

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Propagação *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* Maiden: desenvolvimento de um novo meio basal e estimação de parâmetros genéticos para características morfofisiológicas**

**Gustavo Pedro Javier Oberschelp**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa: Recursos Florestais. Opção em: Silvicultura e Manejo Florestal

**Piracicaba  
2014**

Gustavo Pedro Javier Oberschelp  
Engenheiro Agrônomo

**Propagação *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* Maiden: desenvolvimento de um novo meio basal e estimativa de parâmetros genéticos para características morfofisiológicas**  
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **ANTÔNIO NATAL GONÇALVES**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa: Recursos Florestais. Opção em: Silvicultura e Manejo Florestal

**Piracicaba  
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Oberschelp, Gustavo Pedro Javier

Propagação *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* Maiden: desenvolvimento de um novo meio basal e estimativa de parâmetros genéticos para características morfofisiológicas / Gustavo Pedro Javier Oberschelp. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.  
160 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Nutrição mineral 2. Juvenildade 3. Micropropagação 4. Organogênese  
5. Herdabilidade 6. Melhoramento genético 7. Seleção indireta I. Título

CDD 634.9734  
J41p

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"**

*Aos meus pais, Sofia e Gustavo*

*Aos meus irmãos, Guillermo e Ernesto*

*DEDICO*



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo constante estímulo à superação e por serem um exemplo sempre presente de honestidade, humildade e trabalho.

Ao Professor Doutor Antônio Natal Gonçalves pela orientação, apoio, amizade e palavras de sabedoria.

Ao Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA, que através de seu programa de aperfeiçoamento e do programa de melhoramento genético de eucaliptos, possibilitou efetuar esta experiência.

À Universidade de São Paulo - USP, à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Florestais, pelo suporte e ensino de excelência nos cursos de pós-graduação que são o sustento deste trabalho.

Ao Professor Doutor Marcílio de Almeida pelos conselhos, ensinamentos e amizade.

Ao Laboratório de Fisiologia das Árvores - LAFISA, especialmente ao técnico José Roberto Romanini.

Ao Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas, em especial a Eveline Calderan e a Érika Mendes Graner pela ajuda com a análise histológica.

Aos meus colegas da EEA Concordia pela amizade, companheirismo, apoio e paciência. Em especial ao grupo de melhoramento florestal: Martín Marcó, Leonel Harrant, Carla Salto, Mario Carmarán, Nicolás Alanís, Vanina Vivas, Pamela Alarcón, Lourdes Vianna e Santiago Alvarez-Cettour.

À FLORAL ATLANTA e a Paulo Moreira pelo fornecimento da espuma fenólica GREEN UP<sup>®</sup>

À minha noiva, María Solange Bourlot pela ajuda, compreensão, incentivo e amor.

Aos amigos, colegas e professores que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, Tomás Schlishter, Paulo Pathauer, Daniel Vazquez, Carlos Noé, Carlos Tadeu dos Santos Dias, Paulo Henrique Müller da Silva, Gilvano Brondani, Ângela Simone Freitag, Leandro Oliveira, Alexandre de Vicente Ferraz, Evandro Vagner Tambarussi, Rildo Moreira e Moreira, Francisco Monteiro, Alba Massetto, Giovana de Oliveira, Mauro Surenciski, Daniel Zurlo, Teresita Malaisi, Roberto Marano, Juan Delgado Rojas, Valéria Modolo, Antônio Bianchi, Sergio Pérez, Natalia Azar, Juan Edwards Molina e Evangelina Miqueo.

**"Sola dosis facit venenum"**  
Paracelso

**"Essentially, all models are wrong, but some are useful"**  
George E. P. Box





## SUMÁRIO

RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
Referências .....	22
2 DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO BASAL PARA <i>Eucalyptus dunnii</i> BASEADO NOS TEORES NUTRICIONAIS DE BROTAÇÕES DE CEPAS E OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> .....	31
Resumo .....	31
Abstract.....	31
2.1 Introdução.....	32
2.1.1 Hipóteses .....	37
2.1.2 Objetivos.....	37
2.2 Material e métodos .....	37
2.2.1 Análise química do material vegetal coletado no campo .....	38
2.2.2 Formulação do meio basal.....	39
2.2.3 Lavagem da espuma fenólica .....	39
2.2.4 Material vegetal fonte de explantes .....	40
2.2.5 Preparo dos meios de cultura.....	40
2.2.6 Condições de crescimento .....	41
2.2.7 Delineamento experimental e análises estatísticas .....	41
2.3 Resultados e discussão .....	43
2.3.1 Experimento I - Desenvolvimento de um meio basal específico para <i>E. dunnii</i> baseado nos teores nutricionais de brotações de cepas .....	43
2.3.1.1 Teores de nutrientes minerais e tipo de amostra.....	43
2.3.1.2 Desenvolvimento do meio basal.....	45
2.3.2 Otimização das condições de crescimento para a propagação <i>in vitro</i> de <i>E. dunnii</i> .....	49
2.3.2.1 Experimento II - Acondicionamento da espuma fenólica .....	49
2.3.2.2 Experimento III - Estado físico do meio de cultura .....	50
2.3.3 Experimento IV - Efeito de distintas fontes e quelatos de ferro na multiplicação <i>in vitro</i> de gemas axilares de <i>E. dunnii</i> .....	54
2.4 Conclusões.....	60
Referências .....	60

3 REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE <i>Eucalyptus dunnii</i> VIA ORGANOGÊNESE <i>IN VITRO</i> .....	71
Resumo.....	71
Abstract .....	71
3.1 Introdução .....	72
3.1.1 Hipóteses .....	74
3.1.2 Objetivos .....	74
3.2 Material e métodos.....	75
3.2.1 Organogênese.....	75
3.2.2 Análise histológica da organogênese .....	76
3.2.3 Enraizamento .....	76
3.2.4 Análises estatísticas.....	77
3.3 Resultados e discussão .....	78
3.3.1 Organogênese.....	78
3.3.2 Análise histológica da organogênese .....	86
3.3.3 Enraizamento .....	89
3.4 Conclusões .....	90
Referências.....	91
4 ESTADO NUTRICIONAL E RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS NA MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Eucalyptus dunnii</i> .....	99
Resumo.....	99
Abstract .....	99
4.1 Introdução .....	100
4.1.1 Hipóteses .....	102
4.1.2 Objetivos .....	103
4.2 Material e métodos.....	103
4.2.1 Material vegetal.....	103
4.2.2 Meios de cultura e condições de crescimento .....	103
4.4.3 Análise nutricional .....	106
4.4.4 Delineamento experimental e análise estatística.....	106
4.5 Resultados e discussão .....	108
4.5.3 Experimento I - Meios basais.....	108
4.5.4 Experimento II - Restrição de nutrientes .....	117
4.6 Conclusões .....	124

Referências .....	125
5 ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS GENÉTICOS PARA CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS <i>IN VITRO</i> DE <i>Eucalyptus dunnii</i> .....	133
Resumo .....	133
Abstract.....	133
5.1 Introdução .....	134
5.1.1 Hipóteses .....	136
5.1.2 Objetivos.....	136
5.2 Material e métodos .....	137
5.2.1 Material vegetal .....	137
5.2.2 Meios de cultura e condições de crescimento .....	137
5.2.3 Delineamento experimental e análise estatística .....	138
5.3 Resultados e discussão .....	140
5.4 Conclusões.....	148
Referências .....	148
6 CONCLUSÃO GERAL .....	153
ANEXOS .....	155



## RESUMO

### **Propagação *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* Maiden: desenvolvimento de um novo meio basal e estimação de parâmetros genéticos para características morfofisiológicas**

O *Eucalyptus dunnii* é reconhecido pela sua tolerância às geadas, por apresentar bom crescimento, assim como pela sua madeira de qualidade apta para o uso na indústria celulósica e em determinados produtos sólidos. Contudo, a baixa disponibilidade de material de propagação, devido à escassa floração e à recalcitrância ao enraizamento, representa um fator limitante tanto para o melhoramento genético como para a sua maior difusão no cultivo florestal. A aplicação de técnicas de propagação *in vitro* e a incorporação de critérios de seleção relacionados à capacidade de enraizamento poderiam contribuir para minimizar esses problemas. Até hoje, as pesquisas realizadas na cultura de tecidos de *E. dunnii* utilizaram meios basais desenvolvidos para atender os requerimentos nutricionais de outras espécies. Este fato, geralmente, demanda ajustes nutricionais para a adequação do meio, cujos resultados são limitados pelas interações entre seus diversos componentes. Portanto, foi desenvolvido um meio basal inédito, com base nos teores de nutrientes minerais essenciais em brotações juvenis de cepas de *E. dunnii* e, posteriormente, ajustado à disponibilidade dos nutrientes em solução. Para otimizar as condições de crescimento, foram avaliados o tipo de meio de suporte e a fonte de Fe empregada na formulação deste meio basal, o que permitiu demonstrar a importância destes fatores na quantidade e qualidade das respostas morfogênicas *in vitro* de brotações de *E. dunnii*. Posteriormente, o meio basal desenvolvido foi utilizado com sucesso na organogênese em hipocótilos quando empregado com 0,032 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA/Fe como fonte de Fe (EDM), assim como na multiplicação de gemas axilares de material juvenil e adulto de *E. dunnii* quando adicionado com 0,256 mmol L<sup>-1</sup> de EDDHA/Fe (EDMm), apresentando melhor desempenho do que os meios basais JADS, MS e WPM na obtenção de microplantas. Além disso, foi possível determinar que a clorose das brotações é atribuível à deficiência de Fe e que a queda de folhas e a oxidação estão relacionadas aos baixos teores de N. Por outro lado, a restrição de K, Mg, Mn, Zn, Mo, Ni, Co ou NaCl do meio basal EDMm, afetou negativamente o desenvolvimento das brotações, evidenciando a maior importância relativa destes nutrientes na composição do meio basal. Finalmente, foram estimados parâmetros genéticos para características morfofisiológicas *in vitro* em vinte progênies de polinização aberta de *E. dunnii*. As herdabilidades das características de regeneração de gemas, número de gemas e regeneração de calos foram elevadas, entretanto, as associadas ao enraizamento foram baixas a moderadas. Foram determinadas correlações genéticas favoráveis e de elevada magnitude para o comprimento das brotações e do número de raízes com o enraizamento. A possibilidade de aplicar maiores intensidades de seleção nos caracteres quantitativos, sugere que maiores ganhos preditos poderiam ser obtidos quando implementada a seleção indireta do enraizamento. Estes resultados constituem um caso exitoso de regeneração de plantas a partir de tecidos juvenis e de micropropagação de árvores adultas de *E. dunnii* que, por fim, poderão contribuir com a disponibilidade de material de qualidade genética superior e com o planejamento e execução de uma estratégia de melhoramento mais adequada para esta espécie.

Palavras-chave: Nutrição mineral; Juventude; Micropropagação; Organogênese; Herdabilidade; Melhoramento genético; Seleção indireta



## ABSTRACT

### ***In vitro* propagation of *Eucalyptus dunnii* Maiden: development of a new basal medium and estimation of genetic parameters for morphophysiological traits**

*Eucalyptus dunnii* is a well-known species for its tolerance to the deleterious effects of frost; moreover, it has good growth, as well as wood production suitable for pulp, paper and certain uses as a solid wood. However, low availability of propagation material, due to poor flowering and rooting recalcitrance, represents a limiting factor for both breeding and deployment in plantation forests. Combined application of *in vitro* propagation techniques and selection criteria for traits related to rooting ability could help to reduce these problems, allowing the selection, rescue, rejuvenation and multiplication of elite genotypes. Previous research on tissue culture of *E. dunnii* was based on culture media originally developed to meet the nutritional requirements of other species, which often involves further nutritional adjustments in order to adequate the media to the new species requirement. Nevertheless, results of this approach are hindered by interactions between the diverse media components. Therefore, it was developed a new culture medium based on essential mineral nutrients concentrations in *E. dunnii* shoots collected from coppice stumps and subsequently adjusted to the mineral nutrient availability in the solution. The support media and Fe sources effects on the quantity and quality of the organogenic responses were studied. The results showed the potential and constrains of each Fe source and agar based or liquid culture with phenolic foam support. The developed basal medium was successfully used on shoot organogenesis of hypocotyls when used 0.032 mmol L<sup>-1</sup> of EDTA/Fe as Fe source, and on micropropagation of juvenile and adult materials of *E. dunnii* when added with 0.256 mmol L<sup>-1</sup> of EDDHA/Fe as Fe source (EDMm), showing better performance than the baseline basal media JADS, MS and WPM for microplants production. Additionally, relationships between leaves chlorosis and low Fe concentrations and leaves drop and oxidation with low N concentration in EDMm basal media were recognized. Moreover, nutritional restrictions of K, Mg, Mn, Zn, Mo, Ni,Co or NaCl in EDMm basal media for 30 days reduced the growth and development of axillary shoots, showing the higher relative relevance of these nutrients in basal media composition. In addition, genetic parameters for *in vitro* morphophysiological traits were estimated on twenty open-pollinated families of *E. dunnii*. High heritability for bud number, bud regeneration and callus regeneration were defined, although rooting related traits showed low to moderate heritability. Nevertheless, moderate heritability for shoot length and number of roots coupled to high positive genetic correlations with rooting and the possibility to increase the selection intensity in quantitative traits, implies higher predicted gains for rooting under indirect selection. As a whole, these results validate the proposed approach for basal media development and report successful plant regeneration from juvenile material and micropropagation of adult elite trees of *E. dunnii*, which may contribute with both improved plant propagation material availability and the planning and implementation of a more suitable breeding strategy for this species.

**Keywords:** Mineral nutrition; Juvenility; Micropropagation, Organogenesis; Heritability; Tree breeding; Indirect selection





## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do eucalipto ocorre em ambientes extremamente diversos, portanto grande parte da área de cultivo apresenta limitações de distinta natureza para seu desenvolvimento, o que é observado pela expansão do cultivo florestal para áreas com incidência de geadas, como grande parte da Argentina, o planalto sul do Brasil, o centro sul da China, o sudeste dos Estados Unidos e o Uruguai (GOLFARI, 1985; BALMELLI, 1993; ARNOLD et al., 2004; FERNÁNDEZ LONG et al., 2005; BOOTH, 2012). Estas regiões possuem este evento climático como um dos maiores fatores limitantes para o cultivo de eucaliptos tropicais e subtropicais, como *Eucalyptus grandis*, *E. saligna* e *E. urophylla* (ELDRIDGE, 1993; GOLFARI et al., 1978), o que requer uma criteriosa escolha de clones, espécies e/ou híbridos para o cultivo.

Embora existam várias espécies de eucalipto tolerantes as geadas, suas características de crescimento comprometem os seus usos para o plantio comercial (BYRNE et al., 1997). Além disso, espécies de clima temperado que combinam rápidas taxas de crescimento e boa forma do fuste, como *E. globulus* e *E. nitens*, apresentam problemas sanitários que restringem seu uso em áreas mais quentes e úmidas (HUNTER et al., 2009; PEREZ et al., 2009a, 2009b). Portanto, existe um grande potencial econômico para espécies que combinarem boas características silviculturais com níveis adequados de tolerância a geadas (TURNBULL; ELDRIDGE, 1983 apud BYRNE et al., 1997).

O *Eucalyptus dunnii* Maiden (Dunn's white gum) se desenvolve naturalmente em duas pequenas áreas de Nova Gales do Sul e Queensland, Austrália. O clima da região é quente e úmido, com uma pluviometria anual entre 1000 e 1750 mm e temperaturas médias máximas do mês mais quente de 27 a 30°C, médias mínimas do mês mais frio variando 0 a 3°C, com uma ocorrência de 20 a 60 geadas ao ano (BOLAND et al., 1984), que segundo a classificação de Köppen corresponde ao clima *Cfb* (temperado sem estação seca).

