso da micropropagação para desenvolvimento da microestaquia (ASSIS et al., 1992; XAVIER e COMÉRIO, 1996; ASSIS, 2001; ALFENAS et al., 2009), ambas, técnicas direcionadas para a otimização da clonagem de propágulos oriundos de árvores adultas (DEL PONTE et al., 2001).

A micropropagação como ferramenta de produção de microestacas tem inúmeras vantagens em que se destacam: a possibilidade de propagação massal de clones em curto espaço de tempo; o maior controle nutricional, ambiental e fitossanitário; o transporte do material clonal por grandes distâncias sem danos; o armazenamento por longos períodos; e a retenção do vigor híbrido (BISHT et al., 1999; XAVIER et al., 2013). Além disso, os problemas de enraizamento, principalmente observados em estacas provenientes de árvores adultas, causados pela

alta produção de inibidores ao enraizamento, metabólitos secundários e fenóis, podem ser minimizados pelo emprego da micropropagação como técnica de rejuvenescimento do material clonal (JOSHI et al., 2003).

Atualmente, uma das principais limitações à adoção da técnica de microestaquia é a necessidade de mudas rejuvenescidas pela micropropagação, a qual depende da existência de estrutura física e operacional de um laboratório de cultura de tecidos, assim como protocolos de micropropagação ajustados para espécies e clones (ASSIS et al., 1992; XAVIER e COMÉRIO, 1996; ASSIS, 2001; HARTMANN et al., 2010). Entretanto, a existência de laboratório de cultura de tecidos com protocolos eficientes para diversos objetivos torna o uso da microestaquia mais acessível ao setor florestal (XAVIER et al., 2013).

Para solucionar os fatores limitantes do processo, fica evidente a necessidade de estudos básicos para maximização da produção de microestacas *in vitro* em *Eucalyptus*, entre eles: o conhecimento e adequação de protocolos, bem como o tipo de explante a ser utilizado; o desenvolvimento de tecnologias de produção em recipientes alternativos; a adoção de sistemas com trocas gasosas, como membranas porosas, e a redução da fonte de carbono no meio de cultivo; o uso de substratos alternativos, visando à redução com gastos de meios semissólidos; o conhecimento de tipos de iluminação alternativos e mais eficientes para o sistema; entre outros (PENCHEL et al., 2007; SALDANHA et al., 2012; XAVIER et al., 2013). Assim, o conhecimento do tamanho, do tipo e da densidade de plantio nos recipientes para desenvolvimento das culturas é de grande importância, visto que o espaço de cultivo influencia na composição da fase gasosa do frasco e, conseqüentemente, no crescimento e o desenvolvimento das culturas (XIAO et al., 2011).

A redução ou a exclusão da fonte de sacarose no meio bem como o uso de membranas porosas com ventilação natural ou forçada proporcionam redução da umidade relativa do ar no interior dos frascos de cultivo e aumento significativo da troca gasosa com a atmosfera exterior, aumentando a transpiração e a efetiva absorção de água e nutrientes pela planta, melhorando seu processo de aclimatização *ex vitro* (HAZARIKA, 2006; IVANOVA e VAN STADEN, 2010; XIAO et al., 2011).

Para solucionar os problemas no processo, tem sido recomendada a troca do ágar como agente gelificante pelo uso de materiais alternativos porosos como a vermiculita, tendo como principal vantagem o melhor desenvolvimento do

enraizamento *in vitro*, influenciando diretamente na qualidade das plantas, aumentando a produtividade e reduzindo os custos de produção (AFREEN-ZOBAYED et al., 2000).

Corroborando o processo, também o uso de lâmpadas diodos de emissão de luz (LEDs) vem sendo aplicado, trazendo como vantagens baixa geração de calor, alta eficiência luminosa, longo período de vida e comprimentos de onda específicos (YEH e CHUNG, 2009).

Com base no contexto supracitado, objetivou-se o desenvolvimento de metodologias que aperfeiçoem a produção de microestacas na micropropagação de clones híbridos de *Eucalyptus* spp., visando a tornar o processo eficiente na produção de mudas clonais. Como objetivos específicos, este trabalho visou a avaliar: 1) o efeito de doses de AIB e de coletas sucessivas de microestacas em tufos de gemas em multiplicação na micropropagação de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*; 2) a produção de microestacas em sistema de micropropagação via proliferação de gemas axilares de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, submetidas a diferentes tipos de recipientes e de substratos; 3) o efeito de trocas gasosas e de concentrações de sacarose na produtividade de microestacas oriundas de micropropagação via proliferação de gemas axilares em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*; e 4) a produtividade de microestacas em sistema de micropropagação via microcepas em um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, submetidas a diferentes posições de origem das microcepas, densidade de microcepas, qualidade de luz e substrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFREEN-ZOBAYED, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KUBOTA, C.; KOZAI, T.; HASEGAWA, O. A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. **Plant Science**, v.157, p.225–231, 2000.

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

ASSIS, T.F. Evolution of technology for cloning *Eucalyptus* in large scale. In: IUFRO INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 2001, Valdivia. **Proceedings...** Chile: EMBRAPA/ CNPF, 2001. p.22.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2012. Brasília. 2013. 142p.

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. **Aspectos morfológicos na clonagem de *Eucalyptus benthamii***. 2012. 186f. Tese (Doutorado em Recursos Florestais) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba – SP, 2012.

CARVALHO, R.M.M.A.; SOARES, T.S.; VALVERDE, S.R. Caracterização do setor florestal: uma abordagem comparativa com outros setores da economia. **Ciência Florestal**, v.15, n.1, p.105-118, 2005.

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

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

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; JUNIOR DAVIES, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8.ed. New Jersey: Englewood Clippis, 2010. 900 p.

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

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulators**, v.60, p.143-150, 2010.

JOSHI, I.; BISHT, P.; SHARMA, V.K.; UNİYAL, 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.

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

PRYOR, L.D. **The biology of eucalypts**. London, Edward Arnold, 1976. 82p.

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, p.413-422, 2012.

SANTIAGO, F.L. **Aproveitamento de resíduos florestais de *Eucalyptus* spp. na indústria de fabricação de celulose para geração de energia térmica e elétrica.** 2013. 124 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp – Campus de Botucatu, Botucatu, 2013.

SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO. **Panorama econômico do setor florestal.** Brasília: GEPLAN/MMA, 2014. 11p. (Boletim Informativo, ano.1, 1ª ed.).

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: Editora UFV, 2013. 279 p.

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

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

**AIB E COLETAS SUCESSIVAS DE MICROESTACAS EM TUFOS DE
GEMAS EM MULTIPLICAÇÃO NA MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES
HÍBRIDOS DE *Eucalyptus* spp.**

RESUMO – O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de doses de AIB e de coletas sucessivas de microestacas em tufos de gemas em multiplicação na micropropagação de clones de *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* e *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*. Tufos contendo de seis a oito gemas diferenciadas dos clones estabelecidos *in vitro* foram transferidos para frascos de vidro - 250 mL, em meio semissólido JADS, sendo feitas coletas sucessivas a cada 20 dias para o clone *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* e a cada 30 dias para o *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*. Nas condições *in vitro*, foram avaliados o número de brotos maiores que 0,5 cm por tufo de gemas, o número de microestacas produzidas maiores que 2 cm, o comprimento da maior microestaca e o vigor dos brotos. Nas condições *ex vitro*, em casa de vegetação e de sombra, foram avaliados a altura da muda, a sobrevivência, o diâmetro do colo, a porcentagem de emissão de raiz na extremidade inferior do tubete e o vigor. Em pleno sol, foram avaliados a altura da muda, o diâmetro do colo, a sobrevivência, o número de raízes, o volume de raiz, o vigor e as massas seca da parte aérea e da raiz. Com base nos resultados obtidos, observou-se boa produtividade de microestacas advindas de tufos de gemas no decorrer das coletas sucessivas, bem como foram ajustados os níveis de AIB para cada clone, variando de 0,25 a 0,50 mg L⁻¹ para o clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e de 0,75 a 1,0 mg L⁻¹ para o clone *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*. Nas condições *ex vitro*, a dosagem de AIB apresentou efeito residual, proporcionando bom enraizamento e sobrevivência, bem como para as demais características morfológicas, nas dosagens de 0,25 a 0,50 mg L⁻¹ de AIB para o clone *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla* e de 0,50 a 1,0 mg L⁻¹ para o clone *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*.

Palavras-chave: Clonagem; propagação *in vitro*; propagação vegetativa.

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 (FERRARI et al., 2004; XAVIER et al., 2013).

Entre as técnicas de propagação clonal, a micropropagação, como ferramenta de produção de microestacas, 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 e retenção do vigor híbrido (BISHT et al., 1999; XAVIER et al., 2013).

Além das vantagens supracitadas, a produção de microestacas por meio da micropropagação aperfeiçoa o processo de clonagem, apresentando a técnica de rejuvenescimento e/ou revigoramento como mecanismo para superar os problemas de enraizamento de estacas, principalmente observados no resgate de árvores adultas, que podem ser minimizados pelo emprego desta técnica (JOSHI et al., 2003; XAVIER et al., 2013).

Inovações em aspectos específicos têm sido propostas na aplicação de tecnologias de micropropagação em larga escala para a cultura do *Eucalyptus* (XAVIER et al., 2013), entre elas, a manipulação da atmosfera e/ou do ambiente *in vitro* como a propagação fotoautotrófica (KOZAI, 2010); o uso de biorreatores de imersão temporária e meio líquido (OLIVEIRA et al., 2011) e a substituição do meio semissólido por substratos alternativos (KIRDMANEE, et al., 1995); automatização e mecanização das operações dos sistemas (PENCHEL et al., 2007); entre outras inovações

Na propagação clonal de *Eucalyptus*, uma das limitações da cadeia produtiva de microestacas no sistema *in vitro* ainda é a dependência de uma estrutura física e operacional qualificada, de um laboratório de cultura de tecidos, de protocolos ajustados para espécies e clones (ASSIS et al., 1992; XAVIER e COMÉRIO, 1996; ASSIS, 2001; HARTMANN et al., 2010) e da implantação de jardins clonais *in vitro* para suprir esta grande demanda no setor. A existência de laboratório de cultura de

tecidos com protocolos eficientes na micropropagação de *Eucalyptus* tornaria o uso da microestaquia mais acessível ao setor florestal (XAVIER et al., 2013).

Diante deste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito das doses de AIB e de coletas sucessivas de microestacas em tufos de gemas em multiplicação na micropropagação de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo *in vitro*

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

O material experimental utilizado neste trabalho foi proveniente da fase de multiplicação pela micropropagação de um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e de um clone de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*, com 25 e 72 subcultivos, respectivamente. A partir de tufos contendo de seis a oito gemas diferenciadas, essas gemas foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995), adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose (Vetec[®]), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma[®]), 800 mg L⁻¹ de PVP-30 (polivinilpirrolidona - Vetec[®]), 0,5 mg L⁻¹ de BAP (6 - benzilaminopurina – Sigma[®]), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma[®]) e 7 g L⁻¹ de ágar (Merck[®]). Posteriormente, os tufos foram transferidos para o mesmo tipo de recipiente e meio de cultura, reduzindo apenas de 0,5 mg L⁻¹ para 0,3 mg L⁻¹ de BAP. O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,8 e esterilizado em autoclave sob pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C, por 20 minutos. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, em fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 33 μmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro - LI-COR[®], LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram[®], Brasil).

Após 30 dias em meio de cultivo, com redução do BAP, os tufos de cada clone foram transferidos para frascos de vidro (250 mL de capacidade), contendo 40 mL de meio JADS, adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol,

800 mg L⁻¹ de PVP-30, 7 g L⁻¹ de ágar, 0,05 mg L⁻¹ de BAP, variando as concentrações de ácido 3-indolbutírico (AIB) (Sigma[®]), sendo as concentrações de 0,0; 0,25; 0,50 e 1,00 mg L⁻¹.

Foram inoculados quatro tufos contendo de seis a oito gemas em cada frasco nas quatro concentrações de AIB para cada clone, sendo mantidos em sala de crescimento com as mesmas características citadas anteriormente. O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 5x4, sendo cinco coletas de microestacas e quatro concentrações de AIB (0,0; 0,25; 0,50 e 1,00 mg L⁻¹), com quatro repetições, e parcelas contendo quatro tufos de gemas cada.

2.2 Enraizamento *ex vitro* das microestacas

Os experimentos foram conduzidos no Viveiro de Pesquisas do Departamento de Engenharia Florestal da UFV.

Microestacas com tamanho superior a dois centímetros dos dois clones e dos tratamentos com dosagens de AIB nas condições *in vitro* foram transferidas em uma caixa de isopor para o viveiro, em placas de Petri contendo duas folhas de papel filtro umedecido com água.

As microestacas de cada tratamento (doses de AIB) e clones (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*) foram plantadas em tubetes plásticos de 55 cm³ de capacidade, contendo substrato comercial (Tropstrato Vida Verde[®]) e vermiculita de granulometria média, na proporção de (1:1), adicionado de 5 kg m⁻³ de superfosfato simples (Heringer[®]), sendo essas miniestacas acondicionadas em casa de vegetação climatizada (temperatura de 20 a 30 °C e umidade relativa do ar ≥ 80 %). Nos primeiros 10 dias em casa de vegetação, foi mantida uma cobertura com Aluminet (50 %) sobre as microestacas, a uma altura de 20 cm dos recipientes. Após 20 dias de permanência na casa de vegetação, o material foi transferido para casa de sombra, sendo nesse momento feita a adubação de cobertura, constituída pela aplicação de 2 mL por muda de fosfato monoamônico (MAP), na concentração de 2 g L⁻¹. As mudas permaneceram em casa de sombra (50 % de sombreamento) por 10 dias, sendo em seguida transferidas para pleno sol, aplicando 5 mL por muda do formulado NPK 20-5-20 (Heringer[®]), na concentração de 6 g L⁻¹, permanecendo nessa condição por mais 30 dias.

O experimento foi instalado em um delineamento em blocos casualizados (DBC), apresentando as quatro concentrações de AIB (0,0; 0,25; 0,50 e 1,00 mg L⁻¹) advindas das condições *in vitro*, em cinco blocos (coletas) contendo um número variável de microestacas de acordo com a produção *in vitro* de cada tratamento.

2.3 Avaliações experimentais e análise dos dados

A cada 20 dias de cultivo *in vitro* para o clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e a cada 30 dias para o clone *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*, foram feitas avaliações das características de crescimento, bem como a coleta das microestacas, sendo posteriormente os tufos transferidos para novo meio de cultura contendo as mesmas condições e tratamentos. Para ambos, foram feitas cinco coletas, totalizando 100 dias de cultivo para o clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e 150 dias para o clone *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*.

Em cada data de coleta *in vitro*, foram analisados o número de brotos maiores que 0,5 cm por tufo de gema (NB > 0,5 cm), o número de microestacas maiores que 2 cm (NM > 2 cm), o comprimento da maior microestaca (cm) (CMM) e o vigor dos brotos, segundo uma escala de notas variando de 1 (Baixo), 2 (Médio) e 3 (Bom).

Na condição *ex vitro*, na saída da casa de vegetação e de sombra, foram avaliados a altura da muda (H, cm), o diâmetro do colo (DC, mm), a porcentagem de sobrevivência (SOB, %), a porcentagem da ocorrência de raiz observada na extremidade inferior do tubete (RFT, %), bem como o vigor das mudas, feito com base em uma escala de notas variando de 1 (Baixo), 2 (Médio) e 3 (Alto). Após 30 dias em pleno sol, foram avaliados a altura da muda (H, cm), o diâmetro do colo (DC, mm), a porcentagem de sobrevivência (SOB, %), o número de raízes (NR), o volume de raiz (VR, cm³), o vigor das mudas, variando de 1 (Baixo), 2 (Médio) e 3 (Alto), a massa seca da parte aérea (MSPA, g) e a massa seca da raiz (MSRA, g).

Os dados foram analisados em software R, versão 3.0.3 (R Core Team, 2014), com o auxílio do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA et al., 2013). Os dados de sobrevivência (%) e altura da muda nas condições *ex vitro* não apresentaram distribuição normal perante o teste de Shapiro-Wilk a 5 % de significância, sendo transformados em \sqrt{x} e \sqrt{x} , respectivamente; e para as variáveis significativas perante análise de variância, foram geradas equações de regressão.

3. RESULTADOS

3.1 Clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*

Com base nos resultados obtidos nas avaliações na condição *in vitro*, o número de brotos > 0,5 cm, Figura 1A, apresentou tendência quadrática com o número de coletas, sendo constatado que a partir da segunda coleta houve aumento da quantidade de brotos, seguido de estabilização. O número de brotos > 0,5 cm obteve a mesma tendência ao comparar as doses de AIB, Figura 2A, porém, apresentou decréscimo de produção em sua máxima concentração de AIB.

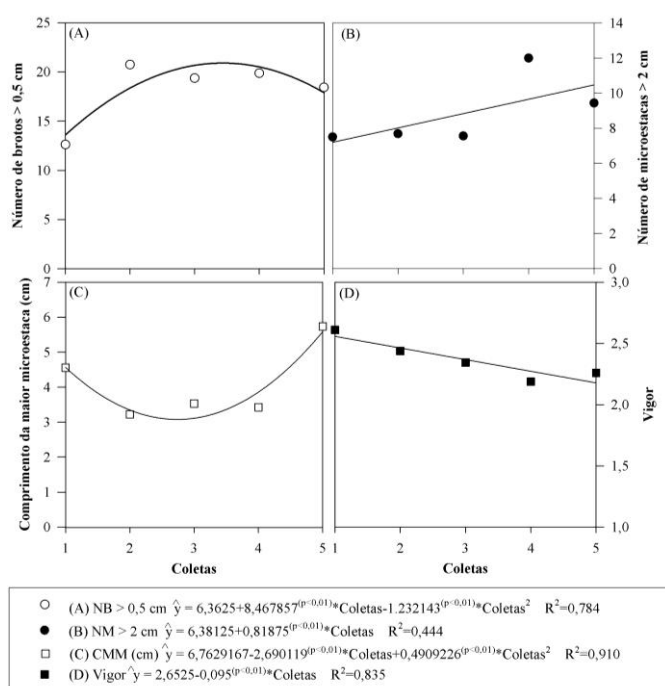


Figura 1. Características observadas no cultivo *in vitro* do clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em função das coletas sucessivas. **(A)** Número de brotos > 0,5 cm; **(B)** Número de microestacas > 2 cm; **(C)** Comprimento da maior microestaca (cm); e **(D)** Vigor.

Quanto à produção de microestacas > 2 cm, Figura 1B, a projeção de produção tende a aumento linear. No entanto, em se tratando da dosagem do AIB, Figura 2B, a máxima produção de microestacas ocorreu com 0,44 mg L⁻¹ do regulador de crescimento.

As maiores microestacas se formaram na primeira e última coleta, Figura 1C, acarretando aumento de tamanho da quarta para a quinta coleta. Em contrapartida, o vigor das microestacas no decorrer das coletas exibe queda linear (Figura 1D). O uso

das doses de AIB para essas variáveis mostrou a mesma tendência das demais características avaliadas, sendo o ponto que proporciona os maiores tamanhos de microestacas estimado em 0,54 mg L⁻¹ de AIB (Figura 2C). Já para o vigor, este ponto foi estimado em 0,45 mg L⁻¹ de AIB (Figura 2D).

Pode-se observar que a faixa ótima da concentração do AIB para obter melhores resultados de produção de brotos, microestacas, bem como seu tamanho e vigor se encontra no intervalo de 0,25 a 0,50 mg L⁻¹.