Em florestas implantadas, o *E. dunnii* é uma espécie alternativa ao *E. grandis*, principalmente nas áreas mais secas e/ou com ocorrência de geadas, por sua homogeneidade, rápido crescimento e boa forma das árvores nestas condições (ARNOLD et al., 2004; HIGA, 2000; MARCÓ; WHITE, 2002; SMITH; HENSON, 2007). Além disso, sua madeira possui boa qualidade para a obtenção de celulose e papel (FERREIRA et al., 1997; SWAIN; GARDNER, 2003 apud SMITH; HENSON, 2007) e possui alta densidade, sendo adequada para usos que exijam maior resistência mecânica (ROCHA; TRUJILLO, 2006).

Um aspecto negativo para usos sólidos da madeira de *E. dunnii* são as tensões de crescimento, que podem causar a desqualificação de até um terço da madeira serrada desta

espécie (MATOS et al., 2003). Contudo, esta característica se encontra sob um moderado a elevado controle genético (SCHACHT et al., 1998; HENSON et al., 2004; PÁDUA et al., 2004; MURPHY et al., 2005) e uma elevada variabilidade entre indivíduos na sua ocorrência (YANG et al., 2001; THOMAS et al., 2008), fatos que estabelecem uma oportunidade para atenuar o problema através de melhoramento genético. Estas características são totalmente expressas na idade adulta, condicionando assim o momento de avaliação, seleção e propagação dos genótipos. Ao mesmo tempo, o processo de envelhecimento reduz gradualmente a capacidade dos tecidos de formar raízes, até a perda total da competência para enraizamento (CRESSWELL; DE FOSSARD, 1974; VALLEDOR et al., 2007). Estes fatos requerem métodos de rejuvenescimento capazes de restabelecer a capacidade rizogênica, como a micropropagação, uma técnica já empregada com sucesso em outras espécies e híbridos de eucalipto, assim como em diversas espécies lenhosas (LE ROUX; STANDEN, 1991; ASSIS et al., 2004; JAIN; HÄGGMAN, 2007; XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

A propagação de árvores é uma ferramenta útil nos programas de melhoramento genético e apresenta características vantajosas para a implantação de florestas (LIBBY, 1986). Ela possibilita a multiplicação de árvores selecionadas que contenham combinações genéticas favoráveis e a produção de material geneticamente homogêneo que pode se desenvolver de forma previsível e uniforme (SUTTON, 2002). Isto possibilita incrementar o ganho genético, um melhor controle da diversidade genética nos plantios comerciais e uma maior eficiência da logística operacional (WHITE; ADAMS; NEALE, 2007).

A silvicultura clonal é uma prática antiga, realizada pelo menos há 800 anos, no caso da *Cunninghamia lanceolata* na China, há 500 anos no caso de *Cryptomeria japonica* no Japão, (MINGHE; RITCHIE, 1999) e há pouco mais de 100 anos para *Populus sp.* (RAJ et al., 2011). Para os eucaliptos, o histórico é um pouco mais recente, iniciando-se com o surgimento da técnica de estaquia (FRANCLET, 1963; CONCHA MARCAVILLACA; MONTALDI, 1964; POGGIANI; SUITER FILHO, 1974) e seu estabelecimento em escala comercial no final da década de 70 e início da década de 80, no Congo e no Brasil respectivamente (CAMPINHOS; IKEMORI, 1983; DELWAULLE; LAPLACE; QUILLET, 1983). Posteriormente, as técnicas de micro e miniestaquia, juntamente com o desenvolvimento e ajuste de protocolos eficientes de propagação *in vitro* (ASSIS; FETTNETO; ALFENAS, 2004; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000), incrementaram a eficiência dos processos envolvidos, provocando no geral, um grande impacto na produtividade das florestas plantadas do Brasil (SILVA; BARRICHELO, 2006).

A cultura de tecidos de plantas tem evoluído muito desde sua implantação no começo do século XX com as experiências pioneiras de Göttlieb Haberlandt (NEUMANN; KUMAR; IMANI, 2009). Atualmente, consiste num conjunto de técnicas de aplicação rotineira usado em muitas espécies vegetais para a produção de plantas livres de patógenos, a regeneração de material geneticamente modificado, o revigoramento e/ou rejuvenescimento de material adulto, a obtenção de propágulos geneticamente homogêneos, a produção de sementes sintéticas e a conservação de germoplasma, entre outras aplicações (BHOJWANI; RAZDAN, 1996; GEORGE; DEBERGH, 2008; VASIL, 2008).

No âmbito florestal, a propagação *in vitro* está mais direcionada à produção maciça de propágulos, ao rejuvenescimento de material selecionado e, mais recentemente, à regeneração de material geneticamente modificado (MERKLE; NAIRN, 2005; WHITE; ADAMS; NEALE, 2007), para os eucaliptos principalmente em *E. camaldulensis*, *E. grandis*, *E. urophylla* e seus híbridos (MULLINS et al., 1997; ALFENAS et al., 2004; HUANG; ZENG; LU, 2010; PRAKASH; GURUMURTHI, 2010; GIRIJASHANKAR, 2011).

No caso das espécies temperadas, apenas para *E. globulus* as referências em relação ao uso da micropropagação e da regeneração *in vitro* são abundantes (VIDELA; CHUNG, 1996; AZMI et al., 1997; BANDYOPADHYAY et al., 1999; NUGENT et al., 2001; LARSON et al., 2006; SCHAWMBACH; FADANELLI; FETT-NETTO, 2005; BORGES et al., 2011; GIRIJASHANKAR, 2011; GONZÁLEZ et al., 2011; CORDEIRO, 2013), devido a sua grande importância na produção de madeira para celulose em áreas temperadas. Mais recentemente, grandes progressos foram alcançados na propagação de *E. benthamii* (BRONDANI et al., 2009, 2011, 2012a, 2012b), outra espécie de grande potencial para áreas com incidência de geadas.

As técnicas disponíveis para propagação vegetativa de *E. dunnii* apresentam limitações que comprometem a sua eficiência, principalmente em decorrência da sua recalcitrância ao enraizamento. Material juvenil pode ser propagado com relativo sucesso utilizando miniestaquia (SOUZA JUNIOR; WENDLING, 2003; BAKER; WALKER, 2005), entretanto para indivíduos adultos, a técnica fica restrita à estaquia de genótipos que enraizem de forma razoável e à enxertia (COOPER; GRAÇA, 1987; PATHAUER, 2005).

Para *E. dunnii*, os estudos sobre micropropagação ainda são escassos e/ou pouco aprofundados (GRAÇA, 1989, 1997; GRAÇA et al., 2001; BILLARD; LALLANA, 2005; ALMEIDA et al., 2008; MALYZ et al., 2011; NAVROSKI, 2011; NAVROSKI et al., 2013). No caso da regeneração *in vitro*, Termignoni, Wang e Hu (1996) mencionam a indução da

embriogênese somática, porém até o momento não foram encontradas referências relativas à organogênese.

Dentre os múltiplos fatores que podem influenciar o sucesso do cultivo *in vitro*, dois em particular são mais importantes: a origem do explante e o meio de cultura (GAMBORG et al., 1976). Os meios de cultura estão, normalmente, constituídos por três grupos de componentes, os reguladores de crescimento, as substâncias orgânicas (açúcar, vitaminas e aminoácidos) e os elementos minerais (macronutrientes e micronutrientes) (VIDALIE, 1989 apud MORARD; HENRY, 1998). Este último tem sido o menos investigado, apesar de apresentar uma grande influência na pressão osmótica e no pH do meio de cultura, além de possuir funções essenciais na nutrição mineral das células e tecidos dos explantes (MORARD; HENRY, 1998). Por exemplo, um levantamento recente da base de dados da Web of Science (2014) revelou que, de 8.621 artigos indexados sob os termos “plant” + “tissue culture”, apenas 22 contêm o termo “mineral nutrition” na busca.

Os nutrientes possuem funções essenciais e específicas no metabolismo das plantas, atuando como constituintes de estruturas orgânicas, ativadores de reações enzimáticas ou como transportadores e osmorreguladores (MARSCHNER, 1995). Em consequência, a rapidez com que um tecido cresce, assim como a extensão e qualidade de suas respostas morfogênicas, está fortemente influenciada pela classe e concentração dos nutrientes fornecidos (NIEDZ; EVENS, 2007), os quais estão sempre presentes nos meios de cultura, diferente das fontes de carbono, reguladores de crescimento, vitaminas, aminoácidos, gelificantes e outras substâncias que podem ou não ser incluídas (GEORGE; DE KLERK, 2008).

A clorose por deficiência de ferro é uma das principais desordens nutricionais das plantas, causando perdas de rendimento e qualidade das culturas (TAGLIAVINI et al., 2000). A deficiência deste mineral foi encontrada na propagação *in vitro* de várias espécies, nas quais foi necessária a otimização dos meios de cultura através do incremento das concentrações de Fe ou do emprego de fontes alternativas deste nutriente (AL KAI; SALESSES; MOURAS, 1984; VAN DER SALM et al., 1994; CASTILLO; SMITH; MADHAVI, 1997; MONTEIRO et al., 2000; TSAO; REED, 2002; MOLASSIOTIS et al., 2004; AYNALÉM et al., 2006; MORENO et al., 2012).

Embora os processos morfogênicos sejam modulados tanto pela nutrição mineral como pelos reguladores de crescimento (ZAFFARI et al., 2000; RAMAGE; WILLIAMS, 2002), a maioria dos meios de cultura é definida de forma empírica e não apresenta especificidade quanto às necessidades nutricionais da espécie, muitas vezes limitando os

processos morfogênicos (CORREIA, 2006). Contudo, estas deficiências nutricionais podem ser parcialmente atenuadas pelos reguladores de crescimento que, por sua vez, poderiam ser reduzidos ou até suprimidos do meio de cultura se os requerimentos nutricionais fossem providos (PREECE, 1995; KOTHARI; AGARWAL; KUMAR, 2004), evidenciando um equilíbrio entre estes fatores.

O meio basal de maior sucesso na propagação *in vitro* de múltiplas espécies foi desenvolvido e otimizado para o cultivo *in vitro* de calos de tabaco por Murashigue e Skoog (1962). Entretanto, o meio WPM (LLOYDS; MCCOWN, 1980), muito utilizado em propagação *in vitro* de espécies lenhosas, foi desenvolvido para induzir brotações axilares em ápices de *Kalmia latifolia*, planta ornamental de crescimento arbustivo. Ambos os meios já foram empregados com êxito para a propagação *in vitro* de varias espécies e híbridos de eucaliptos (LE ROUX; VAN STANDEN, 1991; GLOCKE et al., 2006; PINTO et al, 2008; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009), porém com pouco sucesso quando usados para o cultivo *in vitro* de material adulto de *E. dunnii* (BILLARD; LALLANA, 2005; NAVROSKI, 2011; NAVROSKI et al., 2013).

As auxinas e citocininas são as substâncias que mais influenciam na regulação do crescimento e da morfogênese no cultivo *in vitro* de tecidos e órgãos vegetais (MACHAKOVA; ZAZIMALOVA; GEORGE, 2008), dentre elas o ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA) e a 6-benzilaminopurina (BAP), que têm demonstrado ser as mais efetivas na propagação *in vitro* de várias espécies e híbridos de eucaliptos (LE ROUX; VAN STANDEN, 1991; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). Contudo, estas respostas são moduladas também pelo genótipo, tendo um papel igual ou mais importante do que os reguladores de crescimento (BHOJWANI; RAZDAN, 1996).

Neste sentido, uma alternativa para incrementar o potencial de propagação da população consiste em incluir nos objetivos dos programas de melhoramento a seleção de genótipos por estas características (HAINES; WOOLASTON, 1991). Contudo, o ganho genético a partir desta metodologia depende da variabilidade e herdabilidade destas características (RUAUD et al., 1999), parâmetros desconhecidos atualmente para *E. dunnii*.

A carência de um sistema eficiente de propagação vegetativa e a escassa e irregular floração e produção de sementes de *E. dunnii* (GRAÇA, 1987; MARADEI, 1987) são limitações importantes para o avanço dos programas de melhoramento genético desta espécie. Portanto, seria um fato destacável possibilitar a clonagem de indivíduos superiores, permitindo transferir todo seu potencial genético, seja no estabelecimento de pomares clonais

ou no plantio clonal, para consolidar o cultivo desta espécie em áreas nas quais outras espécies de eucaliptos apresentam restrições devido à sensibilidade às geadas.

Nesse contexto, propôs-se desenvolver e otimizar um meio basal específico para a regeneração de gemas adventícias e a multiplicação de gemas axilares de *E. dunnii*, assim como determinar o controle genético para características morfofisiológicas *in vitro*.

## Referências

AL KAI, H.; SALETTES, G.; MOURAS, A. Multiplication *in vitro* du noisetier (*Corylus avellana* L.). **Agronomie**, Les Ulis, v.4, n. 4, p. 399-402, 1984.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do Eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442 p.

ALMEIDA, J.R.; MARTIN, C.R.; DUTRA, L.F. Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* visando estabelecimento *in vitro*. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 15, n. 1, p. 54-60, 2008.

ARNOLD, R.J.; LUO, J.; CLARKE, B. **Trials of cold-tolerant eucalypt species in cooler regions of south central China**. Canberra: ACIAR, 2004. 106 p. (Technical Reports, 57).

ASSIS, T.F.; FETT-NETO, A.G.; ALFENAS, A.C. Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on eucalyptus. In: WALTER, C.; CARSON, M. (Ed.). **Plantation forest biotechnology for the 21st Century**. Kerala: Research Singpost, 2004. p. 303-333.

AYNALEM, H.M.; RIGHETTI, T.L.; REED, B.M. Iron formulation affects *in vitro* storage of hops: an image analysis. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, Columbia, v. 42, n. 5. p. 405-410, 2006.

AZMI, A.; NOIN, M.; LANDRE, P.; PROUTEAU, M.; BOUDET, A. M.; CHRIQUI, D. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. hypocotyls: ontogenesis and ploidy level of the regenerants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 9-16, 1997.

BAKER, A.; WALKER, S. An assessment of the relative amenability to vegetative propagation by leafy cuttings of 14 tropical and subtropical *Eucalyptus* and *Corymbia* species. In: SUZUKI, K.; ISHII, K.; SAKURAI, S.; SASAKI, S. (Ed.). **Plantation technology in tropical forest science**. Tokyo: Springer, 2005. p. 79-87.

BALMELLI, G. **Daño de heladas en *Eucalyptus***: evaluación de daño en especies y orígenes en el primer invierno. Tacuarembó: INIA, 1993. 32 p. (Serie Técnica, 40).

BANDYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSSEN, G.; HAMILL, J. D. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species - *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Plant Science**, Limerick, v. 140, n. 2, p. 189-198, 1999.

BILLARD, C.E.; LALLANA, V.H. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, Curitiba, v. 16, n. 30, p. 199-216, 2005. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14503008>>. Acesso em: 08 fev. 2014.

BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice**. Elsevier, Amsterdam: Elsevier, 1996. 767 p.

BOLAND, D.D.; BROOKER, M.I.H.; CHIPPENDALE, G.M.; HALL, N.; HYLAND, B.P.M.; JOHNSTON, R.D.; KLEINIG, D.A.; MCDONALD, M.W.; TURNER, J.D. **Forest trees of Australia**. Melbourne: Nelson; CSIRO, 1984. 687 p.

BOOTH, T.H. Eucalypts and their potential for invasiveness particularly in frost-prone regions. **International Journal of Forestry Research**, New York, v. 2012, ID 837165, 7 p. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijfr/2012/837165/>>. Acesso em: 11 jan. 2013.

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

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

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

BRONDANI, G.E.; BENEDINI BACCARIN, F.J.; WIT ONDAS, H.W.; STAPE, J.L.; GONÇALVES, A.; ALMEIDA, M. Low temperature, IBA concentrations and optimal time for adventitious rooting of *Eucalyptus benthamii* mini-cuttings. **Journal of Forestry Research**, Harbin, v. 23, n. 4, p. 583-592, 2012b.

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; HANSEL, F.A.; ARAÚJO, M.A. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum Agronomy** Maringá, v. 33, n. 4, p. 655-663, 2011.

BYRNE, M.; MURRELL, J.C.; OWEN, J.V.; WILLIAMS, E.R.; MORAN, G.F. Mapping of quantitative trait loci influencing frost tolerance in *Eucalyptus nitens*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, n. 5/6, p. 975-979, 1997.

CAMPINHOS, E.; IKEMORI, Y.K. Mass production of *Eucalyptus spp* by rooting cuttings. **Silvicultura**, São Paulo, v. 8, n. 32, p. 770-775, 1983.

CASTILLO, B.; SMITH, M.A.L.; MADHAVI, D.L. Interactions of irradiance level and iron chelate source during shoot tip culture of *Carica papaya* L. **Hortscience**, Alexandria, v. 32, n. 6, p. 1120-1123, 1997.

CONCHA MARCAVILLACA, M.; MONTALDI, E.R. Enraizamiento de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. **IDIA Suplemento Forestal**, Buenos Aires, v. 1, p. 65-72, 1964.



COOPER, M.A.; GRAÇA, M.E.C. **Perspectivas para a maximização de enraizamento de estacas de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. Colombo: EMBRAPA Florestas, 1987. 9 p. (Circular Técnica, 12).

CORDEIRO, G.M. **Otimização da propagação clonal de *Eucalyptus globulus* Labill.** 2013. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz," Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11144/tde-22082013-155317/>>. Acesso em: 30 maio 2014.

CORREIA, D. **Macronutrientes, aspectos nutricionais e bioquímicos no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis***. 2006. 175 p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11150/tde-21032007-165400/>>. Acesso em: 02 nov. 2013.

CRESSWELL, R.J.; DE FOSSARD, R.A. Organ culture of *Eucalyptus grandis*. **Australian Forestry**, Armidale, v. 37, n. 1, p. 55-69, 1974.

DELWAULLE, J.C.; LAPLACE, Y.; QUILLET, G. Production massive de boutures d. eucalyptus en République Populaire du Congo. **Silvicultura**, São Paulo, v. 8, n. 32, p. 779-781, 1983.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 58, n. 1, p. 49-59, 2009.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; WYK, G. van. ***Eucalypt* domestication and breeding**. Oxford: Oxford Science, 1993. 288 p.

FERNÁNDEZ LONG, M.E.; BARNATÁN, I.E.; SPESCHA, L.; HURTADO, R.; MURPHY, G. Caracterización de las heladas en la región pampeana y su variabilidad en los últimos 10 años. In: CONGRESO NACIONAL DE METEOROLOGÍA, 9., 2005, Buenos Aires. **Proceedings...** Buenos Aires, 2005.

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

FRANCLLET, A. Amélioration des reboisements d'eucalyptus par multiplication végétative. In: FAO. **Consultation mondiale sur la génétique forestière et l'amélioration des arbres**. Roma: FAO/FORGEN, v. 63, n. 5, p. 1-5, 1963.

GAMBORG, O.L.; MURASHIGE, T.; THORPE, T.A.; VASIL, J.K. Plant tissue culture media. **In vitro**, New York, v. 12, n. 7, p. 473-478, 1976.

GEORGE, E.F.; DEBERGH, P.C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G-J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 29-64.

GEORGE, E.F.; DE KLERK G.J. The components of plant tissue culture media. I: Macro- and micro-nutrients. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G-J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 65-114.

GIRIJASHANKAR, V. Genetic transformation of eucalyptus. **Physiology and Molecular Biology of Plants**. Lucknow, v. 17, n. 1, p. 9-23, 2011.

GLOCKE, P.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. 6-Benzylamino purine stimulates *in vitro* shoot organogenesis in *Eucalyptus erythronema*, *E. stricklandii* and their interspecific hybrids. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 109, n. 4, p. 339-344, 2006.

GOLFARI, L. **Distribución regional y condiciones ecológicas de los eucaliptos plantados en la Argentina**: problemas inherentes. Buenos Aires: Centro de Investigaciones y Experiencias Forestales, 1985. 19 p. (CIEF. Publicación Técnica, 1).

GOLFARI, L.; CASER, R.L.; MOJRA, V.P.G. **Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil**. Brasília: PRODEPEF, 1978. 66 p. (Série Técnica, v. 11, n. 1).

GONZÁLEZ, R.; RÍOS, D.; AVILÉS F.; SÁNCHEZ-OLATE, M. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus globulus* mediante sistema de inmersión temporal. **Bosque**, Valdivia, v. 32, n. 2, p. 147-154, 2011.

GRAÇA, M.E.C. Avaliação do florescimento e do potencial de produção de sementes de *Eucalyptus dunnii* Maiden no Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v. 14, n. 1, p. 2-12, 1987.

\_\_\_\_\_. **Enraizamento *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii* utilizando altas concentrações de auxinas**. Colombo: EMBRAPA, CNPF, 1997. 3 p. (Pesquisa em Andamento, 48).

GRAÇA, M.E.C.; MENDES, S. Micropropagation of *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Annales des Sciences Forestières**, Les Ulis, v. 46, n. 2, p. 140-144, 1989.

GRAÇA, M.E.C.; KALIL, A.N.; MEDEIROS, A.C.S.; TAVARES, F.R. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 43, p. 107-112, 2001.

HAINES, R.J.; WOOLASTON, R.R. The influence of reproductive traits on the capture of genetic gain. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 21, n. 2, p. 272-275, 1991.

HENSON, M.; BOYTON, S.; DAVIES, M.; JOE, B.; KANGANE, B.; MURPHY, T.; PALMER, G.; VANCLAY J. Genetic parameters of wood properties in a 9 year old *E. dunnii* progeny trial in NSW, Australia. In: INTERNATIONAL IUFRO CONFERENCE OF THE WP2.08.03 ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTUS, 1., 2004, Aveiro. ***Eucalyptus in a changing world***: proceedings... Aveiro: Instituto Investigação da Floresta e Papel, 2004. p. 183.

- HIGA, R.C.V.; HIGA, A.R.; TREVISAN, R.; MARCOS V.R.S. Resistência e resiliência a geadas em *Eucalyptus dunnii* Maiden plantados em Campo do Tenente, PR. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 40, p.67-76, 2000.
- HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus***: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. Piracicaba: IPEF, 2000. 11 p. (Circular Técnica, 192).
- HUANG, Z.C.; ZENG, F.H.; LU, X.Y. Efficient regeneration of *Eucalyptus urophylla* from seedling-derived hypocotyls. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 1, p. 131–134, 2010.
- HUNTER, G.C.; CROUS, P.W.; CARNEGIE, A.J.; WINGFIELD, M.J. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of *Eucalyptus* spp. in native and introduced areas. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2009.
- JAIN, S.M.; HÄGGMAN, K. (Ed.). **Protocols for micropropagation of woody trees and fruits**. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. 559 p.
- LARSON, C.; GÓMEZ, C.; SÁNCHEZ, M.; RÍOS, D. Caulogénesis Indirecta en *Eucalyptus globulus*. **Revista Bosque**, Valdivia, v. 27, n. 3, p. 250-257, 2006.
- LE ROUX, J.J.; VAN STADEN, J. Micropropagation and tissue culture of Eucalyptus-a review. **Tree Physiology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 435-477, 1991.
- LIBBY, W.J. Clonal propagation. **Journal of Forestry**, Bethesda, v. 84, n. 1, p. 37–42, 1986.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B.H. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagation Society**, Ashville, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MACHAKOVA, I.; ZAZIMALOVA, E.; GEORGE, E.F. Plant growth regulators. I: Introduction, auxins, their analogues and inhibitors. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G-J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 175-204.
- MALYSZ, M.; CADORE, D.; TIBOLA, E.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CANSIAN, R.L.; MOSSI, J.A. Desinfestação e micropropagação de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Perspectiva**, Erechim, v. 35, n. 131, p. 69-77, 2011.
- MARADEI, D. *Eucalyptus dunnii*: primeros resultados en Argentina. In: SIMPOSIO SOBRE SILVICULTURA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO DE ESPECIES FORESTALES, 1., 1987, Buenos Aires. Buenos Aires: CIEF, 1987. v. 3, p. 43-52.
- MARCÓ, M.E.; WHITE, T.L. Genetic parameters estimates and genetic gains for *Eucalyptus grandis* and *E. dunnii* in Argentina. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 9, n. 3, p. 205–215, 2002.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1995. 889 p.

- MATOS, J.L.M.; IWIKARI, S.; ROCHA, M.P.; PAIM, R.M.; ANDRADE, L.O. Redução do efeito das tensões de crescimento em toras de *Eucalyptus dunnii*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 64, n. 11, p. 128-135, 2003.
- MERKLE, S.A.; NAIRN C.J. Hardwood tree biotechnology. **In Vitro Cell & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 41, n. 5, p. 602–619, 2005.
- MEZZETTI, B.; ROSATI, P.; CASALICCHIO, G. *Actinidia deliciosa* C.F. Liang *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 91-98, 1991.
- MINGHE, L.; RITCHIE, G.A. Eight hundred years of clonal forestry in China: I. Traditional afforestation with Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.). **New Forests**, Dordrecht, v. 18, n. 1, p. 131-142, 1999.
- MOLASSIOTIS, A.N.; DIMASSI, K.; THERIOS, I.; DIAMANTIDIS, G. Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* x *P. persica*) explants *in vitro*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 47, n. 1, p. 141-144, 2003.
- MONTEIRO, A.C.B.A.; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. F. *flaviacarpa* Deg.). **In Vitro Cell & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 36, n. 6, p. 527-531, 2000.
- MORENO, R.J.L.; MORALES, A.V.; GRADAILLE, M.D.; GÓMEZ, L. Towards scaling-up the micropropagation of *Juglans major* (Torrey) Heller var. 209 x *J. regia* L., a hybrid walnut of commercial interest. In: IUFRO WORKING PARTY CONFERENCE ON “INTEGRATING VEGETATIVE PROPAGATION, BIOTECHNOLOGIES AND GENETIC IMPROVEMENT FOR TREE PRODUCTION AND SUSTAINABLE FOREST MANAGEMENT”, 2012, Brno. **Proceedings...** Disponível em: <<http://www.iufro20902.org/>>. Acesso em: 05 dez. 2012.
- MULLINS K.V.; LLEWELLYN D.J.; HARTNEY V.J.; STRAUSS S.; DENNIS, E.S. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 16, n. 11, p. 787–791, 1997.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.
- MURPHY, T.N.; HENSON, M.; VANCLAY, J.K. Growth stress in *Eucalyptus dunnii*. **Australian Forestry**, Armidale, v. 68, n. 2, p. 144-149, 2005.
- NAVROSKI, M.C. **Multiplicação *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2011. 101 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.
- 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**, Lavras, v. 19, n. 4, p. 545-550, 2013.

- NEUMANN, K.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant cell and tissue culture: a tool in biotechnology basics and application**. Heidelberg: Springer, 2009. 333 p.
- NIEDZ, R.P.; EVENS, T.J. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. **In Vitro Cell & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 43, n. 4, p. 370-381, 2007.
- NUGENT, G.; CHANDLER, S.F.; WHITEMAN, P.; STEVENSON, T.W. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus* Labill. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 37, n. 3, p. 388-391, 2001.
- PÁDUA, F.A.; TURGILHO, P.F.; ROSADO, S.C.S.; LIMA, J.T.; CARDOSO JR., A.A.; OLIVEIRA, A.C. Estimativa dos parâmetros genéticos das tensões de crescimento em clones de *Eucalyptus*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 66, n. 15, p. 152-160, 2004.
- PATHAUER, P. Subprograma eucaliptos y pinos en la región pampeana. In: NORVERTO, C.A. (Ed.). **Mejores árboles para más forestadores**. Buenos Aires: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, 2005. p. 95-115.
- PÉREZ, G.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, B.D.; FINKENAUER, E.; WINGFIELD, M.J. Mycosphaerella leaf disease (MLD) outbreak on *Eucalyptus globulus* in Brazil caused by *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella nubilosa*). **Phytopathologia Mediterranea**, Firenze, v. 48, p. 302-306, 2009a.
- PÉREZ, G.; HUNTER, G.C.; SLIPPERS, B.; PÉREZ, C.A.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. *Teratosphaeria* (*Mycosphaerella*) *nubilosa*, the causal agent of Mycosphaerella Leaf Disease (MLD), recently introduced into Uruguay. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 125, n. 1, p. 109-118, 2009b.
- PINTO, G.; SILVA, S.; PARK, Y.-S.; NEVES, L.; ARAUJO, C.; SANTOS, C. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill: basal medium and anti-browning agents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, n. 1, p. 79-88, 2008.
- POGGIANI, F.; SUITER FILHO, W. Importância da nebulização intermitente e efeito do tratamento hormonal na formação de raízes em estacas de eucalipto. **IPEF**, Piracicaba, v. 9, n. 7, p.119-129, 1974.
- PRAKASH, M.; GURUMURTHI, K. Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 100, n. 1, p. 13-20, 2010.
- PREECE, J.E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? **Plant Tissue Culture Biotechnology**, Rohovot, v. 1, n. 1, p. 26–37, 1995.
- RAJ, S.; BRÄUTIGAM, K.; HAMANISHI, E.T.; WILKINS, O.; THOMAS, B.; SCHROEDER, W.; MANSFIELD, S.D.; PLANT, A.L.; CAMPBELL, M.M. Clone history shapes *Populus* drought responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 30, p. 12521–12526, 2011.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 38, n. 2, p. 116-124, 2002.

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

RUAUD, J.N.; LAWRENCE, N.; PEPPER, S.; POTTS, B. M.; BORRALHO, N.M.G. Genetic variation of *in vitro* rooting ability with time in *Eucalyptus globulus*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 48, n. 1, p. 4-7, 1999.

SCHACHT, L.; GARCIA, J.N. e VENCOVSKY, R. Variação genética de indicadores de tensão de crescimento em clones de *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 54, n. 5, p. 55-68, 1998.

SCHAWMBACH, J.; FADANELLI, C.; FETT-NETO, A.G. Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 487-494, 2005.

SILVA, P.H.M.; BARRICHELO, L.E.G. Progressos recentes na área florestal. In: PATERNIANI, E. (Ed.). **Ciência, agricultura e sociedade**. Brasília: Embrapa, 2006. p. 439-456.

SMITH, H.J.; HENSON, M. Achievements in forest tree genetic improvement in Australia and New Zealand 3: *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Australian Forestry**, Armidale, v.70, n. 1, p. 17-22, 2007.

SOUZA JUNIOR, L.; WENDLING, I. Propagação vegetativa de *Eucalyptus dunnii* via miniestaquia de material juvenil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v. 46, n. 1, p. 21-30, 2003.

SUTTON, B. Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantation using somatic embryogenesis. **Annals of Forest Science**, Les Ulis, v. 59, n. 5/6, p. 657-661, 2002.

SWAIN, T.L.; GARDNER, R.A.W.; CHIAPPERO, C.C. **Final results of three ICFR *Eucalyptus dunnii* Trials in Kwazulu-Natal, South Africa**. Scottsville: Institute for Commercial Forestry, 2000. 15 p. (Research Bulletin, 02/2000).

TAGLIAVINI, M.; ABADIA, J.; ROMBOLÀ, A.D.; TSIPOURIDIS, C.; MARANGONI, B. Agronomic means for the control of iron deficiency chlorosis in deciduous fruit trees. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 23, n. 11/12, p. 2007-2022, 2000.