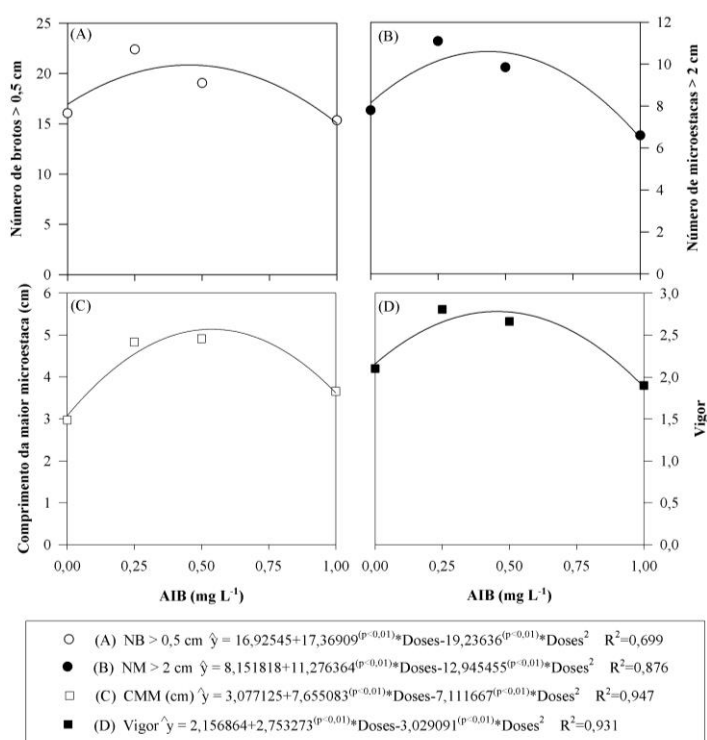


Figura 2. Características observadas no cultivo *in vitro* do clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em função das doses de AIB (0,0; 0,25; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹). **(A)** Número de brotos > 0,5 cm; **(B)** Número de microestacas > 2 cm; **(C)** Comprimento da maior microestaca (cm); e **(D)** Vigor.

As avaliações feitas na condição *ex vitro*, na saída da casa de vegetação, apresentaram o mesmo resultado do ambiente *in vitro*, sendo que os resultados das características dos tratamentos com AIB foram observados de forma quadrática, tendo as doses aplicadas *in vitro* de 0,25 e 0,50 mg L⁻¹ as maiores alturas (Figura 3A), maiores vigores (Figura 3B) e maiores porcentagens de emissão de raízes observadas na extremidade inferior do tubete (Figura 3C).

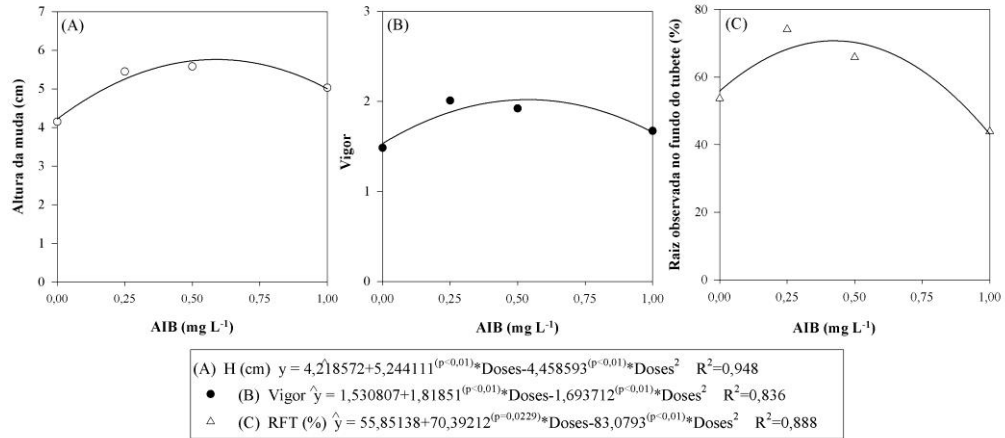


Figura 3. Características observadas na saída da casa de vegetação em mudas do clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em função das doses de AIB (0,0; 0,25; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹). (A) Altura da muda (cm); (B) Vigor; e (C) Raiz observada na extremidade inferior do tubete (%).

Quanto às avaliações feitas na saída da casa de sombra, as doses de AIB não influenciaram as características avaliadas nas mudas. No entanto, na avaliação final em pleno sol, os tratamentos com as doses de AIB adotadas *in vitro* influenciaram significativamente a sobrevivência das mudas (SOB, %), o número de raízes (NR), massa seca da parte aérea (MSPA, g), a massa seca radicular (MSRA, g) bem como o volume de raízes (VR, cm³) (Figura 4).

O VR apresentou tendência linear decrescente em função dos tratamentos de AIB adotados *in vitro*, sendo observada redução na maior dose do regulador de crescimento (1,0 mg L⁻¹) (Figura 4A). Para as demais características avaliadas ao final da etapa de pleno sol (60 dias), o comportamento segue tendência quadrática, exibindo as concentrações intermediárias de AIB (0,25 e 0,5 mg L⁻¹) as maiores sobrevivências (Figura 4B), maior NR (Figura 4C) e maiores valores de MSPA e MSRA (Figuras 4D e 4E).

Pode-se observar que o uso de AIB em condições *in vitro* proporcionou ainda efeitos residuais nas condições *ex vitro* testadas, influenciando diretamente na qualidade das mudas. A altura da muda, o vigor e a porcentagem de emissão de raízes observadas na extremidade inferior do tubete foram significativas na saída da casa de vegetação, porém essas características se igualam estatisticamente nas demais etapas (casa de sombra e pleno sol). O diâmetro do colo é uma característica que não apresentou diferença estatística com a aplicação dos tratamentos, em nenhum ambiente *ex vitro* estudado.

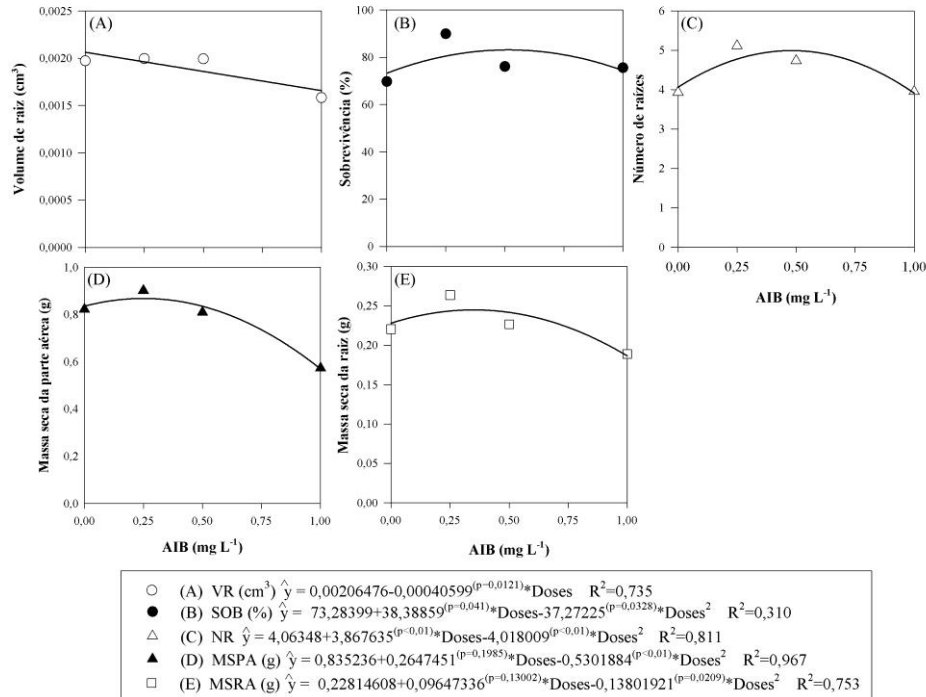


Figura 4. Características observadas em pleno sol em mudas do clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em função das doses de AIB (0,0; 0,25; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹). (A) Volume de raiz; (B) Porcentagem de sobrevivência; (C) Número de raiz; (D) Massa seca da parte aérea; e (E) Massa seca da raiz.

Em relação à sobrevivência das microestacas nos ambientes em estudo, na casa de vegetação o clone em questão proporcionou níveis médios de 85,2 % de sobrevivência das microestacas sem influência das doses de AIB aplicadas *in vitro*; na saída da casa de sombra, houve redução dos níveis de sobrevivência (78,45 %), ainda sem influência das doses *in vitro*. Já na avaliação ao final de 60 dias a pleno sol, as microestacas apresentaram 77,8 % de sobrevivência sob influência das doses advindas do ambiente *in vitro*, sendo o ponto de máxima sobrevivência estimado ao utilizar 0,52 mg L⁻¹ AIB no meio de cultura, na condição *in vitro*.

3.2 Clone de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*

De acordo com a análise de variância para o clone de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*, houve interação na coleta: doses de AIB foram significativas para número de brotos maiores que 0,5 cm (NB > 0,5 cm), com significância (p = 0,0102), e para variável vigor (p < 0,01). Já para o número de microestacas maiores que 2 cm (NM > 2cm), os fatores atuaram de forma independente (p < 0,01); para

comprimento da maior microestaca (CMM), apenas as doses de AIB foram significativas ($p < 0,01$).

Doses de AIB para o NB > 0,5 cm em função das coletas, Figura 5A, apresentaram comportamento polinomial de segundo grau. A partir da primeira coleta, ambas as concentrações de AIB seguiram uma tendência crescente, porém, a partir da terceira para a quarta coleta, as concentrações 0,0; 0,25 e 0,5 mg L⁻¹ de AIB tenderam a reduzir a produção de brotos. Para a maior concentração (1,0 mg L⁻¹) do regulador, essa tendência só ocorreu da quarta para quinta coleta.

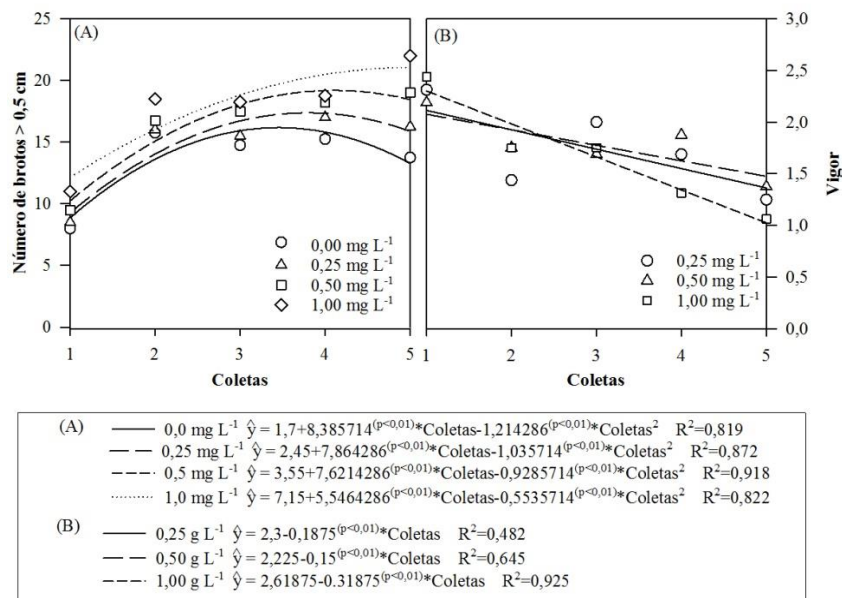


Figura 5. Características observadas no cultivo *in vitro* do clone de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* em função das coletas (a cada 30 dias) e doses de AIB (0,0; 0,25; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹). **(A)** Número de brotos > 0,5 cm e **(B)** Vigor.

Quanto ao vigor das microestacas obtidas, houve resposta em função da interação entre os tratamentos, exibindo significância ($p < 0,01$) em um comportamento linear decrescente para as concentrações 0,25; 0,50 e 1,00 mg L⁻¹ de AIB em função das coletas, Figura 5B, com clara diminuição do vigor com o avanço das coletas mensais.

A característica NM > 2 cm tem aumento de sua produção em função das coletas sucessivas, Figura 6A, sendo a dosagem de 0,65 mg L⁻¹ de AIB o ponto ótimo (Figura 6B). Quanto ao CMM em função das doses de AIB, essa responde em função linear crescente (Figura 6C).

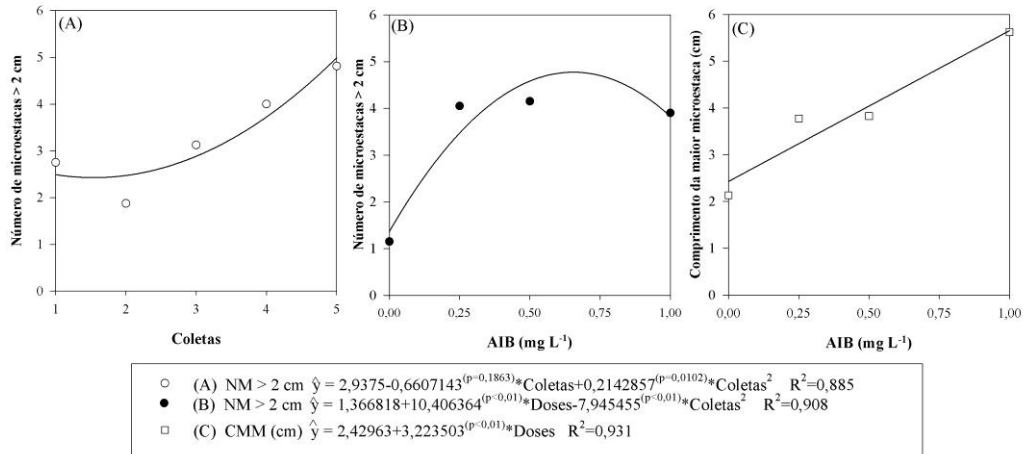


Figura 6. Características observadas no cultivo *in vitro* do clone de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* em função das coletas sucessivas e doses de AIB (0,0; 0,25; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹). (A) Número de microestacas > 2 cm em função das coletas sucessivas (B) e em função das doses de AIB; e (C) Comprimento da maior microestaca em função das doses de AIB.

Os resultados obtidos na condição *ex vitro* indicaram efeito das doses de AIB advindas do cultivo *in vitro*, sendo constatadas diferenças nas avaliações feitas em casa de vegetação, casa de sombra e em pleno sol.

A altura da muda na saída da casa de vegetação apresentou tendência linear crescente, sendo que a maior concentração de AIB (1,0 mg L⁻¹) esteve associada a maiores valores médios de altura das mudas (Figura 7A). No entanto, em condições de casa de sombra e em pleno sol, a altura das mudas tem maior valor quando se aplicam 0,91 e 0,80 mg L⁻¹ AIB, respectivamente.

As mudas apresentaram maior diâmetro do colo nas etapas *ex vitro* - casa de vegetação, casa de sombra e pleno sol - quando foram utilizadas as doses de 0,5 e 0,75 mg L⁻¹ na condição *in vitro* (Figura 7B). No entanto, para vigor, foram observados maiores valores nas maiores dosagens de AIB utilizadas na condição *in vitro* (Figura 7C).

A porcentagem de sobrevivência segue tendência quadrática para ambas as etapas *ex vitro*, sendo a maior porcentagem observada quando foram aplicados entre 0,81 e 0,94 mg L⁻¹ de AIB no cultivo *in vitro* (Figura 7D). Quanto à porcentagem de raiz observada na extremidade inferior do tubete, ela seguiu a mesma tendência exibida na casa de vegetação e sombra, pontos de máxima quando da aplicação de 0,67 e 0,65 mg L⁻¹ de AIB, Figura 7E, respectivamente.

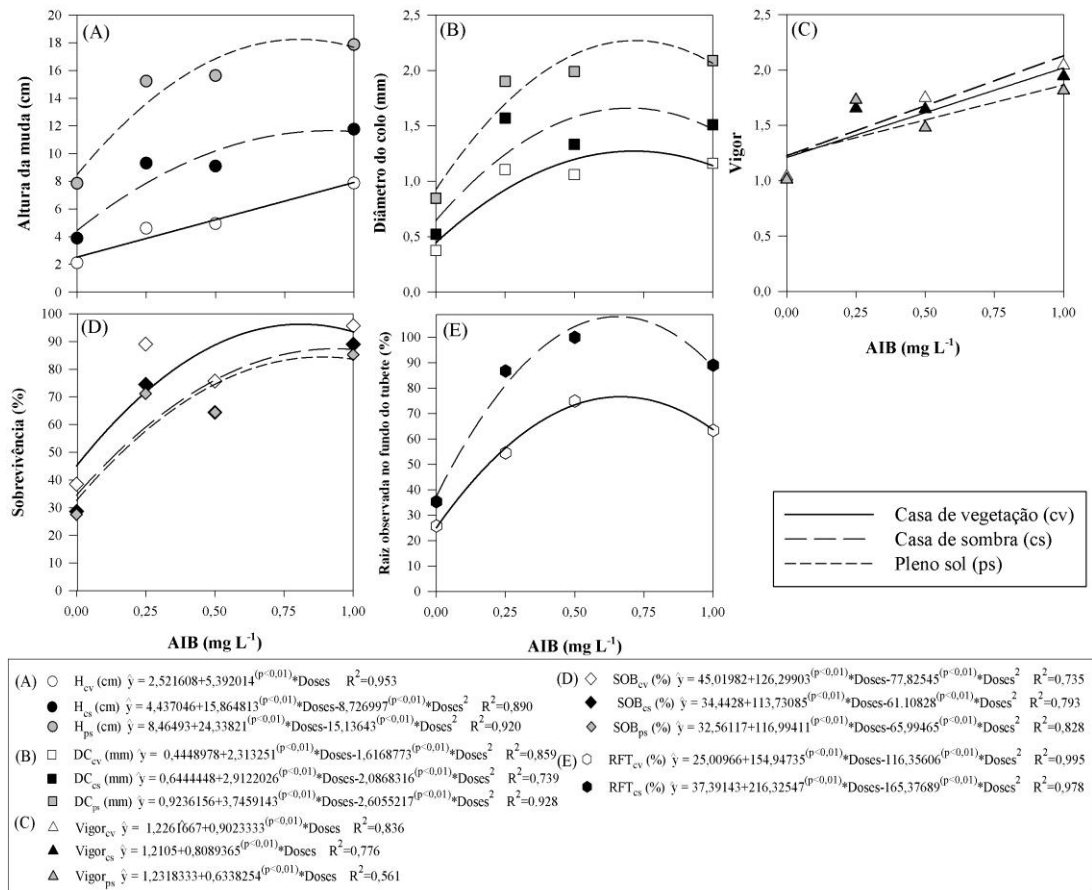


Figura 7. Características observadas na saída da Casa de vegetação (cv); Casa de sombra (cs) e Pleno sol (ps) em mudas do clone de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* em função das doses de AIB (0,0; 0,25; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹). (A) Altura da muda (cm); (B) Diâmetro do colo (mm); (C) Vigor; (D) Sobrevivência (%); e (E) Raiz observada na extremidade inferior do tubete (%).

O NR (Figura 8A) e o VR (Figura 8B), avaliados ao final da etapa de pleno sol, seguiram tendência quadrática em função das concentrações de AIB, mostrando pontos de máxima semelhantes entre si: para o NR, o ponto estimado foi de 0,67 mg L⁻¹; e para o VR, de 0,70 mg L⁻¹ de AIB.

A MSPA (Figura 8C) e a MSRA (Figura 8D) apresentaram comportamento polinomial de segundo grau em função das concentrações do regulador de crescimento, tendo os pontos de máxima produção de massa sido distintos: 0,75 mg L⁻¹ para a MSPA e 0,92 mg L⁻¹ para MSRA.

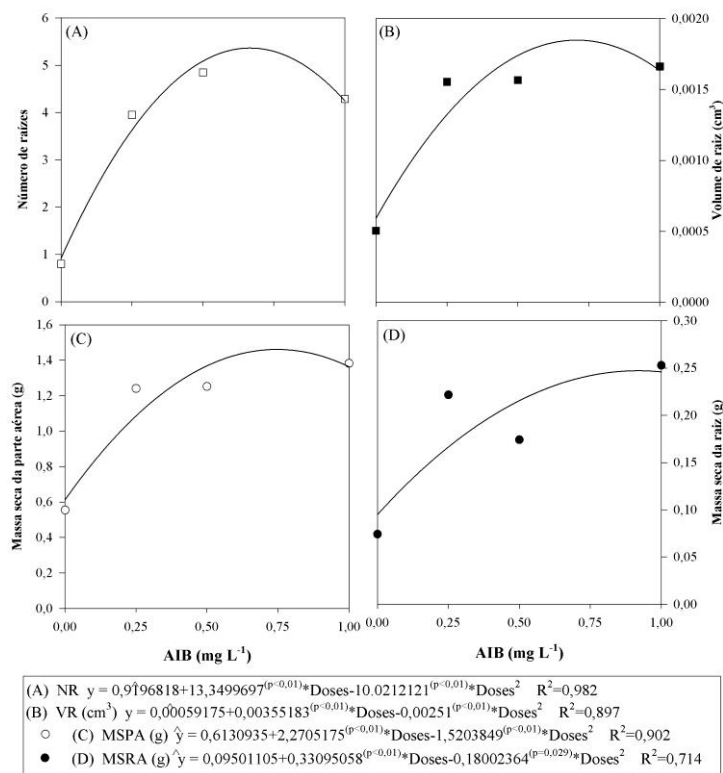


Figura 8. Características observadas em pleno sol em mudas do clone de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* em função das doses de AIB (0,0; 0,25; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹). (A) Número de raiz; (B) Volume de raiz (cm³); (C) massa seca da parte aérea; e (D) massa seca da raiz.

Fazendo inferência da sobrevivência no decorrer da aclimatização das microestacas, a sobrevivência na saída da casa de vegetação foi em média de 74,7 %, mostrando-se influenciada pelas doses de AIB *in vitro*, tendo uma maior sobrevivência sido estimada em 96,3 %, com a dose de 0,81 mg L⁻¹ AIB. Na saída da casa de sombra, as dosagens *in vitro* continuaram influenciando a sobrevivência das microestacas, em média 64,2 %, sendo estimada a dose ótima de 0,70 mg L⁻¹ AIB, apresentando 84,0 % de microestacas vivas. Em pleno sol, a sobrevivência média das microestacas foi de 62,1 %, ainda experimentando efeito residual do AIB, tendo ponto de máxima sobrevivência sido estimado com a aplicação de 0,89 mg L⁻¹ de AIB, com 84,0 % de microestacas vivas.

4. DISCUSSÃO

Nas condições experimentais *in vitro*, houve aumento do número de brotos do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* com, com decréscimo da produção a partir da quarta coleta, resultado esse também observado no clone de *Eucalyptus*

urophylla x *E. globulus*, independentemente da concentração de AIB. De acordo com Oliveira (2011) e Gómez et al. (2007), a variação da taxa de multiplicação está relacionada com as condições *in vitro*, e assim associada com a exposição excessiva aos reguladores de crescimento nos subcultivos, bem como relacionada ao balanço de citocininas e auxinas no meio de cultura, visto esse balanço ser bastante variável em função da espécie e do tipo de explante utilizado.

O número de brotos, em função das doses de AIB, mostrou para o clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* sua máxima produção no intervalo de 0,25 e 0,5 mg L⁻¹. Já para o clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, o aumento do número de brotos esteve associados a uma mais alta concentração de AIB. Segundo Hartmann et al. (2010), concentrações excessivas de auxina bem como seu tempo de exposição podem inibir o desenvolvimento de brotos e raízes, causando amarelecimento e queda das folhas, necrose e até mesmo morte do material vegetal.

Auxinas como AIB e ANA e citocininas como BAP são geralmente usadas em várias combinações para controle morfogênico durante a multiplicação de gemas adventícias em *Eucalyptus* (DEL PONTE et al., 2001; DUTRA et al., 2009). De acordo com Santos et al. (2004), o maior número de brotações para os explantes de *Eucalyptus urophylla* foi obtidos com tratamentos que continham 0,1 mg L⁻¹ de AIB + 0,1 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA + 0,05 mg L⁻¹ de BAP. Resultados semelhantes foram obtidos com o uso do AIB em brotações de *Eucalyptus globulus* ssp. *Maidenii*, que promoveu maior taxa de multiplicação em meio de cultura contendo 0,2 mg L⁻¹ de BAP + 0,02 mg L⁻¹ de AIB (SOTELO e MONZA, 2007).

Foi observado aumento na produção de microestacas com o decorrer das coletas para os clones avaliados, não havendo relato na literatura consultada sobre produção *in vitro* de microestacas ou brotos alongados, em coletas sucessivas.

No entanto, em se tratando de ambiente *ex vitro*, a produção de microestacas advindas de microcepas apresenta tendência cíclica, podendo estar relacionada com a exaustão temporária das microcepas, ocasionando menores produções (TITON et al., 2003), como também relacionada com a mudança de temperatura (ASSIS et al., 1992; XAVIER e COMÉRIO, 1996).

Maiores valores de comprimento da maior microestaca para o clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* foram constatados no intervalo de 0,25 a 0,50 mg L⁻¹ AIB, enquanto para o clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, o maior comprimento ocorreu na maior concentração testada (1,0 mg L⁻¹). A ausência do AIB

para ambos os clones proporcionou crescimento reduzido, corroborando trabalho de Oliveira (2011), em que a ausência de AIB proporcionou menores taxas de crescimento para os clones *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*.

A melhor concentração de AIB para o alongamento do *Eucalyptus globulus* ssp. *maidenii* foi promovida por 0,50 mg L⁻¹, obtendo quatro brotos alongados por explante com tamanho superior a 2 cm (SOTELO e MONZA, 2007). Várias respostas de comprimento das brotações foram observadas por Oliveira (2011), em que as concentrações ótimas variaram de 0,25 mg L⁻¹ até 1,0 mg L⁻¹ de AIB.

O uso de outro tipo de auxina para alongamento, caso do estudo com o clone *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii*, em que a utilização do ácido α -naftalenoacético (ANA) na faixa entre 0,25 e 0,75 mg L⁻¹ proporcionou os melhores resultados para alongamento das brotações, com valores médios de 1,1 e 2,4 cm (BRONDANI et al., 2009).

Santos et al. (2004), em estudo com *Eucalyptus urophylla*, obtiveram maior tamanho de mudas nos tratamentos com uso de 1,2 mg L⁻¹ de AIA + 0,08 mg L⁻¹ de BAP + 5 mg L⁻¹ de Tiamina HCl e uso de 0,1 mg L⁻¹ de AIB + 0,1 mg L⁻¹ de BAP, proporcionando valores médios entre 7,0 e 6,0 cm, respectivamente.

Para os dois clones, o vigor do material no decorrer das coletas apresentou redução. Wendling et al. (2003), avaliando subcultivos de minicepas, concluíram que os subcultivos não resultaram em aumento de vigor das minicepas, evidenciando certa tendência de redução com aumento dos subcultivos.

Para vigor do material em função das doses de AIB, os resultados foram bem distintos entre os clones. Para o clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, o material que recebeu os tratamentos com as dosagens intermediárias apresentou maior vigor. Já para o clone *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*, o material que recebeu as maiores doses apresentou o maior vigor, porém, ao aumentar o número de coleta, o vigor decresceu. De acordo com Oliveira (2011), os maiores vigos para os clones híbridos de *Eucalyptus* testados variaram com as dosagens entre 0,36 e 0,80 mg L⁻¹ AIB em meio MS, e em JADS, os pontos de máximo vigor foram superiores com a dosagem de a 0,60 mg L⁻¹ AIB.

As avaliações nas condições do ambiente *ex vitro* para os clones *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* mostram que os tratamentos que continham AIB no meio de cultura influenciaram na qualidade das

microestacas. Para o clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, as dosagens intermediárias de AIB advindas do sistema *in vitro* proporcionaram os melhores resultados; já para o clone *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*, doses mais elevadas de AIB apresentaram resultados satisfatórios, porém em algumas doses a porcentagem de enraizamento das microestacas decresceu. Em alguns casos, a resposta da planta à auxina endógena ou aplicada pode variar com a natureza do tecido e com a concentração desse regulador de crescimento já presente no propágulo. Aplicada em órgãos isolados, a auxina, dependendo de sua concentração, pode aumentar a resposta rizogênica até certo ponto, após o qual ocorre efeito inibitório (HARTMANN et al., 2010).

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho para os clones avaliados, pode-se concluir que: 1) houve alta produtividade de microestacas advindas de tufo de gemas no decorrer das coletas sucessivas, bem como foram ajustados os níveis de AIB para cada clone, variando de 0,25 a 0,50 mg L⁻¹ de AIB para o clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e de 0,75 a 1,0 mg L⁻¹ para o clone *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*; 2) nas condições *ex vitro*, houve efeito residual do regulador de crescimento AIB advindo da micropropagação, proporcionando alto percentual de emissão de raízes e sobrevivência das microestacas.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo suporte financeiro.

7. REFERÊNCIAS

ASSIS, T.F. Evolution of technology for cloning *Eucalyptus* in large scale. In: IUFRO INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 2001, Valdivia. **Proceedings...** Chile: EMBRAPA/ CNPF, 2001. p.22.

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

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

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**, n.48/49, p.107-116, 1995.

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

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

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

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

GÓMEZA, C.; RÍOSA, D.; SÁNCHEZ-OLATE, M. Efecto del subcultivo sucesivo sobre la caulo génesis adventicia de *Eucalyptus globulus*. **Bosque**, v.28, n.1, p.13-17, 2007.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; JUNIOR DAVIES, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8.ed. New Jersey: Englewood Clippis, 2010. 900 p.

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.

KIRDMANEE, C.; KITAYA, Y.; KOZAI, T. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.31, p.144-149, 1995.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation—environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of ornamental plants**, v.10, p.188–204, 2010.

OLIVEIRA, L.S.de. **Micropropagação, microestaquia e miniestaquia de clones híbridos de *Eucalyptus globulus***. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

OLIVEIRA, M.L.de.; XAVIER, A.; PENCHEL, R.M.; SANTOS, A.F.S. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis**, v.39, n.91, p.309-315, 2011.

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.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. 2014.

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

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

TITON, M.; XAVIER, A.; REIS, G.G.; OTONI, W.C. Eficiência das minicepas e microcepas na produção de propágulos de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v.27, n.5, p.619-625, 2003.

WENDLING, I.; XAVIER, A.; PAIVA, H.N.de. Influência da miniestaquia seriada no vigor de minicepas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v.27, n.5, p.611-618, 2003.

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. 279 p.

RECIPIENTES E SUBSTRATOS NA PRODUÇÃO DE MICROESTACAS PELA MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de microestacas em sistema de micropropagação via tufos de gemas axilares em clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, submetidas a diferentes tipos de recipientes e de substratos. Tufo contendo de seis a oito gemas diferenciadas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* estabelecidos *in vitro* foram utilizados em um primeiro trabalho testando recipientes (potes de polipropileno - 500 mL; frascos de vidro - 250 mL; Agripot[®] - 250 mL e troca gasosa; e pelo tubo de ensaio - 55 mL de capacidade) em meio semissólido JADS. Em um segundo trabalho, foram utilizados recipientes Agripot[®], contendo diferentes substratos (ágar; vermiculita de granulometria média e vermiculita:fibra de celulose na proporção 2:1). Foram avaliados o número de brotos maiores que 0,5 cm por tufo de gema, o número de microestacas produzidas maiores que 2 cm, o comprimento da maior microestaca (cm) e o vigor dos brotos. Com base nos resultados obtidos, o melhor recipiente para produção de microestacas maiores que 2 cm é o pote de polipropileno (500 mL). Quando se deseja maior produção por m², o frasco de vidro (250 mL) é mais vantajoso pela sua melhor possibilidade de adensamento. Os melhores substratos para produção de microestacas maiores que 2 cm, utilizando o recipiente Agripot[®], são ágar ou vermiculita.

Palavras-chave: Cultura de tecidos; propagação *in vitro*; propagação vegetativa.

1. INTRODUÇÃO

Entre as aplicações da micropropagação no setor florestal brasileiro, a produção de *Eucalyptus* por meio da microestaquia se tornou uma das técnicas mais importantes, tendo como princípio básico o rejuvenescimento clonal obtido *in vitro*. O uso da microestaquia possibilitou consideráveis ganhos de produtividade em viveiro, principalmente quanto ao aumento dos percentuais e à qualidade de enraizamento, bem como na redução do tempo para a formação da muda. No entanto, entre os fatores limitantes para o uso desta técnica em escala comercial, estão a dependência de estrutura física e operacional de um laboratório de cultura de tecidos, os protocolos ajustados para espécies e clones e o elevado custo de produção (XAVIER et al., 2013).

Para solução dos fatores limitantes dessa técnica, tem sido enfatizada a necessidade de estudos básicos para a maximização da produção de microestacas em *Eucalyptus*. Entre esses fatores, estão o tamanho dos frascos para desenvolvimento das culturas, que é de grande importância, visto o espaço de cultivo influenciar na composição da fase gasosa do frasco, e, conseqüentemente, o crescimento e o desenvolvimento das culturas (XIAO et al., 2011).

Diversos trabalhos já foram realizados visando ao melhor desenvolvimento de seus cultivos em diferentes tamanhos e formas de recipientes, entre os quais: frascos de vidro de 438 mL para o cultivo de *Vitis vinifera* (MONETTE, 1983); frascos de vidro de 125 mL para *Actinidia chinensis* (MONETTE, 1986); recipientes de 250 mL para *Gossypium hirsutum* e *Gossypium arboreum* (HAZRA et al., 2000); tubos de ensaio de tamanho médio e grande para *Pfaffia glomerata* (NICOLOSO e ERIG, 2002); e frascos de 100 mL em cultivo de *Dendrobium nobile* (MORAES et al., 2010).

Outro fator necessário para maximização da produção é a natureza do substrato, no qual se dará o enraizamento *in vitro*, visto que influencia consideravelmente na qualidade das plantas (AFREEN-ZOBAYED et al., 2000). O uso convencional do ágar como agente gelificante traz alguns inconvenientes, como redução do coeficiente de oxigênio, afetando a diferenciação e o desenvolvimento da parte aérea e radicular, maior dificuldade de circulação e absorção dos nutrientes no meio de cultura e limitação de algumas espécies de plantas para determinadas marcas de ágar (KIRDMANEE et al., 1995; ICHIMURA e ODA, 1998; SCHOLTEN e

PIERIK, 1998). Sendo assim, materiais alternativos como a vermiculita e materiais fibrosos como celulose têm sido apresentados como alternativas para aumentar a produtividade e diminuir os custos de produção (AFREEN-ZOBAYED et al., 2000).

Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de microestacas em sistema de micropropagação via proliferação de gemas axilares do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, submetidas a tipos de recipientes e de substratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo *in vitro*

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, localizado no município de Viçosa/MG.

Tufos contendo de seis a oito gemas diferenciadas foram obtidos da micropropagação do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, estabelecido *in vitro* por 25 subcultivos em condições heterotróficas, em tubos de ensaio contendo 10 mL meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995), adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose (Vetec[®]), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma[®]), 800 mg L⁻¹ de PVP-30 (polivinilpirrolidona - Vetec[®]), 0,5 mg L⁻¹ de BAP (6- benzilaminopurina – Sigma[®]), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma[®]) e 7 g L⁻¹ de ágar (Merck[®]). Posteriormente, os tufos foram transferidos para o mesmo tipo de recipiente e meio de cultura, reduzido apenas de 0,5 mg L⁻¹ para 0,3 mg L⁻¹ de BAP. Para ambas as etapas, o pH foi ajustado em 5,8 com HCl 1 M ou NaOH 1 M antes da adição do ágar, tendo o meio de cultura sido esterilizado em autoclave 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 ± 2 °C por um fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de 33 μmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro (LI-COR[®], LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram[®], Brasil).

2.2 Tratamentos envolvendo recipientes

Após 30 dias em meio de cultivo para multiplicação, os tufos contendo de seis a oito gemas diferenciadas foram transferidos para recipientes, constituídos por potes de polipropileno (500 mL de capacidade), frascos de vidro (250 mL de capacidade), Agripot[®] (250 mL de capacidade com troca gasosa) e pelo tubo de ensaio (55 mL de capacidade). A quantidade de meio de cultura em cada recipiente foi variável de acordo com o número de explantes, consistindo em 100 mL e 10 tufos para o pote de polipropileno; 40 mL e 4 tufos para o frasco de vidro; 30 mL e 3 tufos para o Agripot[®]; e 10 mL e 1 tufo para o tubo de ensaio.

O meio de cultura utilizado foi o JADS, adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP-30, 0,05 mg L⁻¹ de BAP, 0,25 mg L⁻¹ de AIB e 7 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado em 5,8 com HCl 1 M ou NaOH 1 M antes da adição do ágar, e o meio, autoclavado a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 20 minutos. Os recipientes foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C por um fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de 33 μmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro LI-COR[®], LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram[®], Brasil).

2.3 Tratamentos envolvendo substratos em sistema Agripot[®]

Após 30 dias em meio de cultivo para multiplicação, os tufos contendo de seis a oito gemas diferenciadas foram transferidos para o recipiente Agripot[®], contendo substratos constituídos por: 1) sistema tradicional em meio semissólido com uso de ágar; 2) meio líquido e o uso de vermiculita de granulometria média (30 %); e 3) meio líquido e uma mistura vermiculita:fibra de celulose lavada na proporção 2:1. O meio de cultura utilizado foi o JADS, adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP-30, 0,05 mg L⁻¹ de BAP, 0,25 mg L⁻¹ de AIB e adicionado 7 g L⁻¹ de ágar apenas para o substrato contendo o meio semissólido. O pH foi ajustado em 5,8 com HCl 1 M ou NaOH 1 M, e o meio, autoclavado a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 20 minutos. Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C por um fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de 33 μmol m⁻² s⁻¹, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40W, Osram[®], Brasil).

2.4 Delineamento experimental

Os experimentos foram instalados com base no delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para o experimento com recipientes de cultivo, foram testados quatro tipos - pote de polipropileno, frasco de vidro, Agripot[®] e tubo de ensaio - com quatro repetições, contendo em cada sistema uma quantidade de tufos de gemas diferenciadas. Já para o experimento com substrato, foram testados três tipos - ágar, vermiculita, e vermiculita:fibra de celulose - com cinco repetições, contendo em cada parcela (Agripot[®]) três tufos de gemas diferenciadas.

Os dados foram analisados em software R, versão 3.0.3 (R Core Team, 2014), com auxílio do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA et al., 2013) Os dados apresentaram distribuição normal perante o teste de Shapiro-Wilk ao nível de 5 % de significância, e para variáveis significativas, foi feito o teste Tukey a 5 % de significância.