TERMIGNONI, R.R.; WANG, P.; HU, C. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 45, n. 2, p. 129-132, 1996.

THOMAS, D.S.; HENSON, M.; JOE, B.; BOYTON, S.; DICKSON, R. Review of growth and wood quality of plantation-grown *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Australian Forestry**, Armidale, v. 72, n. 1, p. 3-11, 2009.

- TSAO, C.; REED, B.M. Gelling agents, silver nitrate, and sequestrene iron influence adventitious shoot and callus formation from *Rubus* leaves. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 38, n. 1, p. 29–32, 2002.
- VALLEDOR, L.; HASBUN, R.; MEIJON, M.; RODRIGUEZ, J.L.; SANTAMARIA E.; VIEJO, M.; BERDASCO, M.; FEITO, I.; FRAGA, M.F.; CANAL, M.J.; RODRIGUEZ, R. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 91, n. 2, p. 75–86, 2007.
- VAN DER SALM, T.P.M.; VAN DER TOORN, C.J.G.; HANISCH TEN CATE, C.H.; DUBOIS, L.A.M.; DE VRIES, D.P.; DONS, H.J.M. Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrid* L. 'Moneyway'. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Heidelberg, v.37, n. 1, p. 73–77; 1994.
- VASIL, I.K. A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 27, n. 9, p. 1423-40, 2008.
- VIDELA, P.; CHUNG, P. Micropropagación de *Eucalyptus globulus* a través de segmentos nodales. **Ciencia e Investigación Forestal**, Santiago de Chile, v. 10, n. 2, p. 165-173, 1996.
- WHITE, T.L.; ADAMS, W.T.; NEALE, D.B. **Forest genetics**. Wallingford: CABI Publ., 2007. 704 p.
- XAVIER, A.; OTONI, C.W.; PENCHEL, R.M. Micropropagação e enxertia in vitro de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnología florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 55-74.
- YANG, M.Z.; JIA, S.R.; PUA, E.C. High frequency of plant regeneration from hypocotyl explants of *Brassica carinata* A. Br. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 24, n. 2, p. 79-82, 1991.
- ZAFFARI, G.R.; PERES, L.E.P.; SUZUKI, R.M.; KERBAUY, G.B. Off-type micropropagated banana plants: endogenous levels of auxin, cytokinins and IAA-oxidase. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 520, p. 219-227, 2000.

## 2 DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO BASAL PARA *Eucalyptus dunnii* BASEADO NOS TEORES NUTRICIONAIS DE BROTAÇÕES DE CEPAS E OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO *IN VITRO*

### Resumo

Na cultura de tecidos, a nutrição mineral possui uma importância extraordinária, uma vez que as células e tecidos envolvidos no processo estão sob influência direta do meio em que se encontram, dependendo quase totalmente dos nutrientes e reguladores de crescimento fornecidos pelo meio de cultura. Os meios basais MS, WPM e JADS são os mais utilizados na propagação *in vitro* de eucaliptos, porém, eles têm demonstrado limitado sucesso para *E. dunnii*, o que leva a aplicação de métodos alternativos. A formulação e/ou otimização de meios basais utilizando informação nutricional de tecidos vegetais foi realizada com sucesso para várias espécies, indicando o grande potencial deste método. Desta forma, neste trabalho é proposta e descrita a formulação de um meio basal específico para esta espécie, com base nos teores de macro e micronutrientes minerais determinados em brotações jovens de cepas, considerando este material como o mais adequado devido ao seu estado fisiológico e ontogênico. Para iniciar a validação do meio basal obtido, foi estudado o efeito do meio de suporte e de distintas fontes e concentrações de Fe no desenvolvimento *in vitro* de brotações de *E. dunnii*. Os resultados obtidos indicam que o meio basal pode ser utilizado na multiplicação de gemas axilares com ágar como meio suporte e a adição de 0,128 ou 0,256 mmol L<sup>-1</sup> de EDDHA/Fe (143 ou 286 mg L<sup>-1</sup> de Basafer<sup>®</sup> Plus) como fonte de Fe, evitando a formação excessiva de calos, a oxidação e a clorose. Além disso, o emprego de 0,032 mmol L<sup>-1</sup> EDTA/Fe nas mesmas condições se mostra indicado para a obtenção de organogênese. Por outro lado, a utilização de meio líquido e espuma fenólica como meio suporte, após duas lavagens consecutivas com água deionizada a 100°C, obteve os maiores níveis de enraizamento, indicando seu potencial para esta finalidade.

Palavras-chave: Micropropagação; Nutrição mineral; Espuma fenólica; Ágar; Ferro; Quelatos

### Abstract

In tissue culture, mineral nutrition has a significant relevance since cells and tissues involved in the process are under direct influence of the environment, relying on nutrients and growth regulators provided by the culture medium. The MS, WPM and JADS basal media are the most used in *in vitro* propagation of eucalyptus; however, they have shown poor performance for *E. dunnii* propagation, a situation that requires the implementation of alternative methods. Basal media formulation and/or optimization using nutritional information of plant material have been successfully performed for several species, indicating the great potential of this method. Thus, we proposed and described a basal medium formulation method for *E. dunnii*, based on the macro and micronutrients content of young stump shoots, considered the most suitable materials because of their ontogenic and physiological state. Moreover, to validate the obtained basal medium, the effect of support material and iron sources and concentrations on the *in vitro* development of axillary buds was evaluated. The results suggest that the basal medium, added with 0.128 or 0.256 mmol L<sup>-1</sup> of EDDHA/Fe (143 or 286 mg L<sup>-1</sup> Basafer<sup>®</sup> Plus) as Fe source, can be used in the multiplication of axillary buds with agar as a support medium, avoiding excessive callus formation, oxidation and Fe induced chlorosis. Besides, the use of 0.032 mmol L<sup>-1</sup> EDTA/Fe under the same conditions seems promising to achieve bud and callus organogenesis. In addition, the



use of liquid medium and phenolic foam after two consecutive washes with deionized water at 100°C yielded the highest rooting levels, demonstrating their potential for this purpose.

Keywords: Micropropagation; Mineral nutrition; Phenolic foam; Agar; Iron; Chelates

## 2.1 Introdução

A otimização de um meio de cultura para a micropropagação, com ênfase na nutrição mineral, representa um grande desafio, em decorrência dos diferentes requerimentos nutricionais entre as espécies e da grande interação que existe entre os nutrientes minerais (POOTHONG; REED, 2014).

Um dos métodos disponíveis sugere testar a concentração de cada nutriente mineral, individual e sucessivamente, para determinar seu valor ótimo e evitar a ocorrência de limitantes nutricionais (MORARD; HENRY, 1998). Desta forma, foi desenvolvido o MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962), o meio basal mais utilizado na cultura de tecidos de plantas que, ao mesmo tempo, constitui a base de muitos meios de cultura que modificam parcialmente sua composição mineral (DRIVER; KUNIYUKI, 1984; GRIBBLE et al., 2002).

Além de tempo e recursos, testar um fator por vez requer grandes quantidades de material vegetal, que em espécies recalcitrantes nem sempre estão disponíveis (NAS; READ, 2004). Por outro lado, a combinação dos níveis ótimos individuais não garante o sucesso do meio de cultura obtido (DE-EKNAMBUL; ELLIS, 1985), provavelmente pelo alto grau de interação entre os distintos componentes (SHAFF et al., 2010).

Um método alternativo, descrito por Spaargaren (1996) é a formulação de meios de cultura com os mesmos níveis/proporções de nutrientes minerais em células, tecidos ou organismos a serem propagados. Adicionalmente, o autor sugere que esses nutrientes estejam presentes em formas iônicas passíveis de serem absorvidas e metabolizadas, empregando a menor quantidade possível de sais minerais.

Embora o emprego dos teores nutricionais de tecidos vegetais para o ajuste dos meios basais tenha sido utilizado com sucesso em espécies como *Corylus avellana* (NAS; READ, 2004; BACCHETTA et al., 2008), *Musa cavendishii* (SOUZA; GONÇALVES, 1996), *Olea europaea* (RUGINI, 1984), *Solanum paludosum* (MORARD; HENRY, 1998), *Vriesea sp.* (ARANDA-PERES et al., 2009), nestes estudos, não foi considerada a especiação iônica dos nutrientes em solução, fato de grande relevância uma vez que os nutrientes minerais são obtidos pelas plantas principalmente através da absorção de íons inorgânicos (BERGMANN, 1992; MARSCHNER, 1995).

Que um nutriente seja parte de uma solução não significa que ele esteja facilmente disponível para a planta, as interações entre íons, o pH, a complexação e a precipitação podem ocorrer, diminuindo a atividade livre do íon de interesse (SHAFF et al., 2010). Neste caso, é necessário o uso de ferramentas que permitam uma caracterização do equilíbrio iônico da solução nutritiva, caso dos softwares GEOCHEM-EZ (SHAFF et al., 2010) e Visual MINTEQ (GUSTAFSONN, 2006), entre outros, que possibilitam a definição da composição mineral de uma solução nutritiva com base na concentração iônica livre dos nutrientes em solução.

Ingestad (1987) e Ingestad e Ågren (1995) propuseram o princípio de crescimento em equilíbrio dinâmico, segundo o qual as taxas de crescimento são estabilizadas devido à adição constante de nutrientes minerais ao meio nas quantidades necessárias para manter o adequado estado nutricional da planta. Em consequência, para atingir uma determinada produtividade de biomassa, é necessário fornecer uma quantidade suficiente de nutrientes para sustentá-la, e assim manter o estado nutricional das culturas. Neste sentido, Correia (1993) sugere empregar uma produção alvo de 15 g de biomassa por cada litro de meio de cultura, definidos como crescimento ótimo e máximo para brotações de *E. grandis*.

Estes conceitos já foram aplicados em *E. grandis*, resultando no meio de cultura JADS, cuja definição se baseou em informações bibliográficas de teores de nutrientes em material juvenil, a partir das quais o meio de cultura foi formulado com balanço iônico ajustado e níveis de nutrientes considerados adequados para um crescimento ótimo e máximo (CORREIA, 1993; CORREIA et al., 1995). Ao mesmo tempo, estes princípios foram empregados com sucesso na otimização dos meios de cultura para *Passiflora edulis* (MONTEIRO et al., 2000) e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (GRIBBLE et al., 2002).

A análise foliar é uma ferramenta muito útil para avaliar o estado nutricional das plantas (BERGMANN, 1992; MOURÃO FILHO, 2004). Para eucaliptos, a determinação do estado nutricional de povoamentos e mudas está baseado em análises químicas de folhas totalmente desenvolvidas (BELLOTE; SILVA, 2000). Por causa da natureza dinâmica da composição dos seus tecidos, as folhas representam uma fonte de informação importante sobre o estado fisiológico da planta, sendo significativamente influenciadas pela idade, pelo grau de maturidade e pelas interações entre a absorção e translocação de nutrientes (WALWORTH; SUMNER, 1987). Para Römheld (2012), com exceção do Ca e B, há geralmente uma diminuição na concentração dos nutrientes com o aumento da idade dos tecidos, principalmente causado pelo incremento na proporção de material estrutural e

material de reserva. Este último pode ser uma das causas pelas quais o teor de nutrientes minerais nas folhas nem sempre condiz com o das brotações *in vitro*, sendo estes últimos geralmente maiores (GRIBBLE et al., 2002; CORREIA, 2006; HIGASHI; GONÇALVES, 2006).

Com base no exposto, resulta evidente que outras fontes de material vegetal deveriam ser consideradas para gerar informação nutricional de referência que possa ser empregada na formulação e/ou ajuste de meios basais. Neste sentido, as brotações jovens de touças apresentam duas características favoráveis: correspondem aos tecidos de maior juvenildade que podem ser colhidos de uma árvore adulta (OLESEN, 1978), e grande parte do seu sustento provém de reservas orgânicas e minerais dos nutrientes no sistema radicular (TROMP, 1983; REIS; KIMMINS, 1986; BARROS; TEIXEIRA; TEIXEIRA, 1997; BARBAROUX; BREDÁ; DUFRENE, 2003), atenuando em estágios iniciais o efeito do ambiente no estado nutricional.

Uma limitação deste método para nutrientes que normalmente se encontram em distintos estados de oxidação e complexação, como o ferro, consiste no fato das análises químicas de tecidos determinarem apenas a concentração total destes nutrientes, questão que poderia implicar um posterior ajuste do meio basal para garantir sua disponibilidade. Neste sentido, a otimização dos meios de cultura através do incremento das concentrações ou do uso de fontes alternativas de Fe foi realizada em várias espécies (AL KAI; SALESSES; MOURAS, 1984; CASTILLO; SMITH; MADHAVI, 1997; VAN DER SALM et al., 1994; MONTEIRO et al., 2000; TSAO; REED, 2002; AYNALÉM et al., 2006). O Fe é o segundo mineral metálico mais abundante na superfície terrestre após o alumínio, porém, apresenta baixa solubilidade em condições naturais, sendo os quelatos de  $Fe^{3+}$  e ocasionalmente  $Fe^{2+}$ , as formas solúveis predominantes (MARSCHNER, 1995; BROADLEY et al., 2012).

O Fe é componente de enzimas catalasas e peroxidases envolvidas na desintoxicação por  $H_2O_2$ , dos citocromos e outras proteínas envolvidas na fotossíntese, na respiração, na redução do nitrito e na síntese de cloroplastos (BERGMANN, 1992; TAIZ; ZEIGER, 2006). De certa forma, o Fe pode ser considerado o responsável direto da “produção de energia respiratória”. Em consequência, a falta de Fe se traduz em uma redução da quantidade de energia disponível para a síntese e crescimento (BERGMANN, 1992). O principal sintoma de deficiência é a clorose nas folhas jovens, em decorrência dos baixos teores de clorofila, afetando com menor intensidade os carotenoides (BROADLEY et al., 2012).

Os quelatos são complexos orgânicos polidentados, ou seja, que apresentam pelo menos duas ligações covalentes. A origem do termo vem do grego ‘*chela*’, que literalmente

significa pinça, relacionado à forma em que estes compostos capturam os elementos catiônicos (MORGAN; DREW, 1920). O sulfato ferroso ( $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) vem sendo usado há mais de 150 anos como fonte de Fe para soluções nutritivas (SACHS, 1860 apud STEINER; VAN WINDEN, 1969), entretanto, grandes avanços têm sido obtidos com o uso de quelatos como os citratos de ferro (GILE; CARRERO, 1916), os sais de ferro do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (JACOBSON, 1951) e o mais estável ácido etilenodiamino-diorto-hidroxifenilacético (o,o-EDDHA) e seus compostos análogos (CHANEY; BROWN; TIFFIN, 1972; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ; GARCÍA-MARCO; LUCENA, 2005).

Os explantes a partir de plântulas germinadas *in vitro* são muito empregados na otimização de técnicas de micropropagação e organogênese (FAISAL; SIDDIQUI; ANIS, 2006; HIGASHI; GONÇALVES, 2006, BARIK et al., 2007; PRANATI NAYAK; BEHERA; THIRUNAVOUKKARASU, 2007; PARVEEN; SHAHZAD; SAEMA, 2010). O uso deste tipo de material vegetal em estágios iniciais permite obter maiores quantidades de explantes e diminuir a possibilidade de contaminação das culturas.

O ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA) e a 6-benzilaminopurina (BAP) são os reguladores de crescimento mais amplamente utilizados na multiplicação *in vitro* de eucaliptos. Resultados favoráveis foram obtidos em várias espécies e híbridos de eucaliptos (LE ROUX; VAN STANDEN, 1991; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009), mais especificamente, em várias espécies dentro da seção *Maidenaria* caso do *E. dunnii*, *E. globulus*, *E. nitens*, *E. viminalis* e *E. benthamii* x *E. dunnii* com dosagens entre 0,01 - 0,1 mg L<sup>-1</sup> e 0,1 - 0,5 mg L<sup>-1</sup> para ANA e BAP, respectivamente (FURZE; CRESSWELL, 1985; WIECHETECK; GRAÇA; DE ARAÚJO, 1989; VIDELA; CHUNG; 1996; GRAÇA et al., 2001; GOMES; CANHOTO, 2003; BRONDANI et al., 2009; BORGES et al., 2011; BRONDANI et al., 2011; NAVROSKI, 2011).

Por causa de sua estabilidade, claridade, natureza não tóxica e baixa influência metabólica, o ágar vem sendo usado há mais de 100 anos como meio de suporte para culturas bacteriológicas e de tecidos vegetais, (JAIN; BABAR, 2002, ROMBERGER; TABOR, 1971 apud PEREIRA NETO et al., 2007). Contudo, a utilização de diferentes marcas, concentrações e lotes de fabricação afeta as características físicas e químicas dos meios de cultura, sendo a maior fonte de variação desconhecida nos testes de cultivo *in vitro* de tecidos vegetais (RAMAGE; WILLIAMS, 2002; SCHOLTEN; PIERIK, 1998).

Segundo George e De Klerk (2008), os nutrientes minerais, especialmente micronutrientes, podem ser adicionados involuntariamente aos meios de cultura com o ágar.

Ao mesmo tempo, o ágar pode adsorver nutrientes minerais da solução (SCHOLTEN; PIERIK, 1998), efeito que pode alterar seu equilíbrio iônico.

A espuma fenólica, entretanto, é um substrato muito usado na cultura hidropônica por apresentar boa capacidade de retenção de umidade, excelente aeração e baixa desintegração no manuseio (PAULUS et al., 2005). Entretanto, os estudos da utilização da espuma fenólica na propagação *in vitro* são escassos, principalmente como substrato para enraizamento adventício ou como meio de suporte para estudos de omissão de nutrientes minerais (GEBHARDT, 1985; TANAKA; DAM THI THANH GIANG; MURAKAMI, 2005; HIGASHI, 1996).

Em geral, níveis de pH levemente ácidos (5 a 6) são recomendados para o cultivo *in vitro* (BHOJWANI; RAZDAN, 1996; GEORGE; DE KLERK, 2008), porém, por causa do processo de fabricação, no qual são usados ácidos orgânicos e/ou inorgânicos como agentes catalisadores, a espuma fenólica normalmente apresenta um pH muito ácido (~3). Uma extrema acidez no meio de cultura pode influir na disponibilidade dos nutrientes minerais, assim como no nível de hidrólise da sacarose e na absorção dos reguladores de crescimento (THORPE et al., 2008; DE KLERK; HANECAKOVA; JÁSIC, 2008), fatos que afetariam o desenvolvimento dos explantes.

Estas questões indicam a necessidade de uma correção do pH da espuma fenólica, operação normalmente realizada com soluções de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), carbonato de magnésio ( $\text{MgCO}_3$ ), carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), óxido de cálcio ( $\text{CaO}$ ), ou hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) (KOPPERS COMPANY, 1985; GREEN UP, 2012). Contudo, na cultura de tecidos, esta prática não poderia ser aplicada sem alterar o equilíbrio iônico do meio de cultura. Uma alternativa a estes procedimentos consiste na lavagem da espuma fenólica com água deionizada a alta temperatura com o objetivo de remover ou diluir esses resíduos até níveis aceitáveis.

Este estudo foi dividido em quatro etapas: (i) determinação do tipo de amostra apropriada e desenvolvimento de um meio basal específico para *E. dunnii* com base nas concentrações de nutrientes minerais no tecido vegetal; (ii) definição do número de lavagens necessárias para o acondicionamento da espuma fenólica; (iii) avaliação do efeito do estado físico do meio de cultura nas respostas morfofisiológicas *in vitro* de gemas axilares de *E. dunnii*; (iv) estudo da influência das concentrações e tipo de fonte de Fe nas respostas morfofisiológicas *in vitro* de gemas axilares de *E. dunnii*.

### 2.1.1 Hipóteses

- Os teores dos nutrientes minerais em brotações de cepas e folhas de *E. dunnii* apresentam diferenças em decorrência das suas características morfofisiológicas.
- O teor de nutrientes minerais determinado em amostras de brotações de cepas de *E. dunnii* pode ser empregado como base para definir os teores nutricionais do meio basal.
- A lavagem da espuma fenólica com água deionizada pode elevar o pH em níveis adequados para seu uso na cultura de tecidos.
- O tipo de meio suporte afeta a qualidade e quantidade das respostas morfofisiológicas *in vitro* das gemas axilares de *E. dunnii*.
- O emprego de diferentes fontes e concentrações de Fe provoca mudanças nas respostas morfofisiológicas de brotações de *E. dunnii*.

### 2.1.2 Objetivos

- Determinar se o tipo de amostra (amostragem de folhas padrão ou brotações de cepas) afeta aos teores de nutrientes minerais analisados em *E. dunnii*.
- Definir um novo meio basal com base nos níveis nutricionais de amostras vegetais de *E. dunnii* e na disponibilidade dos nutrientes minerais na solução.
- Determinar se a lavagem da espuma fenólica com água deionizada eleva o pH da mesma a níveis adequados para seu uso no cultivo *in vitro*.
- Determinar o meio suporte mais adequado para as distintas etapas da propagação *in vitro* de *E. dunnii*.
- Determinar o tipo de fonte e concentração adequada de Fe para a multiplicação *in vitro* de gemas axilares de *E. dunnii*.

## 2.2 Material e métodos

O estudo foi desenvolvido conjuntamente no Laboratório de Fisiologia das Árvores do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ, Universidade de São Paulo - USP e no “Laboratório de Micropropagación Forestal” da “Estación Experimental Agropecuaria Concordia” - EEA Concordia do “Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria” - INTA.

### 2.2.1 Análise química do material vegetal coletado no campo

A amostragem foi realizada em duas áreas, a primeira localizada na EEA Concordia, Estación Yuquerí, Entre Ríos, Argentina ( $31^{\circ}21'53''\text{S}$  -  $58^{\circ}6'14''\text{O}$ ), a segunda localizada na fazenda “La Calera”, em Ubajay, Entre Ríos, Argentina ( $31^{\circ}49'33''\text{S}$  -  $58^{\circ}13'44''\text{O}$ ). Em ambos os casos, as áreas amostradas consistiram em testes de progênies de 18 anos de idade, de composição genética similar ao pomar de sementes por mudas (PSM) doador das sementes utilizadas nos subsequentes experimentos. Foram coletadas seis amostras compostas para cada local sob dois tipos de amostragens: (i) brotações de cepas juvenis entre 3 - 8 cm de comprimento (Figura 2.1 A) aos 45 dias posteriores após o corte raso; (ii) folhas 3, 4 e 5, totalmente desenvolvidas a partir da gema apical das brotações dominantes, conforme Bellote e Silva (2000), aos 90 dias posteriores após o corte raso (Figura 2.1 B); totalizando 12 amostras. As mesmas foram enxaguadas três vezes com água destilada para retirar qualquer fonte de contaminação externa e posteriormente acondicionadas em sacolas plásticas e secas em estufa a  $65^{\circ}\text{C}$  até peso constante. As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Ecologia Aplicada (LEA) do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ, seguindo a metodologias propostas por Malavolta, Vitti e Oliveira (1989).

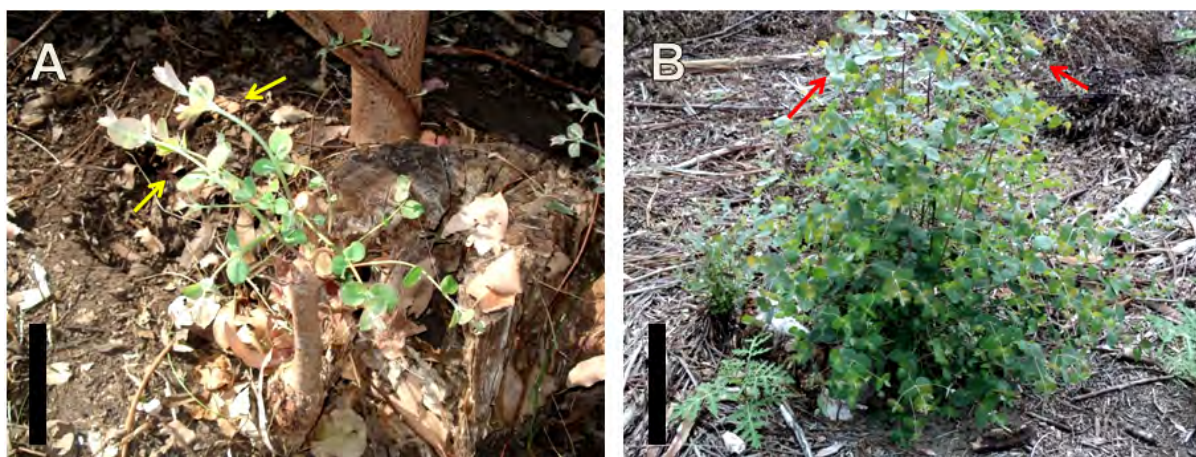


Figura 2.1 – Brotações de cepas de *E. dunnii* amostradas para análise química. A) Detalhe do tipo de rebrota na qual foi amostrada a brotação completa (barra = 5 cm) 45 dias após o corte; B) tipo de rebrota na qual foram coletadas folhas 90 dias após o corte (barra = 20 cm). Seta amarela = brotações amostradas; seta vermelha = folhas amostradas

As amostras do material *in vitro* foram coletadas para cada tratamento e enxaguadas três vezes com água destilada para retirar qualquer resíduo do meio de cultura. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em sacolas plásticas e secas em estufa a  $65^{\circ}\text{C}$  até peso constante, moídas com gral e pistilo (almofariz) de porcelana, peneiradas em malha de 20 *mesh* e armazenadas em tubos tipo eppendorf. As análises foram realizadas no Laboratório de

Tecidos Vegetais do Departamento de Ciência do Solo, ESALQ/USP, seguindo as metodologias propostas por Sarruge e Haag (1974).

### **2.2.2 Formulação do meio basal**

O desenvolvimento do meio basal específico para *E. dunnii* baseou-se na média de seis amostras de brotações, para os teores dos nutrientes minerais N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn obtidos nas análises químicas (Tabela 2.1). Estes valores foram empregados para o cálculo da concentração de referência de cada nutriente do meio basal considerando-se uma produção de 15 gramas de matéria seca por litro de meio de cultura, definidos como crescimento ótimo e máximo para brotações de *E. grandis* no meio de cultura JADS (CORREIA, 1993). Para os minerais não determinados nas análises, como o Co e Mo, e também para as vitaminas e aminoácidos, foram usadas as concentrações do meio basal JADS, já para Ni, baseou-se inicialmente no teor padrão para tecidos vegetais (MARSCHNER, 1995).

Em seguida, foram calculadas as quantidades dos sais minerais necessárias para prover os teores de nutrientes minerais de referência e carregadas no software GEOCHEM-EZ (SHAFF et al., 2010). Com ajuda do software, foi modelada a especiação iônica inicial da solução e as concentrações dos sais minerais foram ajustadas, com o objetivo de igualar as formas disponíveis dos nutrientes na solução com os teores de referência previamente determinados. Para a modelagem das soluções o pH foi fixado em 5,8.

### **2.2.3 Lavagem da espuma fenólica**

Discos de espuma fenólica de 5,5 cm de diâmetro e 1,5 cm de espessura foram obtidos de placas de espuma fenólica GREEN UP<sup>®</sup> de 19,5 x 27 x 3 cm. Os discos foram submersos em água deionizada em copos de Becker de 2000 ml (20 discos por copo) e esquentados em um forno micro-ondas até começar a ferver (~ 100°C). Posteriormente, deixou-se em repouso por três horas, passado esse tempo, a água foi extraída dos copos e o ciclo de lavagem foi repetido uma ou duas vezes. Finalmente, os discos foram secos em estufa a 65°C por 24 h. Discos não lavados, lavados uma e duas vezes, foram introduzidos em frascos de vidro de 250 ml com 30 ml de água deionizada, em seguida, foram submetidos ao processo padrão de esterilização para meio de cultura em autoclave, conforme item 2.2.5. Finalmente, o aferimento do pH e da condutividade elétrica (CE) foi realizado sobre o líquido retirado do frasco sem alterar a estrutura da espuma.



#### 2.2.4 Material vegetal fonte de explantes

Sementes de *E. dunnii* coletadas de um pomar de sementes por mudas (PSM) do INTA localizado em Del Valle, Buenos Aires, Argentina (35° 51'52''S; 60° 43'40''O), foram usadas para a obtenção dos explantes. Para desinfetar cada grama, sementes limpas foram submersas em 100 ml de álcool 70% por 30 segundos e posteriormente numa solução de 100 ml de hipoclorito de sódio comercial (2% de cloro ativo) e duas gotas de Tween 20, durante 30 minutos sob agitação intermitente, seguido de triplo enxágue com água deionizada em câmara de fluxo laminar.

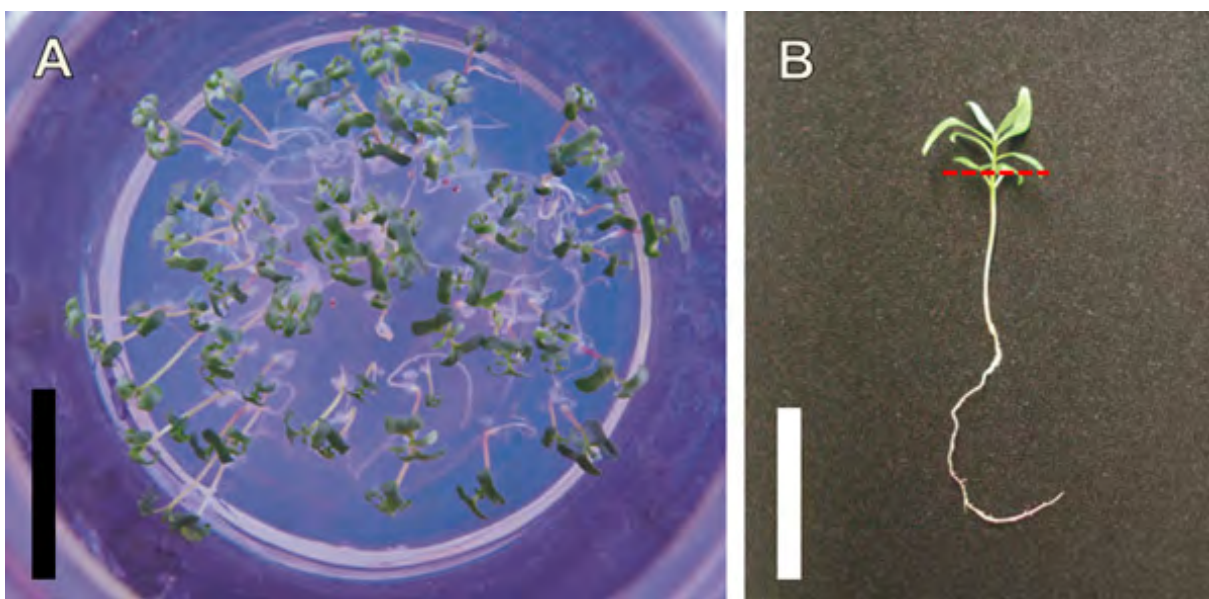


Figura 2.2 – A) Plântulas de *E. dunnii* de 14 dias de idade em meio de cultura EDM solidificado com ágar; B) Plântula padrão de 45 dias de idade, a linha vermelha pontilhada marca o ponto de corte para a obtenção do explante. Barras = 2 cm

As sementes foram inoculadas em frascos de vidro de 250 ml, contendo 25 ml de meio de cultura EDM (Tabela 2.4, p.48) gelificado com 5 g L<sup>-1</sup> de ágar SIGMA<sup>®</sup> A7921 e vedados com filme de PVC RESINITE<sup>®</sup> (Figura 2.2 A). Após 45 dias em sala de crescimento, as plântulas produzidas foram empregadas como fonte de explantes, usando a brotação completa desde o primeiro entrenó (Figura 2.2 B).