2.5 Avaliações experimentais

Após 35 dias de cultivo com a aplicação dos tratamentos, foram feitas avaliações quanto ao número de brotos maior que 0,5 cm por tufo de gema, número de microestacas produzidas maiores que 2 cm, comprimento da maior microestaca (cm) e vigor dos brotos, avaliados com base em uma escala de notas variando de 1 (Baixo), 2 (Médio) e 3 (Alto). Além dessas avaliações, no experimento com recipientes, foram estimados o número de brotos maiores que 0,5 cm m⁻² e o número de microestacas produzidas maiores que 2 cm m⁻², considerando o arranjo dos respectivos recipientes no espaço de 1 m²; no experimento com substrato, foram analisadas a porcentagem de emissão de raiz, massa fresca e seca da parte aérea e massa fresca e seca da raiz.

3. RESULTADOS

3.1 Tratamentos envolvendo recipientes

Com base nos resultados obtidos, os recipientes utilizados apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) quanto ao número de brotos maiores que 0,5 cm (NB >

0,5 cm), número de brotos maiores que 0,5 cm m⁻² (NB > 0,5 cm m⁻²), número de microestacas maiores que 2 cm (NM > 2 cm), número de microestacas maiores que 2 cm m⁻² (NM > 2 cm m⁻²) e comprimento do maior broto. No entanto, a característica vigor não apresentou diferença significativa (p > 0,05) para os recipientes testados.

A produção de brotos maiores que 0,5 cm apresentou diferença entre os recipientes de cultivo (Figura 1A), tendo o pote de polipropileno (500 mL) média de 52 brotos, que superior aos frascos de vidro (250 mL), do Agripot[®] (250 mL) e do tubo de ensaio (55 mL).

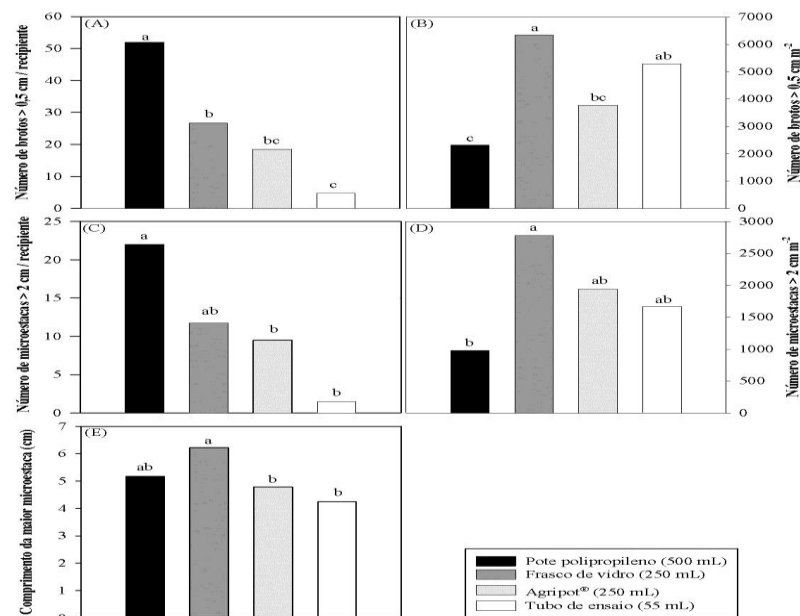


Figura 1. Características observadas na micropropagação do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em diferentes recipientes. (A) Número de brotos > 0,5 cm; (B) Número de brotos > 0,5 cm m⁻²; (C) Número de microestacas > 2 cm; (D) Número de microestacas > 2 cm m⁻²; e (E) Comprimento da maior microestaca. *Médias com uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

No entanto, quando se compara a produção de brotos maiores que 0,5 cm m⁻² (Figura 1B), o recipiente que mais produz é o frasco de vidro, com média de 6.331 brotos m⁻², superior ao pote de polipropileno (2.311 brotos m⁻²). O tubo de ensaio produziu em média 5.277 brotos m⁻², não diferindo do frasco de vidro, enquanto o Agripot[®] apresentou 3.775 brotos m⁻², não diferindo da produção do tubo de ensaio como também do pote de polipropileno.

Com relação ao número de microestacas maiores que 2 cm, houve diferenças significativas entre os recipientes, Figura 1C, apresentando o pote de polipropileno

maior média de microestacas (22 microestacas por pote), sendo o Agripot[®] e o tubo de ensaio os recipientes que apresentaram a menor produção (9,5 e 1,5 microestacas, respectivamente), enquanto o frasco de vidro não apresentou diferença em relação aos demais recipientes.

Ao comparar a produção de brotos maiores que 2 cm com a produção de microestacas maiores que 2 cm m⁻², Figura 1D, há uma mudança na escala de produção, sendo o pote de polipropileno o recipiente com a menor produção (9.770 microestacas m⁻²), diferindo apenas do frasco de vidro (2.781 microestacas m⁻²). Os demais recipientes não apresentaram diferença de produção tanto do frasco de vidro quanto do pote de polipropileno.

O comprimento da maior microestaca (CMM) apresentou diferença estatística apenas entre o frasco de vidro e os recipientes Agripot[®] e tubo de ensaio (Figura 1E). O frasco de vidro proporcionou maior crescimento das microestacas se comparado ao Agripot[®] e ao tubo de ensaio; já o comprimento das microestacas no pote de polipropileno não apresentou diferença entre os recipientes testados.

3.2 Tratamentos envolvendo substratos em sistema Agripot[®]

Os substratos testados promoveram diferenças significativas ($p < 0,05$) quanto ao número de microestacas maiores que 2 cm (NM > 2 cm), comprimento da maior microestaca (CMM), vigor, massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da raiz (MFRA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSRA) e porcentagem de raiz (% Raiz). Somente a característica número de brotos maiores que 0,5 cm (NB > 0,5 cm) não apresentou efeito dos substratos testados (Figura 2).

O NM > 2 cm seguiu a mesma tendência, sendo os substratos ágar ou vermiculita superiores estatisticamente ($p < 0,05$) ao substrato vermiculita:fibra de celulose. A produção por Agripot[®] apresentou 9,6, 5,6 e 1,2 microestacas maiores que 2 cm utilizando como substrato ágar, vermiculita e vermiculita:fibra de celulose, respectivamente (Figura 2A).

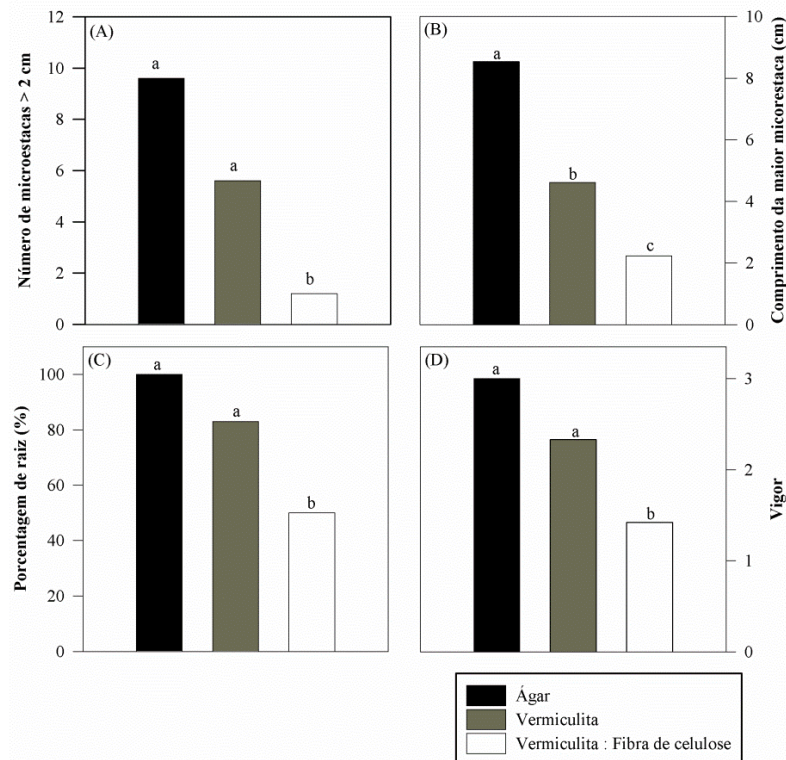


Figura 2. Características observadas na micropropagação do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em diferentes substratos. (A) Número de microestacas > 2 cm; (B) Comprimento da maior microestaca; (C) Porcentagem de emissão de raiz; e (D) Vigor. *Médias seguidas de uma mesma não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Para o comprimento da maior microestaca (CMM), o cultivo com ágar foi superior estatisticamente em relação aos demais (Figura 2B), apresentando em média um comprimento de 8,5 cm, seguido do uso de vermiculita com 4,6 cm e por último o substrato com vermiculita:fibra de celulose, em média, com 2,2 cm por microestaca, sendo este tratamento estatisticamente inferior aos demais.

A porcentagem de emissão de raiz no substrato para os tratamentos com ágar ou vermiculita como substratos não apresentaram diferenças estatísticas entre si, Figura 2C, compreendendo 100 % e 83 % de emissão, respectivamente; já o uso de vermiculita:fibra de celulose apresentou em média 50 % de enraizamento, sendo estatisticamente inferior aos demais substratos.

O padrão adotado para vigor apresentou diferença estatística entre o uso de vermiculita:fibra de celulose e os demais tratamentos, Figura 2D, sendo seu vigor inferior (1,4); já os tratamentos com o uso de ágar ou vermiculita como substrato apresentaram vigores estatisticamente semelhantes, com notas de 3,0 e 2,3, respectivamente.

Os tratamentos com ágar ou vermiculita, Figuras 3A e 3B, apresentaram microestacas mais vigorosas, em maior quantidade e comprimento, bem como maior presença de raízes, ao contrário do que ocorreu no tratamento com o uso de vermiculita:fibra de celulose, Figura 3C, em que as microestacas apresentaram menores tamanhos e produção, tendo presença de calos foliares.

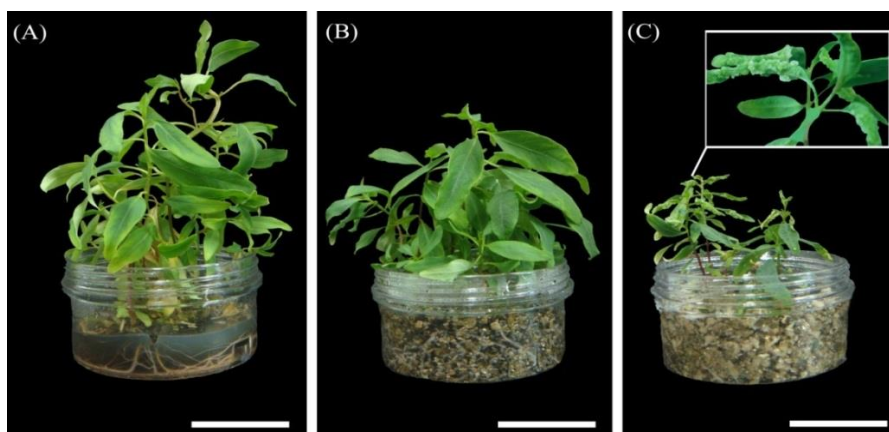


Figura 3. Plantas do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em sistema Agripot[®] durante a fase de alongamento em diferentes substratos. **(A)** Ágar + Meio semissólido JADS; **(B)** Vermiculita + Meio líquido JADS; e **(C)** Vermiculita:fibra de celulose + Meio líquido JADS. No detalhe, presença de calos foliares. Barras: 30 mm.

A massa fresca da parte aérea (MFPA) das plantas cultivadas no substrato vermiculita:fibra de celulose (0,489 g) foi estatisticamente inferior à cultivada em ágar (2,183 g) e em vermiculita (1,695 g) (Figura 4), porém, ao comparar ágar e vermiculita, não houve diferença significativa de MFPA. Para produção de massa seca da parte aérea (MSPA), o substrato ágar (0,426 g) foi superior aos demais substratos testados, tendo o substrato com vermiculita apresentado peso intermediário (0,292 g), enquanto o sistema com vermiculita:fibra de celulose apresentou valores inferiores aos demais.

Para a massa fresca radicular (MFRA), as plantas cultivadas no substrato contendo vermiculita apresentaram maior média (0,696 g), enquanto no substrato constituído de vermiculita:fibra de celulose, foi obtido o menor valor (0,077 g), ficando o sistema ágar como intermediário (0,506 g) (Figura 4). Entretanto, quando comparado à sua massa seca radicular (MSRA), o sistema ágar mostrou-se significativamente superior aos demais (0,105 g), enquanto a vermiculita e a mistura

vermiculita:fibra de celulose não apresentaram diferença, com média de 0,038 e 0,011 g, respectivamente.

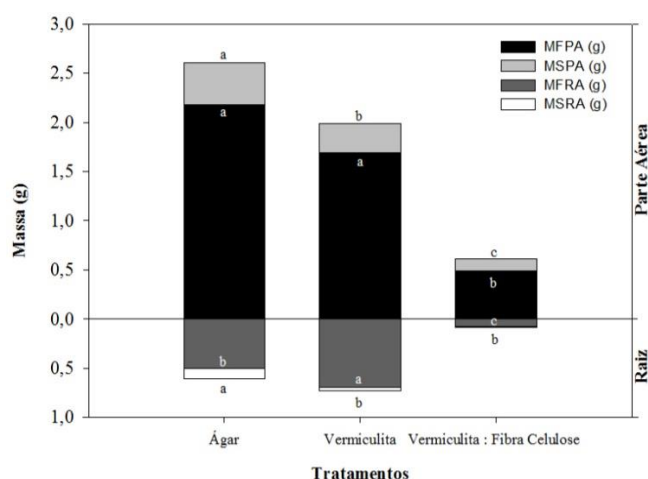


Figura 4. Características observadas no cultivo *in vitro* do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em diferentes substratos. MFPA: Massa fresca da parte aérea (g); MSPA: Massa seca da parte aérea (g); MFRA: Massa fresca da raiz; e MSRA: Massa seca da raiz. *Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

4.1 Tratamentos envolvendo recipientes

Comparando a produtividade de brotos > 0,5 cm com a de microestacas > 2 cm no recipiente, sem levar em consideração o espaço que ele ocupa, os recipientes de volumes maiores produziram maiores valores em relação às características em questão.

McClelland e Smith (1990), trabalhando com cinco espécies florestais, obtiveram os melhores resultados de produção de microestacas em recipientes de maiores volumes como magentas de 350 mL e frascos de vidro de 200 mL, sendo superiores ao tubo de ensaio de 60 mL.

Alguns trabalhos também apresentam as maiores produções *in vitro* em recipientes de maiores volumes (MONETTE, 1983; HAZRA et al., 2000). Esses resultados podem estar ligados a fatores ambientais internos que afetam o desenvolvimento dos explantes, em que menores frascos tendem a apresentar reduzidas concentrações de dióxido de carbono e elevadas concentrações de etileno,

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

Os fatores citados acima podem limitar o fluxo de fótons fotossinteticamente ativos, diminuir a taxa de transpiração e de fotossíntese bem como causar menor absorção de água e nutrientes, apresentando uma redução da taxa de crescimento e desenvolvimento dos explantes (NGUYEN e KOZAI, 2005; ZOBAYED, 2006; XIAO et al., 2011).

O recipiente Agripot[®] não apresentou bons resultados se comparado com o frasco de vidro e o pote de polipropileno. Trabalhando com *Eucalyptus camaldulensis*, Zobayed et al. (2000) obtiveram ganhos em massa e taxa fotossintética no recipiente que apresentava trocas gasosas, se comparados com os cultivados em sistema fechado com utilização de Magentas[®], com tampas rígidas.

Em contrapartida, quando se estima a produção de brotos $> 0,5 \text{ cm m}^{-2}$ e de microestacas $> 2 \text{ cm m}^{-2}$, o maior frasco (pote de 500 mL) passa a ser o que menos produz, se comparado com os outros recipientes. Este fato está relacionado ao espaço ocupado pelo recipiente na bancada, pois os menores recipientes são mais fáceis de serem organizados na bancada, e os menores frascos podem ser mais adensados, apresentando maior número de tufo de gemas m^{-2} , logo, maior produtividade por área.

4.2 Tratamentos envolvendo substratos em sistema Agripot[®]

Os melhores resultados para número de microestacas $> 2 \text{ cm}$, porcentagem de emissão de raízes e vigor são observados nos substratos do sistema ágar e o de vermiculita com exceção do comprimento da maior microestaca, apresentando somente o sistema ágar como superior. Os resultados inferiores em todas as características avaliadas são observados no sistema com uso de vermiculita:fibra de celulose. Maiores valores de massa fresca e seca da parte aérea bem como radicular são observados também no ambiente com ágar e com vermiculita, e menores massas são observadas no sistema com vermiculita:fibra de celulose.

Para Khan et al. (2002), o uso de Florialite[®] (substrato à base de vermiculita e fibra de celulose) não apresentou resultados promissores para o *Eucalyptus tereticornis* em comparação com o sistema convencional (ágar). Esses autores concluíram que a altura da parte aérea, número de novos segmentos nodais gerados

por explante e o coeficiente de multiplicação foram significativamente maiores em condições fotomixotróficas (ágar com 30 g L⁻¹ de sacarose e incremento de 400–450 μmol mol⁻¹ de CO₂) do que sob diversas condições culturais fotoautotróficas (ágar com incremento 400–450 e 1400–1500 μmol mol⁻¹ de CO₂ e Florialite[®] com incremento de 400–450 μmol mol⁻¹ de CO₂).

Kirdmanee et al. (1995), no cultivo fotoautotrófico de *Eucalyptus camaldulensis* com substratos alternativos (sistema ágar, Gelrite[®], rede de plástico, e vermiculita), encontraram melhores resultados de crescimento no substrato com uso de vermiculita, seguido da rede de plástico, Gelrite[®] e Ágar.

Fica evidente a grande variação de repostas segundo a espécie e o objetivo do trabalho, de acordo com os substratos inseridos, porém a utilização de substratos alternativos desempenha importante papel no processo de micropropagação (AFREEN et al., 1999).

Substratos com maiores porosidades podem influenciar na melhor formação de um sistema radicular, enquanto, no ágar, evidências mostram haver anormalidades estruturais dos tecidos radiculares (KATAOKA, 1994). Há evidências, também, de que, dependendo da natureza física e química do substrato, a capacidade de enraizamento e de crescimento também pode ser afetada (ZOBAYED et al., 2000).

O uso de substratos, como no caso da fibra de celulose, pode acarretar maior dificuldade de inoculação dos explantes, devido à sua textura, podendo, muitas vezes, os explantes apresentar dificuldades de se manter no meio, ocasionando menores taxas de crescimento (AFREEN et al., 1999).

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho para o clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, pode-se concluir que: 1) o melhor recipiente para produção de microestacas maiores que 2 cm é o pote de polipropileno (500 mL); 2) quando se deseja maior produção por m², o frasco de vidro (250 mL) é mais vantajoso pela sua melhor possibilidade de adensamento; e 3) os melhores substratos para produção de microestacas maiores que 2 cm, utilizando o recipiente Agripot[®], são ágar ou vermiculita.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo suporte financeiro.

7. REFERÊNCIAS

AFREEN, 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 and Developmental Biology – Plant**, v.35, p.470–474, 1999.

AFREEN-ZOBAYED, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KUBOTA, C.; KOZAI, T.; HASEGAWA, O. A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. **Plant Science**, v.157, p.225–231, 2000.

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**, n.48/49, p.107-116, 1995.

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

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, p.505-510, 2000.

ICHIMURA, K.; ODA, M. Stimulation of root growth of several vegetables by extracts from a commercial preparation of agar. **Journal of the Japanese Society for Horticultural**, v.67, n.3, p.341–346, 1998.