#### 2.2.5 Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados a partir de soluções estoque de sais minerais e vitaminas que compõem o meio basal EDM (Tabela 2.4, p.48) e água deionizada. Para os experimentos III e IV foram adicionados 0,1 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA) e sacarose 20 g L<sup>-1</sup>. O pH do meio foi ajustado para

5,8 utilizando KOH (1N) ou HCl (1N), antes da adição de 5 g L<sup>-1</sup> de ágar. Para minimizar os possíveis contaminantes do ágar, foi usado o ágar SIGMA<sup>®</sup> A7921, caracterizado pelo fabricante como ágar de alta pureza. No caso do meio líquido, foram usados discos de espuma fenólica de 5,5 cm de diâmetro e 1,5 cm de espessura como suporte. A esterilização se efetuou em autoclave à temperatura de 121°C sob pressão de 1 kg cm<sup>-2</sup>, durante 20 minutos. As fontes de ferro empregadas foram: Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O; Citrato/Fe, preparada a partir de ácido cítrico e Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O em proporção equimolar; EDTA/Fe, preparada a partir de Na<sub>2</sub>EDTA e Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O em proporção equimolar; o,o-EDDHA/Fe, proporcionada pelo o produto Basafer<sup>®</sup> Plus.

### 2.2.6 Condições de crescimento

Os cultivos foram mantidos na sala de crescimento sob condições de temperatura de 25°C ± 2°C, com fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de 23 μmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia. A transferência para meio de cultura novo foi realizada a cada 25 dias.

### 2.2.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os dados obtidos das análises químicas foram submetidos à análise de componentes principais (ACP) (JOLLIFFE, 2002) e representados em gráficos *biplot* (GABRIEL; ODOROFF, 1990). Os teores dos nutrientes minerais foram analisados como variáveis quantitativas e o tipo de amostra como variável categórica (B = brotação, F = folha), esta última foi utilizada para estimar as elipses de confiança dos agrupamentos.

O delineamento experimental utilizado para o experimento II (acondicionamento da espuma fenólica) foi o inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. Para o experimento III (meio de suporte), foi utilizado o mesmo delineamento com três repetições e três períodos de avaliação. Para o experimento IV (dosagens e fontes de Fe), foi utilizado também o DIC, com cinco repetições e sob arranjo fatorial 4 x 4 (fonte x dose de Fe). A unidade experimental foi um frasco de vidro de 250 ml contendo quatro brotações para o experimento III e cinco brotações no experimento IV, sendo cada um dos explantes a unidade observacional.

Para o experimento III, uma amostra de três frascos por tratamento foi aferida a cada 25 dias, nas quais foram determinadas as variáveis, enraizamento (ER), regeneração de calos (RC), número de brotações por explante (NB), número de raízes por explante (NR), comprimento de brotações (CB), comprimento de raízes (CR), massa seca total (MST), seca

dos calos (MSC) e clorose das folhas (CL). Os escores para CL foram: 1 = folhas verdes; 2 = folhas com clorose incipiente; 3 = folhas com clorose internerval marcada e 4 = folhas com clorose total. Além disso, foi calculada a proporção da massa seca total atribuída aos calos (PCAL) de acordo com a eq. (1) e a taxa de crescimento relativo (TCR) (HUNT, 1982) de acordo com a eq. (2) para cada observação.

$$\text{PCAL (\%)} = (\text{MSC}/\text{MST}) * 100 \quad (1)$$

$$\text{TCR} = [(\log_e W_2 - \log_e W_1) / (t_2 - t_1)] * 100 \quad (2)$$

$W_1$  = massa seca inicial (média de 10 explantes) (mg);

$W_2$  = massa seca final (da avaliação aos 25, 45 ou 75 dias) (mg);

$t_1$  = zero;

$t_2$  = 25, 45 ou 75 dias.

Para o experimento IV foram aferidas as variáveis RC, NB, MST, PCAL e escores visuais para clorose (CL), avermelhamento (AV) e oxidação (OX). Para avermelhamento, os escores foram: 1 = folhas verdes; 2 = folhas com avermelhamento incipiente; 3 = folhas com avermelhamento parcial e 4 = folhas com avermelhamento total. Os escores para oxidação foram: 1 = brotação normal; 2 = brotação com oxidação incipiente; 3 = brotações com oxidação abundante e 4 = brotações com oxidação total.

Prévio a análise foi realizada uma análise exploratória dos dados e verificou-se a normalidade e homogeneidade da variância. As variáveis que não cumpriam essas hipóteses foram sujeitas a transformações usando o procedimento de BOX-COX de potência ótima (BOX; COX, 1964). Os efeitos e interações foram analisados empregando a análise da variância e as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey HSD. Nos casos em que as variáveis continuaram infringindo as condições para o ANOVA, foram submetidas a análise não paramétrica, teste de Wilcoxon, de Kruskal-Wallis e de regressão logística para dados de resposta binária (ER, RC).

Estas análises foram realizadas no programa R, versão 3.0.2 (R CORE TEAM, 2013), com os pacotes 'FactoMineR', 'MASS', 'pgirmess' e 'laercio'. A escolha do melhor modelo foi baseada no critério da informação bayesiano de Schwarz - BIC - (SCHWARZ, 1978), selecionando os modelos mais simples e, por sua vez, com maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

## 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 Experimento I - Desenvolvimento de um meio basal específico para *E. dunnii* baseado nos teores nutricionais de brotações de cepas

#### 2.3.1.1 Teores de nutrientes minerais e tipo de amostra

Os resultados das análises químicas em brotações e folhas de *E. dunnii* (Tabela 2.1) foram analisados pela ACP. As amostras foram agrupadas em quadrantes distintos do biplot, tanto para tipo de amostragem como para o local amostrado, em função dos dois primeiros componentes principais, representando 83% da variância acumulada (Figura 2.3). O primeiro componente principal (CP1), que representa 51,9% da variância, separou de forma evidente os tipos de amostras. Os nutrientes que correlacionaram em forma positiva e significativamente com o CP1 foram o P, K, Cu e Zn, devido a suas maiores concentrações nas brotações. Ao contrário, o Ca, Mg e Mn apresentaram correlações significativas negativas, por suas maiores concentrações nas folhas (Tabela 2.2).

Tabela 2.1 - Médias e desvios padrão das concentrações de nutrientes minerais em amostras de folhas e brotações completas de *E. dunnii* nos dois locais e médias e desvios padrão por tipo de amostra

Nutrientes Minerais	Local 1		Local 2		Média geral	
	Folhas	Brotações	Folhas	Brotações	Folhas	Brotações
	g kg <sup>-1</sup>		g kg <sup>-1</sup>		g kg <sup>-1</sup>	
N	24,30±0,2	27,77±0,6	28,03±1,1	22,57±1,3	26,17±2,16	25,17±2,99
P	1,73±0,2	3,80±0,2	1,20±0,0	2,67±0,3	1,47±0,31	3,23±0,65
K	11,33±0,4	18,60±0,2	8,97±0,5	18,60±0,5	10,15±1,35	18,60±0,36
Ca	7,17±0,3	2,07±0,2	7,13±0,4	3,47±0,5	7,15±0,31	2,77±0,83
Mg	2,40±0,3	2,20±0,0	2,30±0,3	1,50±0,1	2,35±0,24	1,85±0,39
S	1,07±0,2	1,37±0,2	1,87±0,1	1,63±0,2	1,47±0,45	1,50±0,23
	mg kg <sup>-1</sup>		mg kg <sup>-1</sup>		mg kg <sup>-1</sup>	
B	43,67±4,2	38,67±5,5	38,33±1,2	26,00±1,0	41,00±4,00	32,33±7,79
Cu	12,57±1,5	22,07±0,2	13,60±1,0	19,87±1,3	13,08±1,29	20,97±1,44
Fe	62,35±4,7	60,53±2,9	73,33±1,9	87,60±2,7	67,84±6,82	74,07±15,04
Mn	480,7±58	277,0±26	899,3±50	582,3±20	690,0±23,4	429,6±16,85
Zn	33,00±1,0	56,33±0,6	17,00±1,0	39,67±5,1	25,00±8,81	48,00±9,70

As maiores concentrações de P nas brotações podem ser atribuídas à elevada demanda energética dos meristemas, e também por formar parte dos ácidos nucleicos e fosfolípidios (MARSCHNER, 1995; RAMAGE; WILLIAMS, 2002). O K, cátion de grande mobilidade e o mais abundante no citoplasma das células das plantas, apresenta grande importância no alongamento das células e na síntese de proteínas, fatos que provavelmente determinaram as maiores concentrações encontradas (MARSCHNER, 1995; GEORGE; DE KLERK, 2008).

No caso do Cu, o maior conteúdo pode ser atribuído aos processos de lignificação, nos quais o cobre é parte fundamental (MARSCHNER, 1995), já no caso do Zn, isto poderia ser explicado pelo seu papel na síntese de AIA e na replicação do ADN (DELL et al., 2001; MARSCHNER, 1995), processos presentes nas brotações como produto da elevada atividade meristemática.

Tabela 2.2 – Componentes principais (CP), variância proporcional acumulada (VAC) e correlações dos teores dos nutrientes minerais analisados com cada componente

CP	VAC (%)	Variáveis										
		N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
CP1	51,9	-0,23	0,94**	0,98**	-0,97**	-0,57*	-0,15	-0,50	0,94**	0,14	-0,75**	0,90**
CP2	83,0	0,43	0,29	-0,07	-0,02	0,76**	-0,67*	0,82**	-0,06	-0,97**	-0,58*	0,40

\* =  $P \leq 0,05$  e \*\* =  $P \leq 0,01$

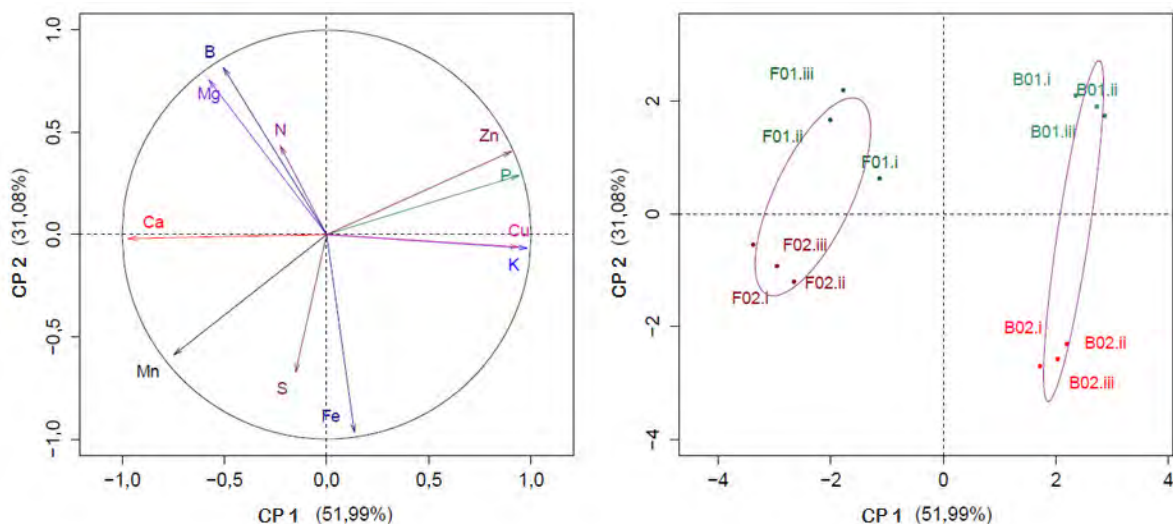


Figura 2.3 – Gráficos *biplot* da ACP para os teores de macro e micronutrientes de amostras de *E. dunnii* em função dos dois primeiros componentes principais. À direita, *biplot* dos vetores das variáveis originais, à esquerda, agrupamento das observações para tipo de amostra, folhas (F) e brotações (B), em dois locais (01 e 02) e elipses de confiança ( $P = 0,01$ )

As folhas apresentaram maior conteúdo de cálcio e, provavelmente tanto o seu papel de componente da parede celular, como a sua mobilidade restrita, sejam as causas do maior acúmulo por parte dos tecidos desenvolvidos e de maior idade (MARSCHNER, 1995). De forma similar, o maior conteúdo de Mg nas folhas desenvolvidas e em fotossíntese ativa é decorrente das suas funções na molécula de clorofila e nas pectinas da parede celular, representando 6-25% e 5-10 % do total do Mg, respectivamente (HAWKERFORD et al., 2012). Para o Mn, entretanto, a sua importância na evolução do oxigênio no processo da fotossíntese (MARSCHNER, 1995; TAIZ; ZEIGER 2006) poderia explicar as maiores concentrações deste nutriente nas folhas.

Para o CP2, que responde por 31,1% da variação, contribuições significativas foram determinadas para o Mg, S, B, Fe e Mn (Tabela 2.2 e Figura 2.3). Este componente representa a diferença entre os sítios de amostragem, uma vez que estas diferenças somente poderiam ser atribuídas ao efeito do solo, desde que as condições climáticas, de manejo e o material genético foram similares. Porém, os teores de macro e micronutrientes das folhas amostradas em ambos os locais se encontram dentro da faixa de valores nutricionais adequados para *E. globulus* e *E. grandis* (DELL et al., 2001), indicando que estas diferenças não implicam estados nutricionais muito diferentes.

No conjunto, o CP1 e CP2 representam 83% da variância acumulada entre as observações (Tabela 2.2), dado que, neste caso, CP3 adicionaria apenas 13,4% à mesma, não foi considerado no *biplot*. A interpretação do *biplot* indica que a maior parte das diferenças nos teores nutricionais entre as amostras pode ser atribuída as diferenças morfofisiológicas do material vegetal do que as diferenças entre os locais amostrados. Além disso as elipses baseadas no tipo de amostra ( $P = 0,01$ ) apoiam esta hipótese (Figura 2.3), separando claramente os grupos de observações.

Segundo Römheld (2012), após a disponibilidade de nutrientes, a idade fisiológica da planta ou da parte amostrada da planta é o fator mais importante que afeta a avaliação do estado nutricional. Para eucalipto, a determinação do estado nutricional de povoamentos e mudas baseia-se em análises químicas de folhas totalmente desenvolvidas (BELLOTE; SILVA, 2000), que considerando estes resultados em *E. dunnii*, não condizem com o estado nutricional das brotações coletadas das cepas.

As brotações de cepas apresentam maior juvenilidade dentre as possíveis fontes de material vegetal no resgate de árvores adultas (ALFENAS et al., 2004; ASSIS; MAFIA, 2007; BONGA, 1982; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000). Portanto, seus requerimentos nutricionais provavelmente sejam mais próximos a brotações em condições de crescimento *in vitro* do que aqueles indicados pela análise foliar. Além disso, esta questão impediria o uso de valores de referência de *E. dunnii* já publicados para o desenvolvimento do meio basal, tornando-se imprescindível a amostragem de material juvenil.

### **2.3.1.2 Desenvolvimento do meio basal**

Com base na discussão do item anterior, foi calculada a necessidade de nutrientes minerais para uma produção de 15 gramas de massa seca por litro de meio basal, tomando como referência os teores médios de cada nutriente mineral, obtidos através da análise química das amostras de brotações de cepas de *E. dunnii*. Em seguida, os valores foram

transformados a  $\text{mmol L}^{-1}$  para possibilitar a equivalência com os dados do GEOCHEM-EZ e utilizá-los como referência no ajuste do equilíbrio iônico do meio basal. Os dados da tabela 2.3 indicam as concentrações dos nutrientes minerais de referência e as concentrações para a solução inicial e a final, na forma total e disponível, obtidos no software GEOCHEM-EZ.

A solução inicial está baseada exclusivamente nos teores de referência, a solução final (meio basal EDM) foi ajustada a partir da primeira com base na especiação iônica da solução, dando prioridade às formas disponíveis dos nutrientes.

Tabela 2.3 – Concentrações de referência, totais e disponíveis dos nutrientes minerais ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) na solução inicial e na solução final ajustada por disponibilidade no GEOCHEM-EZ

Metais/ Ligantes	Referência ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	INICIAL		FINAL (EDM)	
		Total ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Disponível ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Total ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Disponível ( $\text{mmol L}^{-1}$ )
N	26,90	26,96	26,96	26,90	26,90
$\text{NO}_3^-$	-	20,97	20,97	20,72	20,72
$\text{NH}_3$	-	5,993	5,993 <sup>a</sup>	6,185	6,185 <sup>a</sup>
$\text{PO}_4^{3-}$	1,57	1,57	1,414 <sup>b</sup>	1,84	1,65 <sup>b</sup>
$\text{K}^+$	7,14	7,14	7,123	7,18	7,16
* $\text{Ca}^{2+}$	1,04	4,12	3,885	4,11	3,82
$\text{Mg}^{2+}$	1,14	1,14	1,09	1,21	1,15
$\text{SO}_4^{2-}$	0,71	0,71	0,55	0,93	0,72
$\text{B(OH)}_4^{2-}$	0,045	0,045	0,045 <sup>c</sup>	0,048	0,048 <sup>c</sup>
$\text{Cu}^{2+}$	0,005	0,005	$21 \times 10^{-6}$	0,040	0,004
$\text{Fe}^{2+}$	0,020	0,020	0,013	0,032	0,020
$\text{Mn}^{2+}$	0,117	0,117	0,110	0,121	0,117
$\text{Zn}^{2+}$	0,011	0,011	$8,6 \times 10^{-4}$	0,014	0,011
$\text{Na}^+$	0,250	0,231	0,231	0,272	0,271
$\text{Co}^{2+}$	0,001	0,001	$7,9 \times 10^{-8}$	0,0013	0,0011
$\text{Cl}^-$	0,200	0,192	0,192	0,208	0,208
$\text{MoO}_4^{2-}$	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006	0,0006
$\text{Ni}^{2+}$	0,000026	0,000026	$2,8 \times 10^{-8}$	0,0001	0,000023
$\text{EDTA}_4^-$	0,020	0,01991	-	0,03251	-

\*A concentração de cálcio foi maior nas soluções do que nos valores de referência como consequência do efeito do íon acompanhante do  $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ , sal mineral fornecedor de  $\text{NO}_3^-$ . a =  $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ ; b =  $\text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{HPO}_4^{2-}$ ; c =  $\text{B(OH)}_4^- + \text{B(OH)}_3$

Segundo a modelagem das soluções efetuada no GEOCHEM-EZ, na solução inicial foram complexados com EDTA o Cu, Zn, Co e Ni em níveis superiores a 90%. Além disso, o Fe complexou com o  $\text{PO}_4^{3-}$  (30,4% do total Fe e 0,4% do total do  $\text{PO}_4^{3-}$ ), sobrando apenas 4,5% com EDTA e 62,5% na forma livre. Ao mesmo tempo, alguns macronutrientes como Ca, Mg e S, também foram complexados, limitando suas especiações na forma livre, porém, em menor grau (Anexo A).

Os micronutrientes são absorvidos preferencialmente na forma iônica, tanto por fluxo de massa como por difusão, sendo este último o processo predominante no caso dos micronutrientes metálicos (Fe, Zn, Mn, Cu e Ni) (OLIVEIRA, 2010; WENZEL et al., 2011). De acordo com Marschner (1995), a taxa de absorção dos quelatos orgânicos de micronutrientes é menor do que a dos cátions livres e diminui com o aumento do tamanho do ligante, em decorrência do tamanho dos poros das membranas celulares.

O EDTA apresenta grande afinidade com os metais, principalmente com Cu e Zn, formando complexos altamente estáveis, mesmo assim, passíveis de serem absorvidos. O complexo metal-quelato é absorvido via apoplasto, evitando a banda de Caspary por interrupções nas ramificações e pontas jovens das raízes, para atingir o xilema (NOWAK; SCHWYZER; SCHULIN, 2008). Porém, existe controvérsia em relação à proporção desses complexos que pode ser metabolizada, por exemplo, o complexo EDTA/Zn<sup>2+</sup> é muito empregado para induzir deficiências de Zn em plantas (DEGRYSE; SMOLDERS; PARKER, 2006; SCHAIDER et al., 2006), evidenciando que mesmo sendo absorvido, ele não se encontra disponível. Do mesmo modo, para as algas e bactérias, foi demonstrado que os complexos EDTA/metal não atravessam as biomembranas (MA et al., 2003; ZHANG et al., 2007). Nas plantas, entretanto, este comportamento é dependente, em grande parte, da espécie (CHEN; LI; SHEN, 2004), e da capacidade da planta para quebrar estes complexos através de enzimas específicas (ROBINSON et al., 1999; DE LA GUARDIA; ALCÁNTARA, 2002; WU et al., 2005).

Diante disso, neste estudo considerou-se como não disponíveis os micronutrientes Cu, Mn, Zn, Co e Ni complexados com EDTA na solução modelada no GEOCHEM-EZ. Na solução final ajustada (EDM) foram priorizadas as formas iônicas livres para estes nutrientes, igualando-as com os níveis de referência.

Além das formas livres calculadas pelo GEOCHEM-EZ, alguns nutrientes podem ser assimilados pelas plantas sob outras formas. Estes foram adicionados com base nas informações da especiação iônica (Anexos A e B) e considerados como disponíveis, sendo:

- A amônia (NH<sub>3</sub>), que na forma livre em solução somente foi encontrada em mínimas concentrações (0,003 mmol L<sup>-1</sup>), sendo predominante na forma de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), uma vez que as duas são consideradas fontes disponíveis (MARSCHNER, 1995).
- Para P, o íon PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> aparece em ínfimas quantidades na forma livre, principalmente por estar combinado com H<sup>+</sup> (~ 90%) formando os íons H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> e HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, formas disponíveis para a absorção e assimilação pelas plantas (MARSCHNER, 1995, SCHACHTMAN; RAID; AYLING, 1998).



- Tanto na solução inicial, como na ajustada, a forma iônica livre  $B(OH)_4^-$  se encontra numa concentração muito baixa ( $0,00002 \text{ mmol L}^{-1}$ ), sendo predominante como  $B(OH)_3$ . Uma vez que ambas as formas são absorvíveis pelas plantas (HU; BROWN, 1997; MARSCHNER, 1995), as duas foram consideradas como disponíveis.

Tabela 2.4 – Concentrações dos sais minerais, vitaminas e aminoácidos do meio basal EDM

Sais minerais	PM	$\text{mmol L}^{-1}$	$\text{mg L}^{-1}$
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	80,05	4,75	380
$\text{KNO}_3$	101,10	5,34	540
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136,09	1,84	250
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236,15	4,11	970
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	256,41	1,21	310
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	132,14	0,72	95
$\text{NaCl}$	58,44	0,21	12
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	372,24	0,032	12,1
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278,02	0,032	9
$\text{H}_3\text{BO}_3$	61,83	0,05	3
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	223,06	0,12	20,45
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287,56	0,014	4
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241,98	0,0006	0,15
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249,69	0,04	10
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	237,95	0,0013	0,3
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	237,69	0,0001	0,025
Componentes orgânicos*	PM	$\mu\text{mol L}^{-1}$	$\text{mg L}^{-1}$
Pirodoxina	205,64	2,43	0,5
Ácido nicotínico	123,11	4,0	0,5
Tiamina	337,27	14,8	5,0
Mioinositol	180,16	555,0	100,0
L-Arginina	174,21	40,2	7,0
L-Glutamina	146,15	992,3	145,0
L-Cisteína	121,15	20,6	2,5
Pantotenato de cálcio	219,24	5	1,1

\* De acordo com Correia et al. (1995)

As vitaminas são compostos orgânicos que podem beneficiar o desenvolvimento e sobrevivência de cultivos de células e/ou tecidos (THORPE et al., 2008). Os aminoácidos, por sua vez, são fonte de N reduzido que pode ser rapidamente absorvido pelos tecidos vegetais (GEORGE; DE KLERK, 2008). Contudo, a presença destes compostos no meio basal nem sempre é necessária e vai depender das condições de cultivo e da espécie a propagar. Devido à falta de informações para *E. dunnii* neste aspecto, e considerando que o meio basal JADS foi

utilizado com sucesso na micropropagação de *E. globulus* (MURILO, 2009), *E. grandis* (CORREIA, 2006) e *E. grandis* x *E. urophylla* (CORREIA et al., 1995), as concentrações das vitaminas e aminoácidos deste meio foram incorporadas ao meio basal EDM, uma vez ajustado através do GEOCHEM-EZ.

Tanto o Na como o Cl não foram inicialmente considerados no ajuste da formulação do meio basal, porém, em decorrência da baixa concentração do Na<sub>2</sub>EDTA e do não uso de cloretos como fonte de macronutrientes, o Na e o Cl se encontravam em baixas concentrações (0,066 e 0,002 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente). Tanto o Na como o Cl estão envolvidos no controle estomático (CHEN et al., 2010; KRONZUCKER et al., 2013), além disso, o Cl participa na fotossíntese e no controle osmótico (MARSCHNER, 1995). Em experimentos com soluções nutritivas em tomate, Broyer et al. (1954) definiram valores superiores a 7 µM por grama de massa seca (0,1 mmol L<sup>-1</sup> para 15 g de massa seca) para evitar sintomas de deficiência, obtendo respostas de crescimento com até 0,35 mmol L<sup>-1</sup> de Cl na solução. Por outro lado, o Na em concentrações de 0,1 a 10 mmol L<sup>-1</sup> parece promover o incremento da biomassa em várias espécies glicófitas (SUBBARAO et al., 2003; KRONZUCKER et al., 2013). Em razão do exposto, foi adicionado NaCl na formulação do meio basal (Tabela 2.4), até atingir níveis de Cl e Na dentro dos limites mencionados e, ao mesmo tempo, dentro dos valores encontrados nos meios basais MS, WPM e JADS para estes nutrientes.

O teor final de Ni, micronutriente que na maioria dos meios basais não é especificamente adicionado por ser considerado um contaminante do ágar (GEORGE; DE KLERK, 2008), resulta coincidente aos níveis recomendados por Witte et al. (2002) para a cultura de tecidos.

Os dados de especiação iônica das soluções, fornecidas pelo GEOCHEM-EZ, permitiram o ajuste das concentrações dos sais minerais que compõem o meio basal EDM, visando equiparar os teores dos nutrientes determinados nas brotações juvenis de *E. dunnii* com os teores na forma absorvível e metabolizável (disponível) dos mesmos na solução, de acordo com o estabelecido por Spaargaren (1996).

## **2.3.2 Otimização das condições de crescimento para a propagação *in vitro* de *E. dunnii***

### **2.3.2.1 Experimento II - Acondicionamento da espuma fenólica**

O resultado das lavagens consecutivas da espuma fenólica com água deionizada a 100°C sugere que duas lavagens consecutivas são suficientes para elevar o pH aos valores adequados para a cultura de tecidos mencionados por Bhojwani e Razdan (1996) e George e De Klerk (2008) (Figura 2.5).

Com base nos valores de CE, pode-se inferir que com duas lavagens ainda permanecem resíduos na espuma, porém, uma quantidade maior de lavagens não teria um efeito significativo nos parâmetros avaliados, como evidenciado pelas linhas da regressão (Figura 2.5). Portanto, foram usadas duas lavagens consecutivas com água deionizada a 100°C como padrão para os subsequentes experimentos que empregaram a espuma fenólica como suporte.

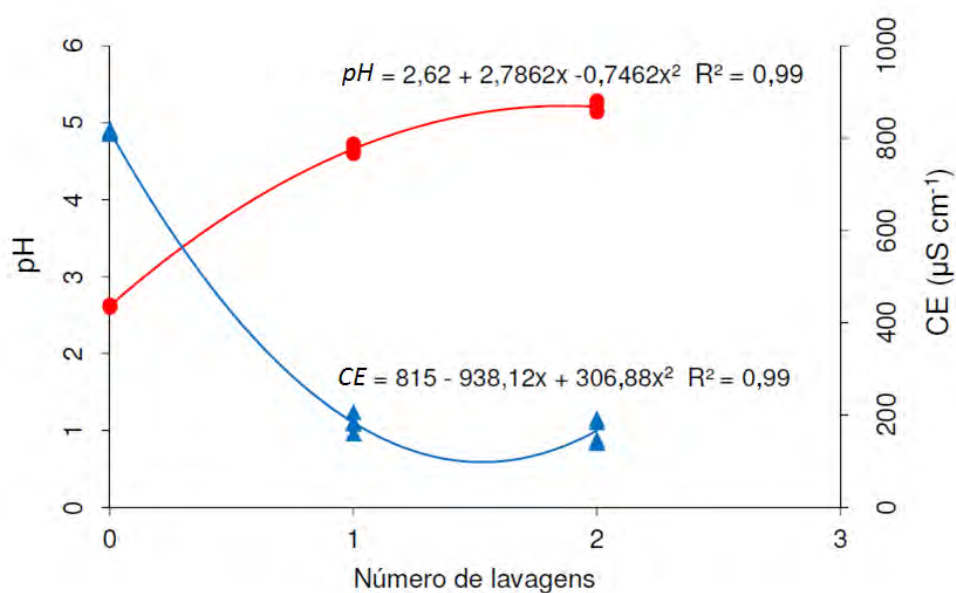


Figura 2.5 – Valores observados e funções ajustadas para condutividade elétrica (CE) em  $\mu\text{S cm}^{-1}$  e potencial hidrogênio (pH) no lixiviado da espuma fenólica em função do número de lavagens com água deionizada a 100°C

### 2.3.2.2 Experimento III - Estado físico do meio de cultura

A interação entre os períodos avaliados (25, 50 e 75 dias) e os tratamentos não foi significativa na análise da variância.

Tanto a taxa de crescimento relativo (TCR) quanto o massa seca total (MST) foram significativamente maiores ( $P < 0,001$ ) no meio solidificado com ágar (Figuras 2.6 e 2.7, respectivamente). As TCR apresentaram tendências similares tanto no meio de cultura sólido como no meio de cultura líquido, sendo elevadas no início da experiência e estabilizando-se entre 2,5 a 3,5% aos 75 dias de cultivo (Figura 2.6). Correia et al. (1995), avaliando a TCR de brotações de *E. grandis* x *E. urophylla* em meio basal JADS sólido e líquido durante 42 dias, determinaram valores inferiores aos encontrados neste estudo, provavelmente decorrentes do esgotamento de nutrientes essenciais no meio de cultura.