KATAOKA, I. Influence of rooting substrates on the morphology of papaya root formed *in vitro*. **Journal of Tropical Agriculture**, v.38, p.251–257, 1994.

KHAN, P.S.S.V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, p.141–146, 2002.

KIRDMANEE, C.; KITAYA, Y.; KOZAI, T. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.31, p.144-149, 1995.

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.

MONETTE, P.L. Influence of size of culture vessel on *in vitro* proliferation of grape in a liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.2, p.327-332, 1983.

MONETTE, P.L. Micropropagation of Kiwifruit using non-axenic shoot tips. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.6, p.73-82, 1986.

MORAES, C.P.de.; DIOGO, J.A.; CANABRAVA, R.I.; PEDRO, N.P.; FURTADO, A.L.F.F.; MARTELINE, M.A. Desenvolvimento *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lind. (Orchidaceae) em recipientes de diferentes volumes. **Revista Brasileira de Biociências**, v.8, n.2, p.225-228, 2010.

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**. Dordrecht: Springer, 2005. p.123-146.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Edição Especial, p.1499-1506, 2002.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. 2014.

SCHOLTEN, H.J.; PIERIK, R.L.M. Agar as a gelling agent: differential biological effects *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.77, n.1-2, p.109-116, 1998.

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

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

ZIMMERMAN, R.H. Environmental effects and their control in plant tissue culture - review. **Acta Horticulturae**, v.393, p.11-14, 1995.

ZOBAYED, S. Aeration in plant tissue culture. In: DUTTA GUPTA, S.; IBARAKI, Y. (Ed.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, 2006. p.313-327.

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. **Annals of Botany**, v.85, p.587-592, 2000.

SACAROSE E TROCAS GASOSAS NA PRODUÇÃO DE MICROESTACAS PELA MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*

RESUMO - O sistema de micropropagação convencional em recipientes fechados é caracterizado por elevada umidade relativa, elevada concentração de etileno e baixos níveis de CO₂, interferindo diretamente na taxa fotossintética das plantas *in vitro* e em seu processo de aclimatização *ex vitro*. Diferentes métodos têm sido utilizados para contornar os problemas advindos deste sistema, entre eles o uso de tampas com membranas porosas com ventilação natural, uso de tampas com membranas porosas e ventilação forçada, bem como a redução e/ou até mesmo a exclusão da fonte de sacarose no meio, proporcionando condições fotomixotróficas e fotoautotróficas. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de trocas gasosas e concentrações de sacarose na produtividade de microestacas oriundas de micropropagação via proliferação de gemas axilares em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Tufos contendo de seis a oito gemas diferenciadas de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* estabelecidos *in vitro* foram transferidos para frascos de vidro - 250 mL, com e sem membrana porosa em meio semissólido JADS, com três concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹). Nas condições *in vitro*, foram avaliados o número de brotos maiores que 0,5 cm por tufo de gema, o número de microestacas produzidas maiores que 2 cm, o comprimento da maior microestaca (cm) e o vigor dos brotos. Já nas condições *ex vitro*, foram avaliados a altura da muda, sobrevivência, diâmetro do colo (mm), emissão de raiz e vigor. O uso de 15 g L⁻¹ de sacarose apresenta os melhores resultados. O sistema com troca gasosa atua negativamente no comprimento da maior microestaca. Na condição *ex vitro*, foi constatada influência dos tratamentos feitos *in vitro*.

Palavras-chave: Propagação *in vitro*, membranas porosas, microestaquia, propagação vegetativa.

1. INTRODUÇÃO

Visando à rápida produção de plântulas com alta qualidade nutricional e fisiológica, a propagação vegetativa por meio da micropropagação tornou-se uma tecnologia com grande potencial de utilização em escala comercial. No entanto, essa tecnologia ainda está limitada em decorrência dos altos custos de produção, atribuídos principalmente à baixa taxa de crescimento, a perdas devidas à contaminação, a desordens fisiológicas e morfológicas bem como à baixa porcentagem de sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização *ex vitro* (MAJADA et al., 2002; KOZAI, 2010; LAIA et al., 2014).

A maioria dos fatores supracitados estão relacionados direta ou indiretamente às características heterotróficas ou fotomixotróficas do crescimento das plantas *in vitro*, visto que, em um sistema de micropropagação convencional, a sacarose no meio de cultura é a principal ou única fonte de carbono e energia para o crescimento e o desenvolvimento das plantas (XIAO et al., 2011).

O sistema de micropropagação convencional em recipientes fechados é caracterizado por elevada umidade relativa, elevada concentração de etileno e baixos níveis de CO₂, causando problemas anatômicos, interferindo diretamente na taxa fotossintética das plantas *in vitro* e em seu processo de aclimatização *ex vitro* (TANAKA et al., 2005; ARAGÓN et al., 2010; ALVAREZ et al., 2012).

Diferentes métodos têm sido utilizados para solucionar as dificuldades da micropropagação convencional, entre eles o uso de tampas com membranas porosas com ventilação natural (BATISTA, 2012; IAREMA et al., 2012; SALDANHA et al., 2012), o uso de tampas com membranas porosas e ventilação forçada (PINHEIRO et al., 2013, SALDANHA et al., 2013) bem como a redução e/ou até mesmo a exclusão da fonte de sacarose no meio, proporcionando condições fotomixotróficas e fotoautotróficas (MOHAMED e ALSADON, 2010; SALDANHA et al., 2014). A adoção dessas técnicas de redução ou exclusão da fonte de sacarose no meio bem como o uso de membranas porosas com ventilação natural ou forçada têm proporcionado, com sucesso, redução da umidade relativa do ar no interior dos frascos de cultivo e aumento significativo da troca gasosa com a atmosfera exterior, conseqüentemente, aumentando a transpiração e a efetiva absorção de água e nutrientes pela planta, melhorando seu processo de aclimatização *ex vitro* (HAZARIKA, 2006; IVANOVA e VAN STADEN, 2010, XIAO et al., 2011).

Trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de reduzir o custo de produção bem como aumentar a produtividade de mudas de *Eucalyptus* produzidas *in vitro* e melhorar seu processo de aclimatização *ex vitro*. Khan et al. (2002) indicaram que o uso do sistema fotomixotrófico para *Eucalyptus tereticornis* apresentou os melhores resultados das características de crescimento; já o sistema fotoautotrófico com ventilação forçada se mostrou superior para o *Eucalyptus camaldulensis* em trabalho desenvolvido por Kirdmanee et al. (1995). Com o uso da ventilação forçada, houve redução da umidade interna do recipiente bem como aumento da taxa fotossintética em plantas de *Eucalyptus camaldulensis in vitro*, tendo ocorrido maior sobrevivência das mudas nas condições *ex vitro* (ZOBAYED et al., 2000).

Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de trocas gasosas e concentrações de sacarose na produtividade de microestacas oriundas de micropropagação via proliferação de gemas axilares em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo *in vitro*

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, localizado no município de Viçosa/MG.

Tufos contendo de seis a oito gemas diferenciadas foram obtidos da micropropagação do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, estabelecidos *in vitro* com 25 subcultivos em condições heterotróficas, em tubos de ensaio contendo 10 mL meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995), adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose (Vetec[®]), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma[®]), 800 mg L⁻¹ de PVP-30 (polivinilpirrolidona - Vetec[®]), 0,5 mg L⁻¹ de BAP (6 - benzilaminopurina – Sigma[®]), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma[®]) e 7 g L⁻¹ de ágar (Merck[®]). Posteriormente, os tufos foram transferidos para o mesmo tipo de recipiente e meio de cultura, reduzido apenas de 0,5 mg L⁻¹ para 0,3 mg L⁻¹ de BAP (Sigma[®]). Para ambas as etapas, o pH foi ajustado em 5,8 antes da adição do ágar, e o meio de cultura esterilizado em autoclave a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 20 minutos. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento com

temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de $33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (quantificada por radiômetro LI-COR®, LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram®, Brasil).

2.2 Tratamentos com trocas gasosas e concentrações de sacarose

Após 30 dias em meio de cultivo para multiplicação, os tufo contendo de seis a oito gemas diferenciadas foram transferidos para frascos de vidro (250 mL), sendo submetidos a duas formas de vedação: tampas rígidas de polipropileno (TRP), ou seja, sem trocas gasosas; e tampas de polipropileno com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas de 0,45 μm (MilliSeal® AVS-045 Air Vent), possibilitando as trocas gasosas. O meio de cultura utilizado foi o JADS, constituído de três concentrações de sacarose (0; 15 ou 30 g L^{-1}), 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 800 mg L^{-1} de PVP-30, 0,05 mg L^{-1} de BAP, 0,25 mg L^{-1} de AIB (Sigma®) e 7 g L^{-1} de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado em 5,8 com HCl 1 M ou NaOH 1 M, antes da adição do ágar, e autoclavado a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C, por 20 minutos. Os frascos de vidro foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de $33 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram®, Brasil).

2.3 Enraizamento *ex vitro* das microestacas

Os experimentos foram conduzidos no Viveiro de Pesquisas do Departamento de Engenharia Florestal da UFV.

Microestacas maiores que dois centímetros do clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* foram obtidas dos tufo de gemas dos tratamentos com e sem troca gasosa e diferentes concentrações de sacarose nas condições *in vitro*. Essas microestacas foram transferidas em uma caixa de isopor para o viveiro, em placas de Petri contendo duas folhas de papel filtro umedecido com água.

As microestacas de cada tratamento (com e sem troca gasosa e 0; 15e 30 g L^{-1} de sacarose) foram plantadas em tubetes plásticos de 55 cm^3 de capacidade, contendo substrato comercial (Tropstrato Vida Verde®) e vermiculita de granulometria média na proporção de (1:1), adicionado de 5 kg m^{-3} de superfosfato simples (Heringer®),

tendo sido essas microestacas acondicionadas em casa de vegetação climatizada (temperatura de 20 a 30 °C e umidade relativa do ar ≥ 80 %). Nos primeiros 10 dias em casa de vegetação, foi mantida uma cobertura com Aluminet (50 %) sobre as microestacas a uma altura de 20 cm das mudas, visando a seu melhor acondicionamento.

Após 20 dias de permanência na casa de vegetação, o material foi transferido para aclimatização em casa de sombra, sendo nesse momento feita a adubação de cobertura, constituída pela aplicação de 2 mL por muda de fosfato monoamônico (MAP) na concentração de 2 g L⁻¹. As mudas permaneceram em casa de sombra (50 % de sombreamento) por 10 dias, sendo em seguida transferidas para pleno sol, aplicando 5 mL por muda do formulado NPK 20-5-20 (Heringer[®]), na concentração de 6 g L⁻¹, permanecendo nessa condição por mais 30 dias. As aplicações das adubações foram feitas por meio de uma seringa dosadora automática (Hoppner[®]), com capacidade de 50 mL.

2.4 Avaliações experimentais *in vitro* e *ex vitro*

Sob condições *in vitro*, foram feitas avaliações quanto ao número de brotos maiores que 0,5 cm por tufo de gema, número de microestacas produzidas maiores que 2 cm, comprimento da maior microestaca (cm) e vigor dos brotos, avaliados com base em uma escala de notas, variando de 1 (Baixo), 2 (Médio) e 3 (Alto), 30 dias após a aplicação dos tratamentos.

Nas condições *ex vitro*, foram avaliados na saída da casa de vegetação e de sombra a altura da muda (H, cm), o diâmetro do colo (DC, mm), a porcentagem de sobrevivência (SOB, %), a porcentagem da ocorrência de raiz observadas na extremidade inferior do tubete (RFT, %) bem como o vigor das mudas, avaliado com base em uma escala de notas, variando de 1 (Baixo), 2 (Médio) e 3 (Alto). Ao final de 60 dias, na condição de pleno sol, foram feitas as medições da altura da muda (H, cm), diâmetro do colo (DC, mm), porcentagem de sobrevivência (SOB, %), número de raízes (NR), volume de raiz (VR, cm³), vigor das mudas variando de 1 (Baixo), 2 (Médio) e 3 (Alto), massa seca da parte aérea (MSPA, g) e massa seca da raiz (MSRA, g).

2.5 Delineamento experimental das condições *in vitro* e *ex vitro*

Na condição *in vitro*, o experimento foi constituído em arranjo fatorial 2x3, sendo testados dois tipos de tampas de polipropileno (tampa rígida – sem trocas gasosas; e tampa com duas membranas porosas – com trocas gasosas) com a adição de três concentrações de sacarose ao meio de cultivo (0; 15 e 30 g L⁻¹), disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições contendo quatro tufo de gemas diferenciadas por parcela.

Já nas condições *ex vitro*, o experimento foi disposto em um delineamento em blocos ao acaso (DBC), sendo os tratamentos das condições *in vitro* que apresentaram microestacas maiores que dois centímetros (0 g L⁻¹ de sacarose com trocas gasosas; 15 g L⁻¹ de sacarose com e sem trocas gasosas; e 30 g L⁻¹ de sacarose com e sem trocas gasosas), totalizando cinco tratamentos em quatro blocos, com número variável de plantas, de acordo com os resultados obtidos *in vitro* em cada tratamento.

Os dados foram analisados em software R, versão 3.0.3 (R Core Team, 2014), com auxílio do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (Ferreira et al, 2013). Os dados apresentaram distribuição normal perante o teste de Shapiro-Wilk ao nível de 5 % de significância. Para as características que se apresentaram significativas, foi feito o teste Tukey.

3. RESULTADOS

As características de crescimento observadas *in vitro* para o clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* apresentaram seus fatores (trocas gasosas e concentrações de sacarose) atuando de forma independente.

O número de brotos maiores que 0,5 cm (NB > 0,5 cm), o número de microestacas maiores que 2 cm (NM > 2 cm), o comprimento da maior microestaca (CMM, cm) e o vigor foram afetados significativamente ($p < 0,05$) pelas concentrações de sacarose. Já o uso de tampas rígidas (sem trocas gasosas) e com membranas (com trocas gasosas) afetou significativamente ($p < 0,05$) apenas o comprimento da maior microestaca (CMM, cm). Nas condições *ex vitro*, as características que tiveram efeito significativo ($p < 0,05$) foram a altura da muda (H, cm) na saída da casa de vegetação e casa de sombra, a sobrevivência das mudas

(SOB, %) na saída da casa de vegetação, casa de sombra e pleno sol e o volume de raiz (VR, cm³) em pleno sol.

O número de brotos > 0,5 cm foi afetado significativamente pelas concentrações de sacarose. A adição de 15 g L⁻¹ proporcionou a maior produção de brotos, apresentando diferença significativa em relação às concentrações 30 g L⁻¹ e 0 g L⁻¹ de sacarose, ambas com redução da produção de brotos (Figura 1A).

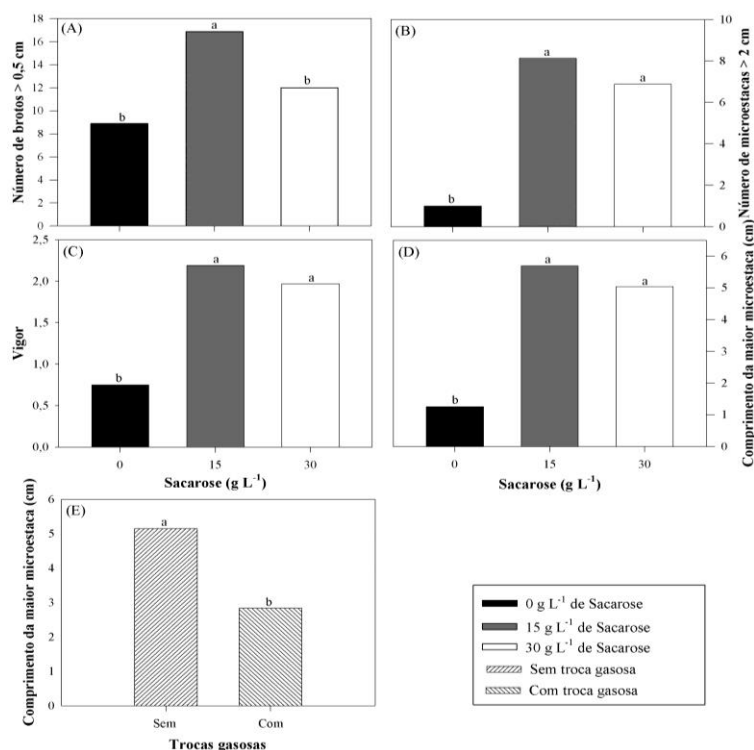


Figura 1. Características observadas no cultivo *in vitro* pela micropropagação do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em diferentes concentrações de sacarose (0; 15 e 30 g L⁻¹) e sem e com troca gasosa, em 30 dias de cultivo. **(A)** Número de brotos > 0,5 cm em função das concentrações de sacarose; **(B)** Número de microestacas > 2 cm em função das concentrações de sacarose; **(C)** Vigor em função das concentrações de sacarose; **(D)** Comprimento da maior microestaca em função das concentrações de sacarose; e **(E)** Comprimento da maior microestaca em função das trocas gasosas. Obs.: Médias com uma mesma letra em cada figura não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade.

Com relação ao número de microestacas > 2 cm, a adição de 15 g L⁻¹ de sacarose apresentou em média 8,1 microestacas > 2 cm, e com 30 g L⁻¹ de sacarose, houve produção de 6,9 microestacas, sendo que ambos os tratamentos foram estatisticamente iguais e superiores ao tratamento sem adição de sacarose (0 g L⁻¹) obtendo esse tratamento média de 1,0 microestaca > 2 cm (Figura 1B).

O vigor das microestacas mostrou a mesma tendência que o $NM > 2$ cm, tendo sido os melhores resultados para os tratamentos com 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose, mostrando-se diferentes estatisticamente para ausência de sacarose (0 g L⁻¹) (Figura 1C). As notas obtidas foram (2,2) para 15 g L⁻¹ de sacarose, seguida de 2,0 para 30 g L⁻¹ e 0,8 para 0 g L⁻¹ de sacarose.

Apresentando resultados semelhantes às características anteriores, o uso de 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose foi significativamente superior ao não uso de sacarose no meio (0 g L⁻¹) para o comprimento da maior microestaca, Figura 1D, com comprimentos variando em 5,7 cm para o uso de 15 g L⁻¹, 5,0 cm para o uso de 30 g L⁻¹ e 1,3 cm para o tratamento com 0 g L⁻¹ de sacarose.

A maioria das características observadas não foi influenciada pelos ambientes com e sem trocas gasosas, no entanto, o uso de tampas rígidas proporcionou maior comprimento de microestacas, Figura 1E, com valores médios de 5,2 cm, sendo estatisticamente superior ao uso de tampas com membranas, que apresentou comprimento médio de 2,8 cm.

Ao usar tampas rígidas (sem troca gasosa) (Figura 2A), houve maior acúmulo de umidade no espaço interno e maior oxidação do meio semissólido nos tratamentos com uso de sacarose. Já ao usar tampas com membranas porosas, não houve acúmulo de umidade em seu espaço interno, Figura 2B, proporcionando expansão no tamanho das folhas e maior retração do meio semissólido pela perda de água.

Os tratamentos aplicados *in vitro* apresentaram efeito nas condições *ex vitro*, para a altura da muda, sendo a maior altura para as condições da saída da casa de vegetação (5,9 cm) encontrada no tratamento com 15 g L⁻¹ de sacarose e sem trocas gasosas, tendo diferença significativa com os tratamentos de 0 g L⁻¹ e 15 g L⁻¹ de sacarose e com trocas gasosas, apresentando alturas de 3,5 e 3,6 cm, respectivamente (Figura 3A). Seguindo a mesma tendência, o tratamento *in vitro* que proporcionou maior altura de mudas na saída da casa de sombra foi o 15 g L⁻¹ de sacarose e sem troca gasosa, com média de 6,2 cm, mostrando-se superior ao tratamento 0 g L⁻¹ de sacarose e troca gasosa, com média de 4,3 cm de altura. A pleno sol, a altura das mudas não foi afetada pelos tratamentos aplicados *in vitro*.

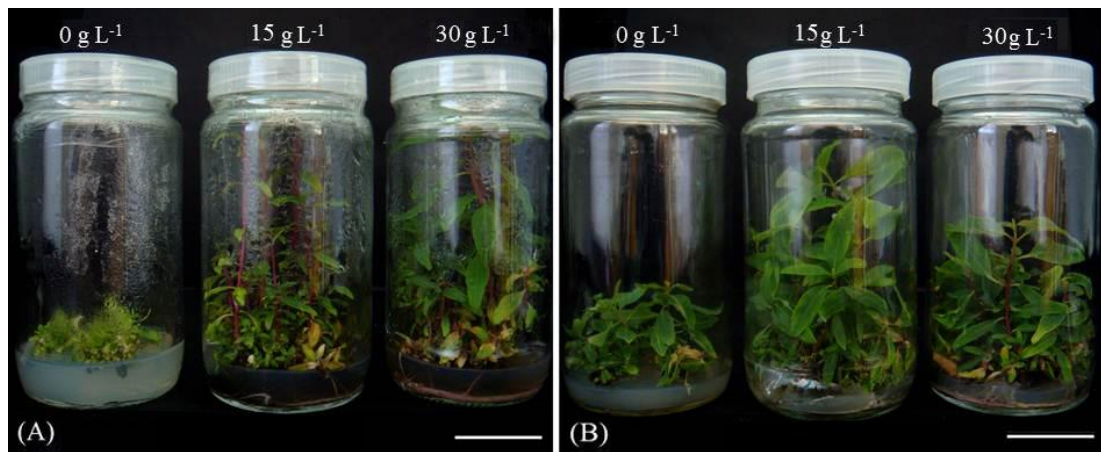


Figura 2. Plantas do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* aos 30 dias de cultivo *in vitro* pela micropropagação, submetidas a concentrações de sacarose com e sem troca gasosa durante a fase de alongamento. **(A)** Tampas rígidas sem troca gasosa + Meio semissólido JADS com concentrações de sacarose; **(B)** Tampas com dois orifícios e membranas porosas com troca gasosa + Meio semissólido JADS com concentrações de sacarose. Obs.: Barras: 30 mm.

Os tratamentos aplicados *in vitro* também influenciaram a sobrevivência das mudas, apresentando elevadas porcentagens de sobrevivência para todas as etapas *ex vitro*. Pode-se observar estabilidade de sobrevivência entre a saída da casa de vegetação, casa de sombra e pleno sol, havendo um decréscimo somente para o tratamento com 30 g L⁻¹ de sacarose e sem troca gasosa na casa de sombra (Figura 3B). O tratamento que proporcionou 100 % de sobrevivência das mudas foi com 30 g L⁻¹ de sacarose e com troca gasosa, mostrando-se estatisticamente superior ao tratamento com 0 g L⁻¹ de sacarose e com troca gasosa, que apresentou 62,5 % de sobrevivência das mudas.

O volume de raiz obtido na fase final (pleno sol) apresentou influência dos tratamentos *in vitro*. O tratamento com 0 g L⁻¹ de sacarose e trocas gasosas apresentou-se estatisticamente superior ao tratamento com 15 g L⁻¹ de sacarose e sem trocas gasosas, tendo volumes radiculares de 0,000875 cm³ e 0,000558 cm³, respectivamente (Figura 1C).

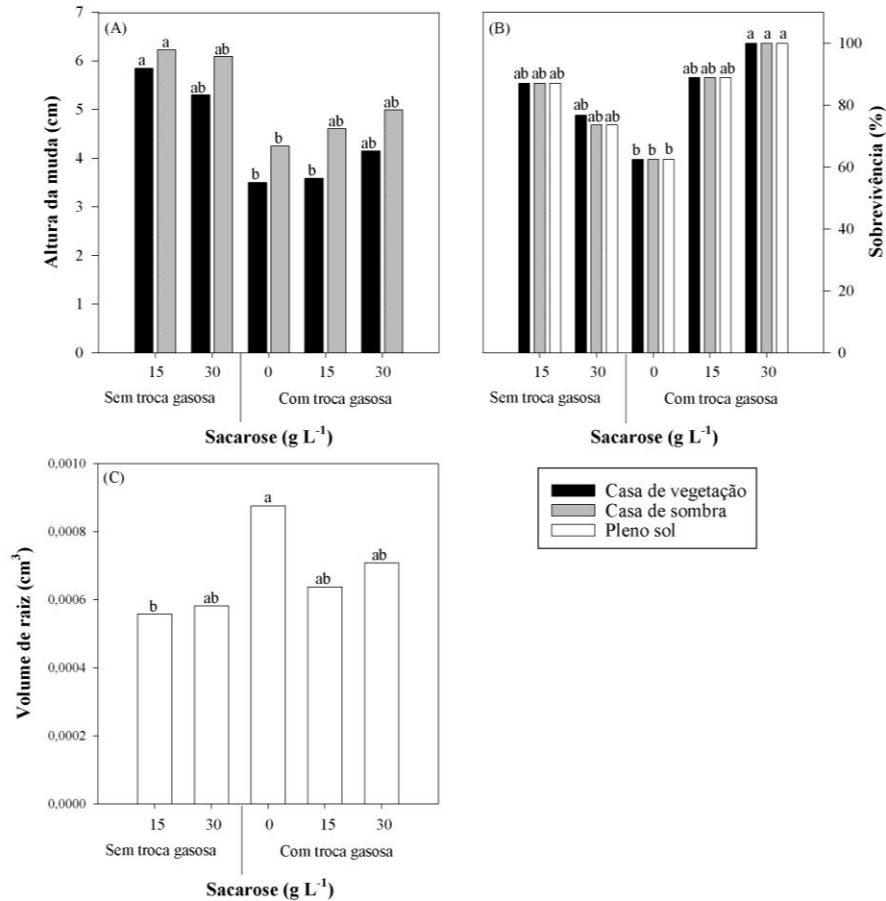


Figura 3. Características observadas no cultivo *ex vitro* (casa de vegetação, casa de sombra e pleno sol) do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* com efeito dos tratamentos *in vitro* de diferentes concentrações de sacarose (0; 15 e 30 g L⁻¹) e sem e com trocas gasosas. **(A)** Altura da muda (cm) na saída da casa de vegetação e casa de sombra; **(B)** Sobrevivência (%) na saída da casa de vegetação, casa de sombra e pleno sol; e **(C)** Volume de raiz (cm³) em pleno sol. Obs.: Médias seguidas de uma mesma letra em cada figura e cada condição não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

Para as características avaliadas, os maiores valores foram observados com o uso de 15 g L⁻¹ de sacarose, concentração essa que apresenta redução desse componente no meio, visto o emprego usual de sacarose na micropropagação de *Eucalyptus* ser de 30 g L⁻¹. Diversos trabalhos relatam o uso de 30 g L⁻¹ de sacarose no processo de micropropagação, sendo responsável pela multiplicação ou alongamento de *Eucalyptus* spp. (BRONDANI et al., 2009; BORGES et al., 2011; NAVROSKI et al., 2013).

Os sistemas com e sem troca gasosa não influenciaram a maioria das características observadas para o clone em questão. Resultados semelhantes foram encontrados em trabalho de Oliveira et al. (2014), não tendo havido diferença entre o sistema sem e com injeção de ar em biorreatores de imersão temporária no processo de multiplicação *in vitro* do clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

Os sistemas de propagação *in vitro* com uso de membranas porosas permitem a troca de gases entre a atmosfera externa e interna dos frascos através da ventilação natural, desde que a concentração de CO₂ seja adequada, resultando em aumento no crescimento (KOZAI, 2010). No entanto, o uso do sistema com troca gasosa afetou o comprimento das microestacas, tendo os maiores valores de comprimento em sistema fechado, resultado que contrasta com diversos estudos com a aplicação de manejo *in vitro* de ambientes gasosos.

Em trabalho de Khan et al. (2002), as maiores médias de multiplicação e comprimento de brotos na micropropagação de *Eucalyptus tereticornis* ocorreram em sistema fotomixotrófico com 30 g L⁻¹ de sacarose em meio semissólido. Já para Kirdmanee et al. (1995), as maiores médias dos parâmetros de crescimento *in vitro* de *Eucalyptus camaldulensis* ocorreram em sistema fotoautotrófico enriquecido com CO₂ (ventilação forçada), se comparado com o sistema não enriquecido (ventilação natural).

Embora a maioria das características de crescimento não tenha apresentado diferença entre o uso de tampas rígidas e tampas com membrana, alguns fatores puderam ser observados, entre os quais, o mais evidente foi a presença de água condensada na parede interna dos frascos sem troca gasosa.

De acordo com Batista (2012), o acúmulo de água na parede dos frascos sem troca gasosa evidencia maior umidade relativa no interior dos recipientes, reduzindo o uso de tampas com membranas porosas esse teor de umidade. Sendo assim, o uso de membranas porosas na propagação *in vitro* apresenta uma forma de reproduzir as condições ambientais *ex vitro* pela manutenção das trocas gasosas e das concentrações adequadas de CO₂ e pela redução da umidade relativa no seu interior (XIAO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2013; PINHEIRO, 2014).

Efeitos dos tratamentos *in vitro* foram observados na altura das mudas em casa de vegetação e sombra, no volume de raiz das mudas em pleno sol como também na sobrevivência das mudas em todas as fases *ex vitro*. As maiores alturas foram observadas nos tratamentos *in vitro* sem troca gasosa e com adição de

sacarose, sendo esses os tratamentos que proporcionaram as maiores alturas das mudas em casa de vegetação e sombra, porém esses resultados se igualaram com os demais tratamentos em pleno sol.

As maiores médias de porcentagens de sobrevivência das mudas foram observadas em sistema fotomixotrófico. Zobayed et al. (2000) e Shim et al. (2003) relatam que o uso de membranas porosas é capaz de melhorar o processo de aclimatização, aumentando sua porcentagem de sobrevivência. E esta condição está relacionada com a diminuição da perda de água durante a transferência para condições *ex vitro*, devido à elevada deposição de cera epicuticular e à produção de estômatos funcionais (MAJADA et al., 2002; CHANDRA et al., 2010).

Em trabalho de Zobayed et al. (2000), o sistema de ventilação forçada apresentou taxa de sobrevivência de 86 % das plantas de *Eucalyptus camaldulensis*, enquanto o sistema com ventilação natural proporcionou 46 % de sobrevivência. Os autores puderam observar maior proporção de murcha nas plantas submetidas à condição *ex vitro* no tratamento com ventilação natural. Já no sistema com ventilação forçada, houve murcha, porém em poucas horas as plantas se recuperaram. Sendo assim, os autores relatam que o sucesso da sobrevivência *ex vitro* está diretamente ligado à alta taxa fotossintética e à baixa umidade relativa no interior dos frascos, proporcionando ambiente com trocas gasosas.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho para o clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, pode-se concluir que: 1) o uso de 15 g L⁻¹ de sacarose apresenta os melhores resultados para as características analisadas; 2) não há diferença entre o sistema fechado e o sistema com troca gasosa para a maioria das características observadas, no entanto, a troca gasosa atua negativamente para o comprimento da maior microestaca; e 3) na condição *ex vitro*, constata-se influência dos tratamentos feitos *in vitro*.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo suporte financeiro.

7. REFERÊNCIAS

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, p.237-244, 2010.

BATISTA, D.S. **Influência de trocas gasosas, do etileno e de poliaminas na morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental (*Capsicum annuum* L.)**. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.de.; LOPES, A.P.; OTONI, W.C. Multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, v.35, n.2, p.173-182, 2011.

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

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**, n.48/49, p.107-116, 1995.

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

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

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

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

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulators**, v.60, p.143-150, 2010.

KHAN, P.S.S.V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, p.141–146, 2002.

KIRDMANEE, C.; KITAYA, Y.; KOZAI, T. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.31, p.144-149, 1995.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of ornamental plants**, v.10, p.188–204, 2010.

LAIA, M.L.de.; GERHARDT, I.R.; ABAD, J.I.M.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; GONÇALVES, J.F.; MISSIAGGIA, A.A. A biotecnologia e o eucalipto do futuro. In: VALE, A.B.do.; MACHADO, C.C.; PIRES, J.M.M.; VILAR, M.B.; COSTA, C.B.; NACIF, A.de.P. (Ed). **Eucaliptocultura no Brasil: silvicultura, manejo e ambiência**. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 2014. p.39-67.

MAJADA, J.P.; FALL, M.A.; TADEO, F.; SANCHEZ-TAMES, R. Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllus* L. cultured *in vitro*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.38, p.272–278, 2002.

MOHAMED, M.A.H.; ALSADON, A.A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, v.123, p.295–300, 2010.

NAVROSKI, M.C.; REINIGER, L.R.S.; PEREIRA, M.de.O.; CURTI, A.R.; PAIM, A.F. Alongamento *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Cerne**, v.19, n.4, p.545-550, 2013.

OLIVEIRA, M.L.de.; XAVIER, A.; PENCHEL FILHO, R.M.; REIS, J.P.dos. Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Ciência Florestal**, v.24, n.1, p.37-45, 2014.

PINHEIRO, M.V.M. **Potencial fotoautotrófico em *Etilingera elatior* 'Porcelana' e embriogênese somática em *Anthurium andraeanum* 'Eidibel': caracterização anatômica e da expressão do gene SERK**. 2014. 129 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

PINHEIRO, M.V.M.; MARTINS, F.B.; XAVIER, A.; OTONI, W.C. Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Árvore**, v.37, p.19-29, 2013.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. 2014.

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, 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 CO₂-enriched atmosphere improves in vitro growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.49, p.433-444, 2013.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; ROCHA, D.I.; CAVATTE, P.C.; DETMANN, K.D.S.C.; TANAKA, F.A.O.; DIAS, L.L.C.; DA MATTA, F.M.; OTONI, W.C. CO₂-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.

SHIM, S.W.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. *In vitro* and *ex vitro* growth of grapevine rootstock '5BB' as influenced by number of air exchanges and the presence or absence of sucrose in culture media **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.75, n.1, p.57-62, 2003.

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, p.2337-2343, 2005.

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

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. **Annals of Botany**, v.85, p.587-592, 2000.

**DENSIDADE DE MICROCEPAS, QUALIDADE DE LUZ E SUBSTRATO NA
PRODUÇÃO DE MICROESTACAS NA MICROPROPAGAÇÃO DE
Eucalyptus grandis x *E. urophylla***

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi avaliar a produtividade de microestacas em sistema de micropropagação via microcepas em clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, submetido a diferentes posições de origem das microcepas, densidade de microcepas, qualidade de luz e substratos. No primeiro experimento, as brotações alongadas *in vitro*, maiores que dois centímetros (microestacas), advindas da fase de alongamento do clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, foram seccionadas em segmento nodal contendo um par de gemas ativas e classificadas em microcepas de origem basal, microcepas de origem mediana e microcepas de origem apical. No segundo experimento, foram testadas densidades de uma, duas, três e quatro microcepas de origem basal em recipientes do tipo Magentas[®], submetidas a três qualidades de iluminação sendo, duas lâmpadas fluorescentes tubulares (2F) e duas (2L) e quatro (4L) lâmpadas diodo emissor de luz – LED. No terceiro estudo, microcepas de origem basal foram mantidas nos substratos ágar, areia, vermiculita e uma proporção de composto orgânico e vermiculita. Foram avaliados o número de brotos maiores que 0,5 cm por microcepa, o número de microestacas produzidas maiores que 2 cm, o comprimento da maior microestaca (cm) e o vigor. No experimento de posição de origem das microcepas, foi analisada também a porcentagem de emissão de raízes, e no experimento do tipo de substratos, foram analisadas a porcentagem de emissão de raiz, a massa seca da parte aérea e a massa seca da raiz. Com base nos resultados obtidos, as microcepas oriundas de segmentos nodais basais de microestacas proporcionaram maior número de brotos bem como maior enraizamento. A densidade de três ou quatro microcepas por recipiente proporcionou os melhores resultados, e a iluminação 4L proporcionou maior vigor para as microestacas. O uso de ágar ou vermiculita apresentou as maiores médias para as características analisadas, porém o uso de ágar proporcionou baixas porcentagens de emissão de raízes nas microcepas.

Palavras-chave: Cultura de tecidos; propagação *in vitro*; propagação vegetativa.

1. INTRODUÇÃO

A micropropagação de plantas tem se tornado prática corrente na produção comercial de muitas espécies vegetais economicamente importantes, entre elas o *Eucalyptus*, pelo processo de microestaquia (SINGH et al., 2013; WANG et al., 2013, XAVIER et al., 2013). No entanto, sua aplicação generalizada e sua produção em larga escala ainda têm sido restringidas pelo seu alto custo de produção e exigência de mão de obra especializada (TEIXEIRA, 2002; BE e DEBERGH, 2006; TOMAR et al., 2007). Diante disso, muito esforço tem sido despendido para reduzir os custos de produção de plantas comerciais, utilizando as técnicas de cultura de tecidos (KURIA et al., 2008).

Diversas tecnologias vêm sendo propostas com o intuito de automatizar o processo da micropropagação, entre elas; inovações no ambiente de cultivo, como recipientes alternativos permitindo trocas gasosas; uso de substratos alternativos ao sistema semissólido como o ágar; novas fontes de iluminação à base de diodos – LEDs; e automatização das operações dos sistemas de cultura e de procedimentos rotineiros, como preparo de meio, repicagem e aclimatização (AFREEN et al., 1999; PENCHEL et al., 2007).

Trabalhos envolvendo a micropropagação de *Eucalyptus* spp. vêm sendo desenvolvidos desde o processo de estabelecimento (BRONDANI et al., 2009; OLIVEIRA, 2011; BORGES et al., 2012), multiplicação (ANDRADE et al., 2006; BORGES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011), alongamento (BRONDANI et al., 2009; NAVROSKI et al., 2013), aclimatização e enraizamento (XAVIER e COMÉRIO, 1997; BANDEIRA et al., 2007). Porém, ainda há necessidade de maior conhecimento do tipo e da origem do explante bem como da densidade de plantio nos recipientes *in vitro* para maximização da produção de microestacas de *Eucalyptus*, com objetivo de tornar o processo economicamente viável.

O uso do ágar como agente gelificante traz alguns inconvenientes, como redução de coeficiente de oxigênio afetando a diferenciação do desenvolvimento dos tecidos, dificuldade de circulação dos nutrientes no meio de cultura e limitação de algumas espécies de plantas para determinadas marcas de ágar (KIRDMANEE et al., 1995; ICHIMURA e ODA, 1998; SCHOLTEN e PIERIK, 1998).

O conhecimento da natureza do substrato com o uso de materiais alternativos porosos como a vermiculita tem sido apresentado, melhorando o processo de

enraizamento *in vitro*, influenciando diretamente na qualidade das plantas, refletindo no aumento da produtividade bem como na redução dos custos de produção (AFREEN-ZOBAYED et al., 2000).

O uso de lâmpadas fluorescentes brancas tem sido comum como fonte de luz em praticamente todos os laboratórios de cultura de tecidos (ROCHA et al., 2010), entretanto, nos últimos anos, as lâmpadas diodos de emissão de luz (LEDs) vêm sendo aplicadas, trazendo como vantagens baixa geração de calor, alta eficiência luminosa, longo período de vida e comprimentos de onda específicos (YEH e CHUNG, 2009).

Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produtividade de microestacas em sistema de micropropagação via microcepas em clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, submetido a diferentes posições de origem das microcepas, densidade de microcepas, qualidade de luz e substrato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo *in vitro*

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, localizado no município de Viçosa/MG.

Tufos contendo de seis a oito gemas diferenciadas foram obtidos da micropropagação do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, estabelecido *in vitro* por 25 subcultivos em condições heterotróficas, em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995), adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma[®]), 800 mg L⁻¹ de PVP-30 (polivinilpirrolidona - Vetec[®]), 0,5 mg L⁻¹ de BAP (6- benzilaminopurina – Sigma[®]), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma[®]) e 7 g L⁻¹ de ágar (Merck[®]). Posteriormente, os tufos foram transferidos para o mesmo tipo de recipiente e meio de cultura, reduzido apenas de 0,5 mg L⁻¹ para 0,3 mg L⁻¹ de BAP (Sigma[®]). O pH foi ajustado em 5,8 antes da adição do ágar, e o meio de cultura, esterilizado em autoclave 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 ± 2 °C por um fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de 33 μmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro (LI-COR[®]),

LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram[®], Brasil).

2.2 Alongamento das gemas

Após 30 dias em meio de cultivo para multiplicação, os tufos contendo de seis a oito gemas diferenciadas foram transferidos para frascos de vidro (250 mL de capacidade). O meio de cultura utilizado foi o JADS, adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP-30, 0,05 mg L⁻¹ de BAP, 0,25 mg L⁻¹ de AIB (Sigma[®]) e 7 g L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado em 5,8 antes da adição do ágar, e o meio, autoclavado a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 20 minutos. Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C por um fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de 33 μmol m⁻² s⁻¹, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram[®], Brasil).

2.3 Posição de origem das microcepas

Brotações alongadas *in vitro* maiores que cinco centímetros (microestacas), advindas das condições anteriores, foram seccionadas em segmento nodal contendo no mínimo um par de gemas ativas e classificadas em microcepas de origem basal, microcepas de origem mediana e microcepas de origem apical (Figura 1). Em seguida, cada origem foi separada e transferida para potes de polipropileno (500 mL), contendo 10 microcepas em cada pote com 100 mL de meio semissólido. O meio de cultura utilizado foi o JADS, adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP-30, 0,05 mg L⁻¹ de BAP, 0,25 mg L⁻¹ de AIB e adicionado 7 g L⁻¹ de ágar apenas para o substrato contendo o meio semissólido. O pH foi ajustado em 5,8, e o meio, autoclavado a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 20 minutos. Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C por um fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de 33 μmol m⁻² s⁻¹, fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tubulares (Luz do Dia Especial, 40 W, Osram[®], Brasil).

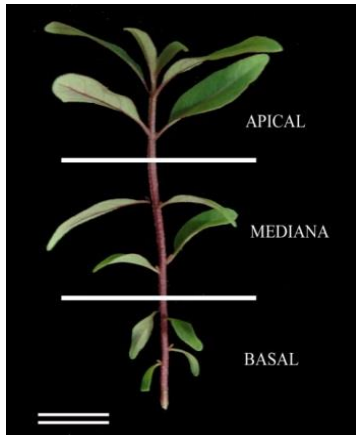


Figura 1. Microcepas em diferentes posições de origem (basal, mediana e intermediária) em microestacas *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Barra = 1 cm.

2.4 Densidade de microcepas e qualidade de luz

Microcepas de origem basal (no mínimo um segmento nodal contendo um par de gemas ativas) foram obtidas de brotações alongadas (microestacas > 5 cm) advindas do meio de alongamento. Foram testadas densidades de uma, duas, três e quatro microcepas por recipiente, do tipo Magentas[®] de policarbonato GA7 (Sigma Chemical Company, EUA). O meio de cultura utilizado foi o JADS, adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP-30, 0,05 mg L⁻¹ de BAP, 0,25 mg L⁻¹ de AIB e adicionado 7 g L⁻¹ de ágar apenas para o substrato contendo o meio semissólido. O pH foi ajustado em 5,8, e o meio, autoclavado a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 20 minutos. Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C por um fotoperíodo de 16 horas, sendo testados três tipos de irradiâncias (quantificada por radiômetro, LI-COR[®], LI-250A Light Meter), sendo: 2F - duas lâmpadas fluorescentes tubulares (irradiância de 33,21 μmol m⁻² s⁻¹, Luz do Dia Especial, 40 W, Osram[®], Brasil); 2L - duas lâmpadas diodo emissor de luz - LED, do tipo luminária de alumínio anodizado com lente linear de mistura de cores com 2 canais independentes no vermelho 660 nm e no azul 450 nm (irradiância 33,21 μmol m⁻² s⁻¹, 19 W, LabLumens); e 4L - quatro lâmpadas LEDs, do tipo tubular, composto por 13 LEDs na cor vermelha (660 nm) e 5 LEDs na cor azul (450 nm) (irradiância 88,12 μmol m⁻² s⁻¹, Tec-Lamp-660/450-120 cm, 36 W, Tecnal). Os espectros de luz foram obtidos por espectrorradiômetro (Ocean Optics Spectra-Suite, Ocean Optics, Dunedin, FL) (Figura 2).

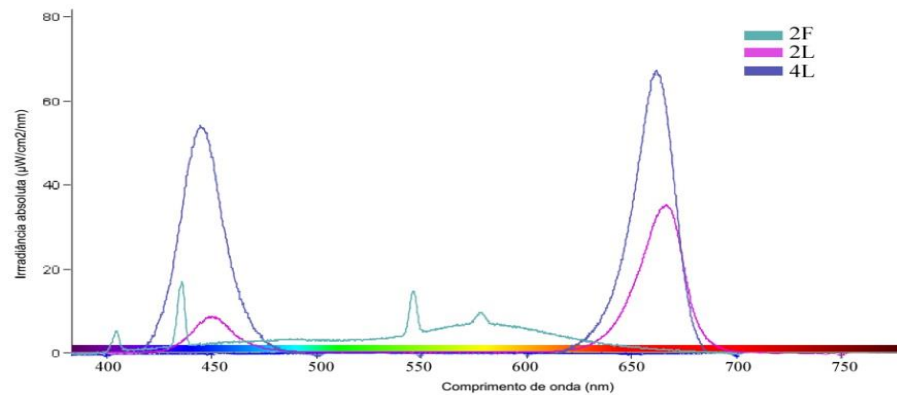


Figura 2. Variações da irradiância absoluta ($\mu\text{W cm}^{-2} \text{nm}^{-1}$) e do comprimento de onda (nm) de luz emitido pelas lâmpadas utilizadas em microcepas *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **(2F)** duas lâmpadas fluorescentes; **(2L)** e **(4L)** duas e quatro lâmpadas diodo emissor de luz (LED), respectivamente.

2.5 Substratos

Quatro microcepas de origem basal (um segmento nodal contendo um par de gemas ativas) foram obtidas de brotações alongadas (microestacas > 5 cm) advindas do meio de alongamento, tendo sido transferidas em Magentas[®], contendo diferentes substratos, constituídos pelo sistema tradicional em meio semissólido com uso de ágar; meio líquido e o uso de vermiculita de granulometria média (30 %); meio líquido e areia de granulometria média; e proporção de 50 % de composto orgânico (Mec-Plant[®]): vermiculita de granulometria média. O meio de cultura utilizado foi o JADS, adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP-30, 0,05 mg L⁻¹ de BAP, 0,25 mg L⁻¹ de AIB e adicionado 7 g L⁻¹ de ágar apenas para o substrato contendo o meio semissólido. O pH foi ajustado em 5,8, e o meio, autoclavado a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C por 20 minutos. Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C por um fotoperíodo de 16 horas, com irradiância de 88,12 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (quantificada por radiômetro (LI-COR[®], LI-250A Light Meter), fornecida por quatro lâmpadas diodo emissor de luz - LED (Tec-Lamp-660/450-120 cm, 36 W, Tecnal).

2.6 Delineamento e avaliações experimentais

Os experimentos foram instalados no delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para o experimento da posição de origem das microcepas, foram testadas três

posições de coleta na microestaca (basal, mediana e apical) com seis repetições, contendo cada pote de polipropileno dez microcepas. Para o experimento de densidade e qualidade de luz, foram testadas quatro densidades (uma, duas, três e quatro microcepas) e três iluminações (2F: duas lâmpadas fluorescentes; 2L e 4L: duas e quatro lâmpadas diodo emissor de luz (LED), respectivamente), com cinco repetições contendo em cada Magenta[®] números de microcepas de acordo com cada densidade. No experimento dos substratos, foram testados quatro tipos de substratos (ágar, vermiculita, areia e composto orgânico:vermiculita), com 15 repetições, contendo em cada Magenta[®] quatro microcepas basais.

As análises foram processadas em software R, versão 3.0.3 (R Core Team, 2014), com auxílio do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA et al., 2013). Os dados de porcentagem de emissão de raízes do experimento de posição de origem das microcepas e o número de brotos maiores que 0,5 cm e o número de microestacas maiores que 2 cm do experimento de densidade de microcepas e de qualidade de luz não apresentaram distribuição normal perante teste de Shapiro-Wilkem a 5 % de significância, sendo transformados em \sqrt{x} e \sqrt{x} , respectivamente; e para as variáveis significativas, foi feito o teste Tukey a 5 % de significância.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* nos diferentes tratamentos, foram feitas avaliações quanto ao número de brotos maiores que 0,5 cm por microcepa, número de microestacas produzidas maiores que 2 cm, comprimento da maior microestaca (cm) e vigor dos brotos, feito com base em uma escala de notas variando de 1 (Baixo), 2 (Médio), 3 (Alto). Além dessas avaliações, no experimento de posição de origem das microcepas, foi analisada a porcentagem de emissão de raízes, e no experimento do tipo de substratos, foram analisadas a porcentagem de emissão de raiz, a massa seca da parte aérea e a massa seca da raiz.

3. RESULTADOS

3.1 Posição de origem das microcepas

Com base nos resultados obtidos, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) o número de brotos maiores que 0,5 cm (NB > 0,5 cm) e a porcentagem de emissão de raiz (% Raiz). No entanto, o comprimento da maior microestaca e o vigor dos brotos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

As microcepas advindas da parte basal da microestaca apresentaram maior número de brotos > 0,5 cm (em média, 1,8 brotos por microcepa), superior ao tratamento contendo as microcepas advindas da parte apical da microestaca, que apresentaram, em média, 1,3 brotos. Já as microcepas oriundas da parte mediana apresentaram, em média, 1,5 brotos por microcepa, não diferindo dos demais tratamentos (Figura 3A).

Microcepas de origem basal também mostraram maior porcentagem de emissão de raízes, em média, 70 % de microcepas enraizadas, em comparação com as microcepas oriundas da região apical, que apresentaram, em média, 23 % de enraizamento (Figura 3B). Já as microcepas de origem mediana apresentaram em média 50 % de enraizamento, sendo estatisticamente semelhantes às microestacas oriundas de regiões apicais e basais.

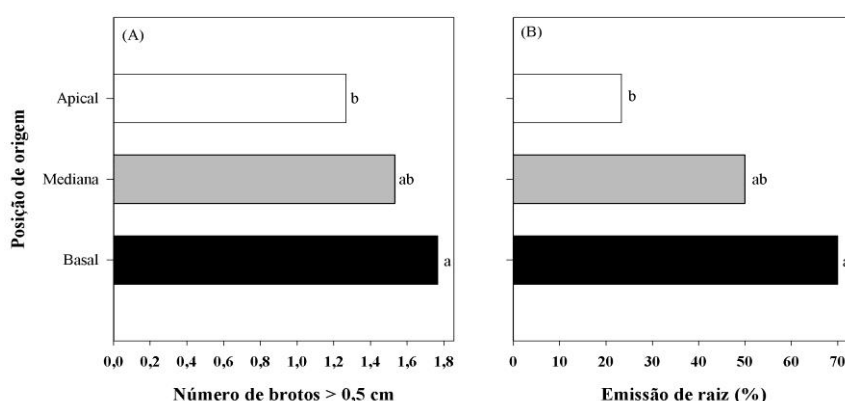


Figura 3. Características observadas nas microcepas *in vitro* do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em diferentes posições de origem dos segmentos nodais. **(A)** Número de brotos > 0,5 cm; **(B)** Porcentagem de emissão de raiz. *Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3.2 Densidade de microcepas e qualidade de luz

De acordo com a análise de variância, a densidade de microcepas e a qualidade de luz atuaram de forma independente, sendo que todas as características avaliadas foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) para densidade de microcepas, e somente o vigor apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) para a qualidade de luz.

Densidades maiores no sistema proporcionaram maior número de brotos > 0,5 cm, ou seja, a densidade de quatro microcepas por recipiente proporcionou, em média, 8 brotos, sendo superior à densidade de três microcepas (produção média de 6

brotos), duas microcepas (média de 4 brotos) e uma microcepa (média de 2 brotos) (Figura 4A).

O número de microestacas > 2 cm apresentou comportamento similar, com maior número de brotos > 0,5 cm, e as maiores densidades apresentaram os maiores valores, sendo as densidades de quatro e três microcepas por recipiente superiores às demais densidades, que produziram, em média, 4,3 e 3,7 microestacas > 2 cm, respectivamente (Figura 4B). A densidade de uma microcepa por recipiente produziu 1,1 microestaca > 2 cm, enquanto a densidade duas microcepas produziu 2,7 microestacas > 2 cm.

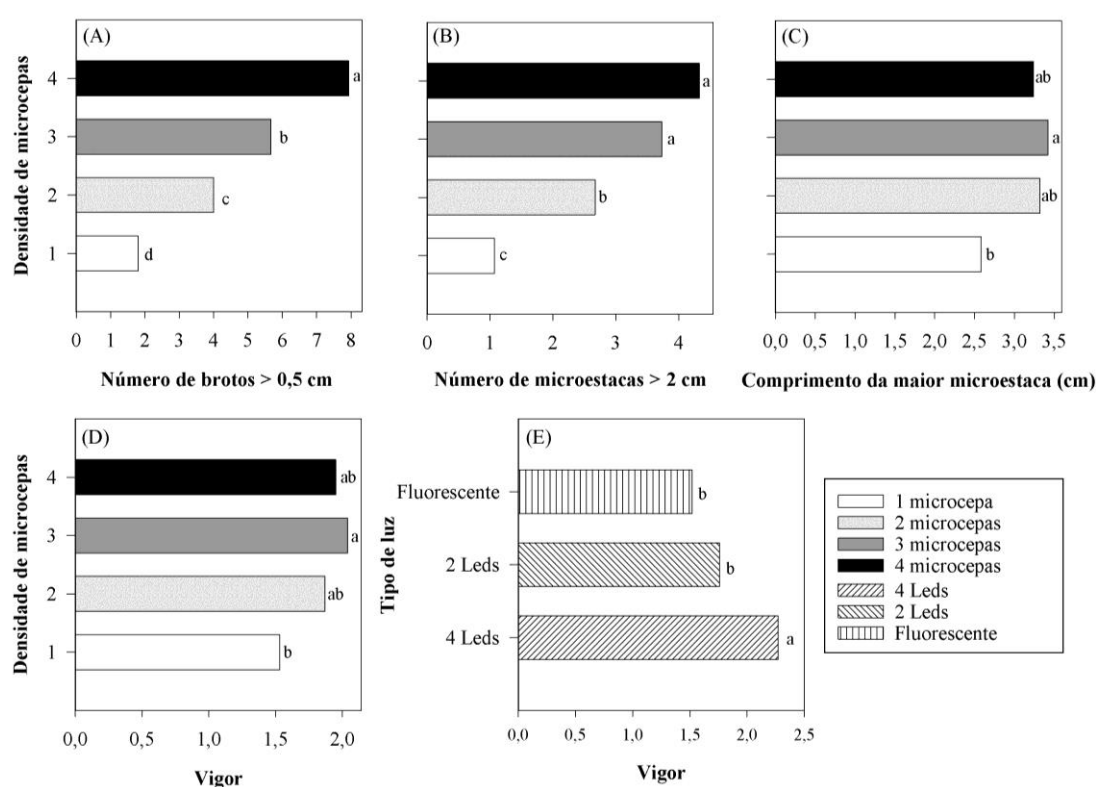


Figura 4. Características observadas nas microcepas *in vitro* do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em diferentes densidades de cultivo e qualidade de luz. (A) Número de brotos > 0,5 cm; (B) Número de microestacas > 2 cm; (C) Comprimento da maior microestaca (cm); (D) Vigor em função da densidade; e (E) Vigor em função da qualidade de luz. *Médias seguidas de uma mesma não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

A densidade de três microcepas por recipiente proporcionou o maior comprimento de microestacas (3,42 cm), sendo superior apenas para a densidade de uma microcepa (2,58 cm). As demais densidades apresentaram comprimentos

médios de 3,32 e 3,24 cm, para duas e quatro microcepas por recipiente, respectivamente, sendo estatisticamente semelhantes às outras densidades.

O vigor dos brotos em função da densidade de cultivo apresentou maiores notas na densidade com três microcepas (2,04), sendo superior apenas para à densidade com uma microcepa por recipiente (1,53) (Figura 4D). Já o vigor em função da qualidade de luz apresentou maior nota em 4L (2,27), sendo superior às demais iluminações (2L e 2F) (Figura 4E).

3.3 Substratos

Os tratamentos envolvendo substratos apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) sobre as características avaliadas, (número de brotos maiores que 0,5 cm (NB > 0,5 cm), número de microestacas maiores que 2 cm (NM > 2 cm), vigor dos brotos, comprimento da maior microestaca e porcentagem de emissão de raízes.

O meio semissólido com ágar apresentou número de brotos > 0,5 cm com média de 9 brotos por recipiente, seguido do composto orgânico vermiculita (7,7 brotos), areia com média, com 7,6 brotos e, por último, o uso de vermiculita, com 7,5 brotos (Figura 5A).

Médias superiores a todos os tratamentos foram obtidas para o uso de ágar quanto ao número de microestacas > 2 cm, apresentando em média 3,2 microestacas por recipiente (Figura 5B). Valores médios foram encontrados com o uso de vermiculita (1,9 microestacas > 2 cm), seguido dos tratamentos com menores médias de produção, sendo a areia e o composto orgânico com 0,67 microestacas > 2 cm.

Substratos com uso de ágar ou vermiculita apresentaram médias superiores, com comprimento da maior microestaca variando de 2,4 e 1,6 cm, respectivamente, aos substratos com uso de composto orgânico vermiculita e areia, que apresentaram médias de comprimentos de 1,2 e 0,96 cm, respectivamente (Figura 5C).

O uso de vermiculita apresentou maiores notas de vigor dos brotos (2,0), sendo superior aos demais substratos (Figura 5D).

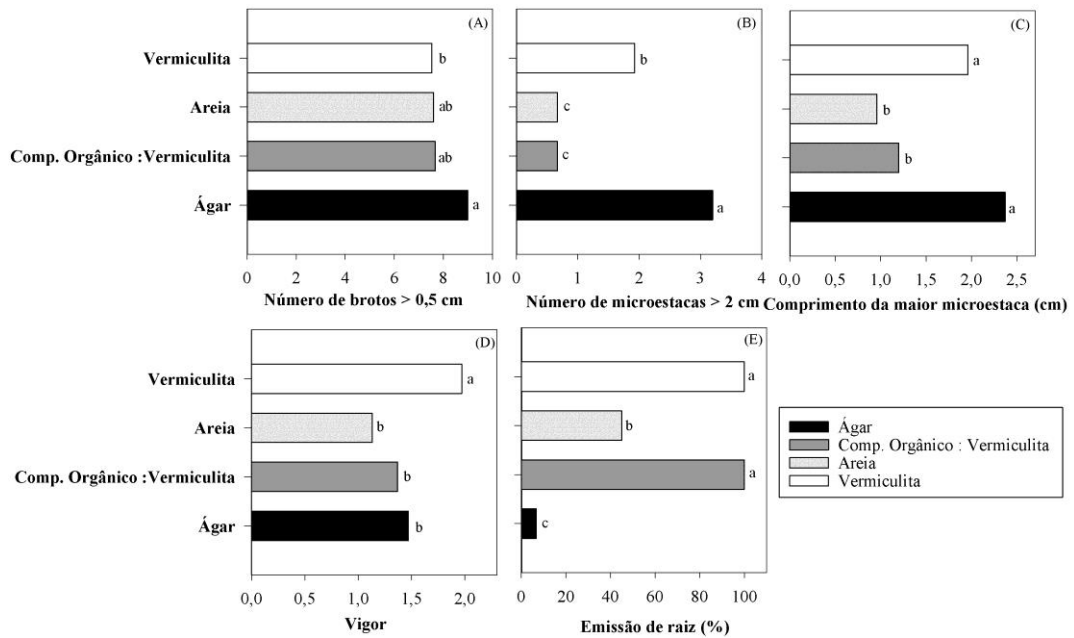


Figura 5. Características observadas nas microcepas *in vitro* do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em diferentes substratos. **(A)** Número de brotos > 0,5 cm; **(B)** Número de microestacas > 2 cm; **(C)** Comprimento da maior microestaca; **(D)** Vigor; e **(E)** Porcentagem de emissão de raiz. *Médias seguidas de uma mesma não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Em contraste com as demais características, a porcentagem de raízes formadas no tratamento com uso de ágar apresentou média inferior a todos os demais substratos (6,7 %) (Figura 5E). Os tratamentos com uso de vermiculita e do composto orgânico vermiculita apresentaram 100 % das microcepas enraizadas, sendo superiores a todos os demais tratamentos. Já o uso de areia proporcionou 45 % de enraizamento das microcepas.

Com relação à massa seca da parte aérea, Figura 6A, os substratos com vermiculita e o sistema convencional (ágar) apresentaram maiores médias, 0,28 e 0,27 g, respectivamente, sendo superiores aos substratos com uso do composto orgânico:vermiculita (0,15 g) e areia (0,10 g). Já a massa seca da raiz, Figura 6B, apresentou maiores médias no substrato vermiculita (0,07 g), sendo superior ao substrato com uso de composto orgânico:vermiculita (0,04 g), areia (0,02 g) e ágar (0,01 g).

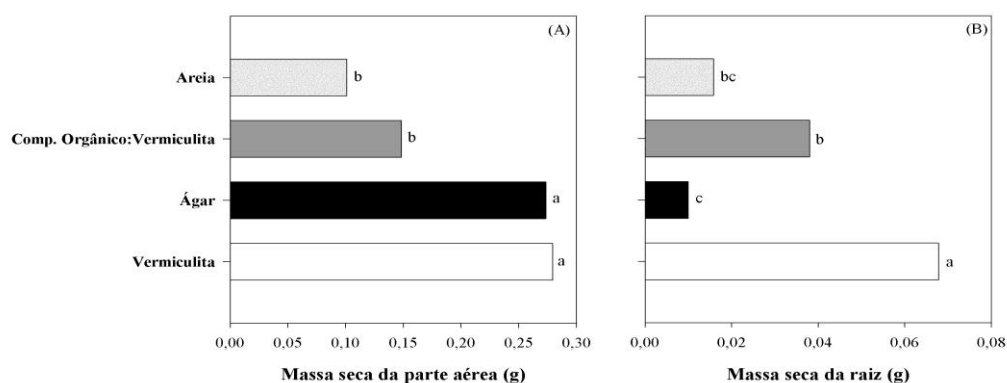


Figura 6. Características observadas nas microcepas *in vitro* do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em diferentes substratos. **(A)** Massa seca da parte aérea (g); e **(B)** Massa seca da raiz (g). *Médias seguidas de uma mesma não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

A Figura 7A mostra que o uso de ágar apresentou bom número de brotos, bem como de microestacas, porém há baixa emissão de raízes nas microcepas. Já o uso de areia, Figura 7C, apresentou baixos valores para todas as características avaliadas, podendo ser observados o baixo desenvolvimento das microcepas e o enraizamento. Nos tratamentos com uso de composto orgânico:vermiculita, Figura 7B, e vermiculita, Figura 7D, pode-se observar bom desenvolvimento das brotações bem como do sistema radicular das microcepas.

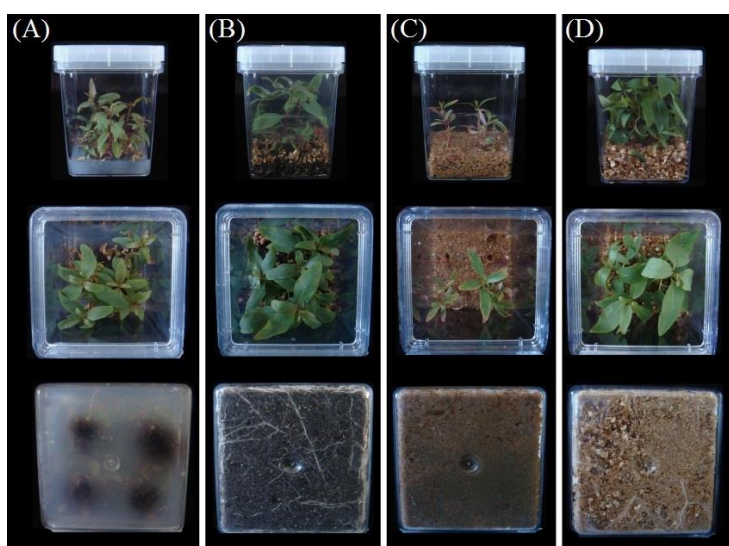


Figura 7. Plantas do clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em sistema de microcepas durante a fase de alongamento em diferentes substratos. **(A)** Ágar + Meio semissólido JADS; **(B)** Composto Orgânico: Vermiculita + Meio líquido JADS; **(C)** Areia + Meio líquido JADS; **(D)** Vermiculita + Meio líquido JADS.

4. DISCUSSÃO

4.1 Posição de origem das microcepas

A posição de coleta dos segmentos nodais afetou a produtividade de brotos maiores que 0,5 cm bem como a porcentagem de enraizamento, tendo as posições basais médias superiores à apicais e equivalentes às medianas.

Há diversos trabalhos envolvendo o uso de segmentos nodais no processo de estabelecimento *in vitro* de *Eucalyptus* spp. (TEIXEIRA et al., 2008; BRONDANI et al., 2009; OLIVEIRA, 2011; BORGES et al., 2012), sem, entretanto, envolver a posição de origem de explantes *in vitro*, seja para multiplicação ou alongamento de brotações na micropropagação de *Eucalyptus*.

Em condições *ex vitro*, essa metodologia foi utilizada por Frassetto et al. (2010), que observaram que maior enraizamento de estacas basais e intermediárias do que em estacas apicais de *Sebastiania schottiana* pode ser explicado pela sua posição na planta (topófitse), diferenciando-se quanto à concentração de auxinas, importantes na rizogênese adventícia, e de carboidratos, que servirão como reserva energética bem como material para a formação de estruturas celulares necessárias para todos os processos fisiológicos da planta.

Além do enraizamento, o uso de diferentes posições de origem das estacas pode influenciar no processo de crescimento das mudas. Segundo Nicoloso et al. (1999), estacas obtidas nas porções mediana e basal em plantas de *Pfaffia glomerata* apresentaram formação de mudas com maior diâmetro e maior altura do que as estacas oriundas de regiões apicais em plantas de *Pfaffia glomerata*.

4.2 Densidade de microcepas e qualidade de luz

As maiores densidades (3 e 4 microcepas/recipiente) proporcionaram as maiores produtividades de brotos maiores que 0,5 cm, microestacas maiores que 2 cm, comprimento da maior microestaca bem como melhor vigor dos brotos.

Vários estudos foram desenvolvidos com o objetivo de obtenção do alongamento *in vitro* de *Eucalyptus* spp. (SANTOS et al., 2004; SOTELO e MONZA, 2007; BRONDANI et al., 2009; OLIVEIRA, 2011; NAVROSKI et al.,

2013). Porém, não há na literatura estudos envolvendo a densidade de cultivo *in vitro* para a obtenção de brotações alongadas ou microestacas.

Em sistema de minijardins clonais em viveiro, Souza et al. (2014) avaliaram a densidade de minicepas na produção de mudas de eucalipto, tendo obtido os melhores resultados, como sobrevivência das minicepas e produção de miniestacas em densidades menores, ou seja, jardins com menor número de minicepas por metro quadrado.

Já para Oliveira et al. (2010), a técnica de adensamento do jardim clonal mostrou-se eficiente para os cultivares de oliveira, tendo sido verificados os melhores resultados em densidades de plantio de 3 a 5 cepas por metro quadrado. O conhecimento da densidade do jardim clonal é uma variável importante, interferindo diretamente no planejamento de produção de mudas, sendo necessária no dimensionamento de viveiros de mudas.

Para a qualidade de luz, somente o vigor dos brotos teve influência, tendo a lâmpada com 4LEDs sido superior à lâmpada de 2 LEDs e à fluorescente. Trabalhos científicos com uso de LED na micropropagação de *Eucalyptus* spp. ainda são recentes, no entanto, são encontrados bons resultados, como maior crescimento em *Spirulina platensis* (WANG et al., 2007), maior quantidade de pigmentos fotossintéticos em *Fragaria xananassa* (ROCHA et al., 2010), plantas mais vigorosas em *Gossypium hirsutum* (LI et al., 2010) e maior eficiência de aclimatização das plantas em *Saccharum officinarum* (ROCHA et al., 2013).

4.3 Substratos

Os substratos com uso de ágar e de vermiculita apresentaram os melhores resultados para número de microestacas > 2 cm, comprimento da maior microestaca e massa seca da parte aérea; já para vigor dos brotos, porcentagem de emissão de raízes e massa seca radicular, melhores resultados foram obtidos com o substrato vermiculita. O substrato composto orgânico:vermiculita apresentou grande porcentual de emissão de raízes, porém, para número de microestacas > 2 cm, esse substrato não apresentou bons resultados.

A utilização de substratos alternativos desempenha papel vital no processo de micropropagação (AFREEN et al., 1999). Segundo Kirdmanee et al. (1995), o uso de substratos alternativos (ágar, Gelrite[®], rede de plástico, e vermiculita) em cultivo

fotoautotrófico de *Eucalyptus camaldulensis* apresenta grande influência nas características de crescimento observadas, tendo o uso de vermiculita proporcionado os melhores resultados, enquanto o sistema convencional (ágar) proporcionou os menores. Em contrapartida, Khan et al. (2002) concluíram que o uso de Florialite® (substrato à base de vermiculita e fibra de celulose) não apresentou resultados promissores para o *Eucalyptus tereticornis* em comparação com o sistema convencional (ágar).

Os resultados com os substratos com maiores porosidades podem influenciar na melhor formação de sistema radicular (XIAO et al., 2011). A alta porosidade do substrato aumenta a concentração de oxigênio em torno do sistema radicular, melhorando seu desenvolvimento, bem como a absorção de água e de nutrientes pelas plântulas (FUJIWARA e KOZAI, 1995). No sistema ágar, há evidências de formação de raízes com anormalidades estruturais dos tecidos bem como pouca formação e fragilidades estruturais (ROBERTS e SMITH, 1990; KATAOKA, 1994). Há evidências, também, de que, dependendo da natureza física e química do substrato, a capacidade de enraizamento e de crescimento também pode ser afetada (ZOBAYED et al., 2000).

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho para o clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, pode-se concluir que: 1) microcepas oriundas de segmentos nodais basais de microestacas proporcionam maior número de brotos bem como maior enraizamento; 2) densidade de três ou quatro microcepas por recipiente proporcionou os melhores resultados, e a iluminação 4L proporcionou maior vigor para as microestacas; 3) uso de ágar ou vermiculita apresenta as maiores médias para as características analisadas, porém o uso de ágar proporcionou baixas porcentagens de emissão de raízes nas microcepas.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

7. REFERÊNCIAS

AFREEN, 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 and Developmental Biology – Plant**, v.35, p.470–474, 1999.

AFREEN-ZOBAYED, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KUBOTA, C.; KOZAI, T.; HASEGAWA, O. A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. **Plant Science**, v.157, p.225–231, 2000.

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

BANDEIRA, F.S.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; LANI, E.R.G. Aclimatização *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Revista Árvore**, v.31, n.5, p.773-781, 2007.

BE, L.V.; DEBERGH, P.C. Potential low-cost micropropagation of pineapple (*Ananas comosus*). **South African Journal of Botany**, v.72, p.191–194, 2006.

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.

BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.de.; LOPES, A.P.; OTONI, W.C. Multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, v.35, n.2, p.173-182, 2011.

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

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**, n.48/49, p.107-116, 1995.

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

FRASSETTO, E.D.; FRANCO, E.T.H.; KIELSEI, P.; AMARAL, V.F.M. Enraizamento de estacas de *Sebastiania schottiana* Müll. Arg. **Ciência Rural**, v.40, n.12, p.2505-2509, 2010.

FUJIWARA, K.; KOZAI, T. Physical microenvironment and its effects. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M.A.L. (Ed.) **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995, p.319–369.

ICHIMURA, K.; ODA, M. Stimulation of root growth of several vegetables by extracts from a commercial preparation of agar. **Journal of the Japanese Society for Horticultural**, v.67, n.3, p.341–346, 1998.

KATAOKA, I. Influence of rooting substrates on the morphology of papaya root formed *in vitro*. **Journal of Tropical Agriculture**, v.38, p.251–257, 1994.

KHAN, P.S.S.V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, p.141–146, 2002.

KIRDMANEE, C.; KITAYA, Y.; KOZAI, T. Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.31, p.144-149, 1995.

KURIA, P.; DEMO, P.; NYENDE, A.B.; KAHANGI, E.M. Cassava starch as an alternative cheap gelling agent for the *in vitro* micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). **African Journal of Biotechnology**, v.7, p.301–30, 2008.

LI, H.; XU, Z.; TANG, C. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.103, p.155–163, 2010.

NAVROSKI, M.C.; REINIGER, L.R.S.; PEREIRA, M.O.; CURTI, A.R.; PAIM, A.F. Alongamento *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Cerne**, v.19, n.4, p.545-550, 2013.

NICOLOSO, F.T.; FORTUNATO, R.P.; FOGAÇA, M.A.F. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. **Ciência Rural**, v.29, n.2, p.277-283, 1999.

OLIVEIRA, A.F.de.; VIEIRA NETO, J.; VILLA, F.; SILVA, L.F.O.da. Espaçamento entre plantas no desempenho de jardim clonal de cultivares de oliveira. **Scientia Agraria**, v.11, n.4, p.317-322, 2010.

OLIVEIRA, L.S.de. **Micropropagação, microestaquia e miniestaquia de clones híbridos de *Eucalyptus globulus***. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

OLIVEIRA, M.L.de.; XAVIER, A.; PENCHEL, R.M.; SANTOS, A.F. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. **ScientiaForestalis**, v.39, n.91, p.309-315, 2011.

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

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. 2014.

ROBERTS, A.V.; SMITH, E.F. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. I. Protection of roots by cellulose plugs. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.21, p.129–132, 1990.

ROCHA, P.S.R.; OLIVEIRA, R.P.de.; SCIVITTARO, W.B. Sugarcane micropropagation using light emitting diodes and adjustment in growth-medium sucrose concentration. **Ciência Rural**, v.43, n.7, p.1168-1173, 2013.

ROCHA, P.S.R.; OLIVEIRA, R.P.de.; SCIVITTARO, W.B.; SANTOS, U.L. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, v.40, n.9, p.1922-1928, 2010.

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

SCHOLTEN, H.J.; PIERIK, R.L.M. Agar as a gelling agent: differential biological effects *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v.77, n.1–2, p.109–116, 1998.

SINGH, S.R.; SINGH, R.; KALIA, K.; DALAL, S.; DHAWAN, A.K.; KAL, R.K. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo—a plant with extraordinary qualities. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.19, n.1, p.21–41, 2013.

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

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

TEIXEIRA, J.B. Biorreatores: biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais - Produção de mudas em larga escala. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.24, p.36-41, 2002.

TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, M.T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pellita* L. **Ciência Florestal**, v.18, n.2, p.185-191, 2008.

TOMAR, U.K.; NEGI, U.; SINHA A.K.; DANTU P.K. An overview of the economic factors influencing micropropagation. **My Forest**, v.43, p.523-532, 2007.

WANG, C.Y.; FU, C.C.; LIU, Y.C. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p.21–25, 2007.

WANG, S.M.; PIAO, X.C.; PARK, S.Y.; LIAN, M.L. Improved micropropagation of *Gypsophila paniculata* with bioreactor and factors affecting *ex vitro* rooting in microponic system. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v.49, p.70–78, 2013.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Enraizamento *ex vitro* de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e alongadas *in vitro*. **ScientiaForestalis**, n.51, p.29-36, 1997.

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

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

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

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. **Annals of Botany**, v.85, p.587-592, 2000.

CONCLUSÕES GERAIS

Com base nas condições estudadas, os resultados obtidos na produção de microestacas a partir da micropropagação de clones de *Eucalyptus* spp., permitem concluir que:

- 1) Houve boa produção de microestacas advindas de tufos de gemas no decorrer das coletas sucessivas, bem como foram ajustados os níveis de AIB para cada clone variando de 0,25 a 0,50 mg L⁻¹ de AIB para o clone *Eucalyptus grandis* x *E.urophyllae* 0,75 a 1,0 mg L⁻¹ para o clone *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*; Nas condições *ex vitro* a dosagem de AIB apresentou efeito residual proporcionando bom enraizamento e sobrevivência, nas dosagens 0,25 a 0,50 mg L⁻¹ de AIB para o clone *Eucalyptus grandis* x *E.urophyllae* 0,50 a 1,0 mg L⁻¹ para o clone *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*.
- 2) O melhor recipiente para produção de microestacas maiores que 2 cm é o pote de polipropileno (500 mL); no entanto, quando se deseja maior produção por m² o frasco de vidro (250 mL) apresenta-se mais vantajoso diante da sua maior possibilidade de adensamento; os melhores substratos para produção de microestacas maiores que 2 cm, utilizando o recipiente Agripot[®], foi com ágar ou vermiculita.
- 3) A redução para 15 g L⁻¹ de sacarose apresenta os melhores resultados para as características analisadas; não há diferenças entre o sistema fechado e o sistema com troca gasosa para a maioria das características observadas, no entanto, a troca gasosa atua negativamente no comprimento da maior microestaca; na condição *ex vitro* constatou-se a influência dos tratamentos realizados *in vitro*.
- 4) As microcepas oriundas de segmentos nodais basais de microestacas proporcionam maior número de brotos bem como maior enraizamento; a densidade de três ou quatro microcepas por recipiente proporcionou os melhores resultados, e a iluminação 4L proporcionou maior vigor para as microestacas; o uso de ágar ou vermiculita apresentaram as maiores médias para as características analisadas, porém o uso de ágar proporcionou baixas porcentagens de enraizamento das microcepas.