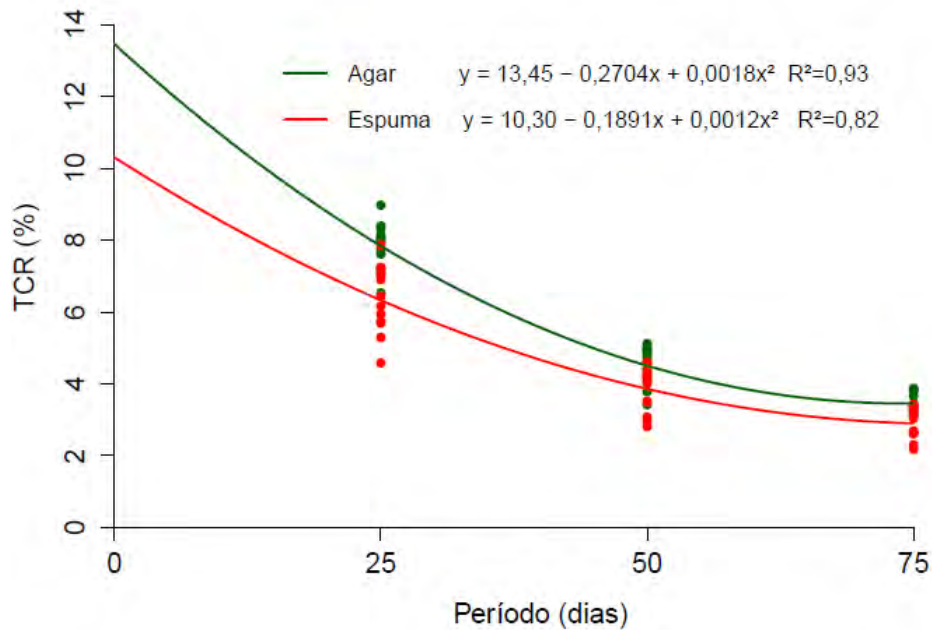


Figura 2.6 – Dados observados e funções ajustadas para taxa de crescimento relativo (%) para brotações de *E. dunnii* cultivados em meio basal EDM adicionado com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP,  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e sacarose  $20 \text{ g L}^{-1}$ ; solidificado com  $5 \text{ g L}^{-1}$  de ágar, ou líquido com espuma fenólica como suporte

Houve regeneração de calos (RC) na base de todos os explantes no meio com ágar ( $P < 0,001$ ) em relação ao meio de cultura líquido, onde somente 5,5% dos explantes apresentaram calos (Figura 2.8 C e D). Além disso, tanto a massa seca dos calos (MSC) como a proporção da massa seca total produzida pelos calos (PCAL) foram maiores no meio de cultura sólido ( $P < 0,001$ ). Entretanto, foi observado um maior número de brotações (NB) e com maior comprimento (CB) no meio solidificado com ágar ( $12,3 \text{ brotações explante}^{-1}$  e  $85,3 \text{ mm gema}^{-1}$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 2.7). Ressalta-se que os calos presentes na base dos explantes foram, em sua maioria, organogênicos (Figura 2.8 C), indicando o potencial do meio basal e do explante para obter este tipo de respostas.

Um dos resultados mais relevantes, considerando que o meio de cultura contém BAP, citocinina que atua como inibidor da rizogênese nas concentrações utilizadas (GABA, 2005; GEISS et al., 2010; SRIVASTAVA, 2002), consiste no enraizamento adventício em 60% dos explantes no meio líquido com espuma fenólica como suporte, valor significativamente superior a 13,3% observado no meio com ágar ( $P < 0,01$ ). Além disso, tanto o NR ( $P < 0,001$ ) como o CR ( $P < 0,001$ ) foram significativamente maiores no meio líquido em relação ao sólido (Figura 2.7).

Resultados similares para a rizogênese *in vitro* foram encontrados para outras espécies usando espuma fenólica (GEBHARDT, 1985) e outros meios de suporte porosos para meios

líquidos (AFREEN-ZOBAYED et al., 1999; GANGOPADHYAY et al., 2002; NEWELL; GROWNS; MCCOMB, 2003). Estas respostas estão relacionadas às baixas concentrações de oxigênio no ágar, e explicam porquê algumas espécies enraízam melhor *ex vitro* do que *in vitro* (PIERIK, 1983 apud NEWELL; GROWNS; MCCOMB, 2003).

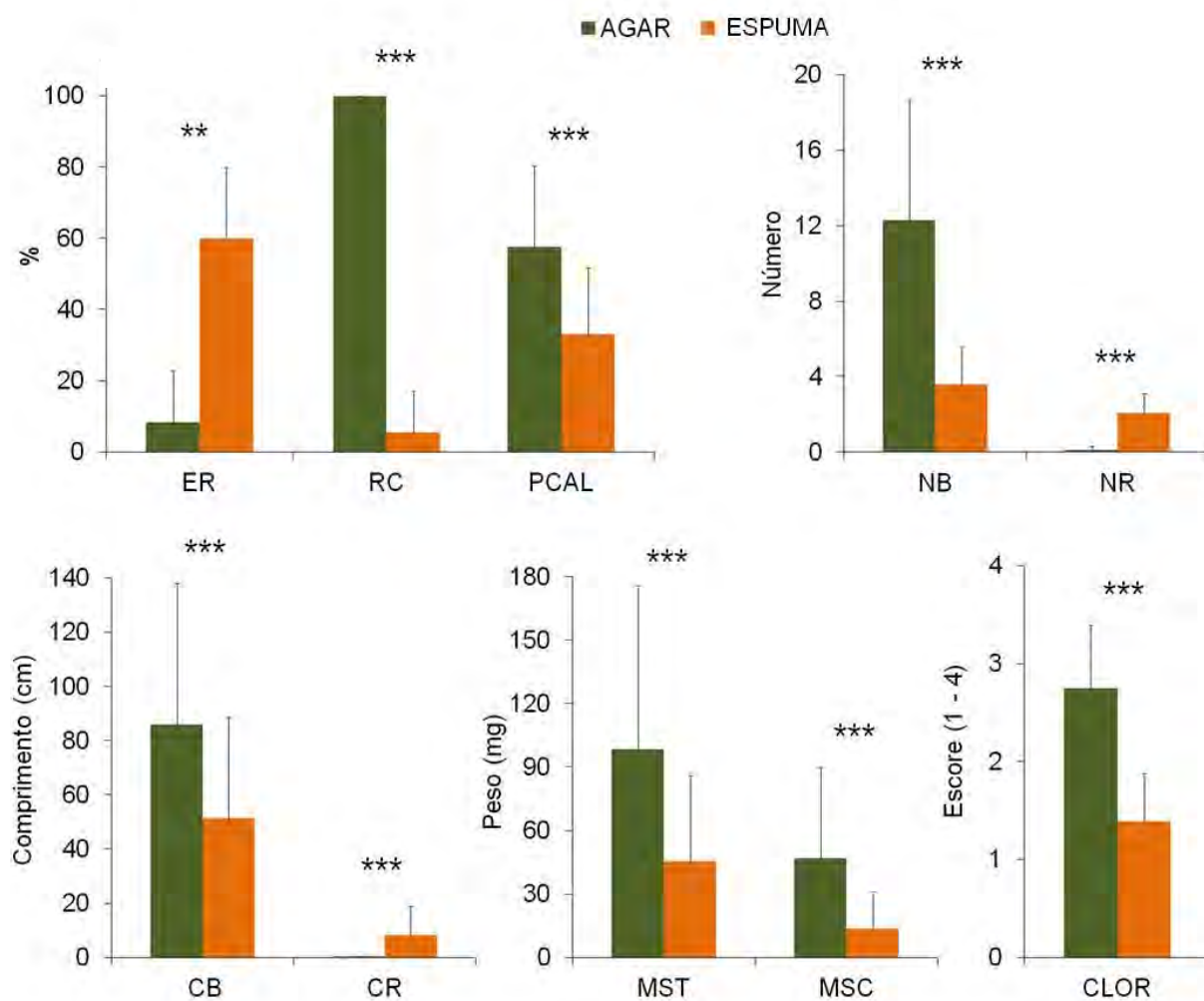


Figura 2.7 – Médias e desvios padrão de enraizamento (ER), regeneração de calo (RC), proporção do peso dos calos na massa seca total (PCAL), número de brotações (NB), número de raízes (NR), comprimento de brotações (CB), comprimento de raízes (CR), massa seca total (MST), massa seca dos calos (MSC) e escores para clorose (CLOR) em brotações de *E. dunnii* cultivados após 75 dias de cultivo em meio basal EDM adicionado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA e sacarose 20 g L<sup>-1</sup>, líquido com suporte de espuma fenólica ou solidificado com ágar 5 g L<sup>-1</sup>. Níveis de significância para diferenças entre tratamentos por cima das barras: \*\* =  $P \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $P \leq 0,001$  para: teste de F da anova (PCAL, MST, MSC, NB, CB e CLOR); teste de regressão logística (ER, RC) e teste de Wilcoxon para duas amostras (CR, NR)

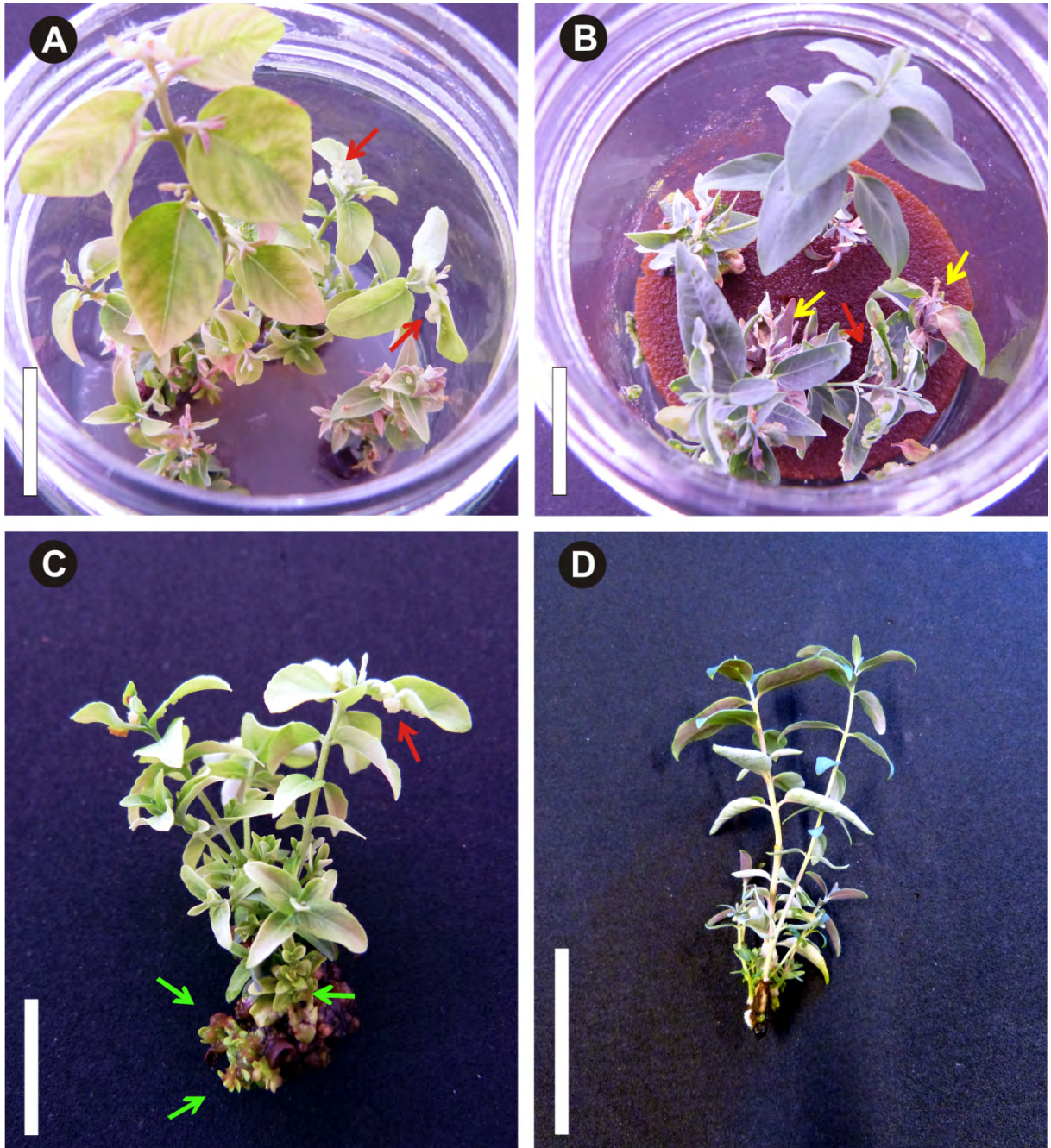


Figura 2.8 – Vistas das brotações após 75 dias de crescimento em meio basal EDM adicionado com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP,  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e sacarose  $20 \text{ g L}^{-1}$ , gelificado com ágar (A) e com suporte de espuma fenólica (B). Detalhe das brotações após 75 dias de crescimento em meio gelificado com ágar (C) e meio líquido com suporte de espuma fenólica (D). Setas vermelhas = calos; setas verdes = calos organogênicos; setas amarelas = sintomas de oxidação. Barras = 2 cm

A clorose (CL) nas folhas foi maior no meio sólido ( $P < 0,001$ ), os explantes na espuma fenólica se apresentaram verdes, porém, com sintomas de oxidação, os quais começaram a ser observados em estágios finais do experimento (Figura 2.8 A e B). Avaliações do pH do meio líquido residual após as transferências revelaram que este se mantém muito ácido, em torno de pH 4, fato que deveria favorecer, principalmente, a

disponibilidade de Fe e Mn (GEORGE; DE KLERK, 2008), como observado nas análises químicas das brotações (Tabela 2.5).

Por outro lado, a análise química das brotações obtidas no meio sólido sugere que os únicos nutrientes que se encontraram próximos as concentrações definidas como baixas a deficientes para minijardim clonal de *Eucalyptus sp.* e para plantações jovens de *E. globulus*, *E. grandis*, *E. urophylla* e *E. grandis* x *E. urophylla* (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000; DELL et al., 2001) são o Mg, o Fe e o Mn (Tabela 2.5). Contudo, o sintoma de clorose observado coincide somente com os previamente citados para a deficiência de Fe na cultura de tecidos de eucaliptos (HIGASHI, 1996; HIGASHI; GONÇALVES, 2006), *Corylus avellana* (AL KAI; SALESSES; MOURAS, 1984; NAS; READ, 2004) e *Rosa hibrida* L. ‘Moneyway’ (VAN DER SALM et al., 1994).

Tabela 2.5 – Concentrações médias de nutrientes minerais em brotações de cepas e em material vegetal *in vitro* de *E. dunnii* após 75 dias de cultura *in vitro* em meio basal EDM adicionado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA e sacarose 20 g L<sup>-1</sup> com ágar ou espuma fenólica como meio de suporte

Amostra	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	g kg <sup>-1</sup>						mg kg <sup>-1</sup>				
Brotações	25,17	3,23	18,60	2,77	1,85	1,50	32,33	20,97	74,07	429,6	48,00
Ágar	43,70	5,80	18,60	11,00	1,60	1,80	34,00	176,10	55,30	200,00	114,00
Espuma	40,33	6,00	22,95	6,58	1,40	3,94	96,25	31,50	188,00	1664,50	82,50

Não foram observados sintomas de hiperhidricidade, porém, alguns explantes em ambos os tratamentos apresentaram calos nas folhas (Figuras 2.8 A, B e C), problema já mencionado na propagação *in vitro* de *E. dunnii* (NAVROSKI, 2011; NAVROSKI et al., 2013).

Estes resultados evidenciam a grande importância que exerce o estado físico do meio de cultura na qualidade das respostas morfogênicas, assim como as possibilidades de uso para cada tipo de meio de suporte nas diferentes etapas da propagação *in vitro* de *E. dunnii*.

### 2.3.3 Experimento IV - Efeito de distintas fontes e quelatos de ferro na multiplicação *in vitro* de gemas axilares de *E. dunnii*

A interação entre as dosagens e os tipos de fonte de Fe foi significativa, indicando a necessidade de desdobrar a análise estatística e analisar separadamente os efeitos simples das doses e das fontes. Em consequência, o teste de Tukey foi conduzido para cada fonte e para cada concentração entre as fontes, separadamente (Tabela 2.6). Isto foi provocado,

principalmente, pela grande variação nas respostas das mesmas dosagens dos quelatos com EDTA e EDDHA em relação ao citrato e o  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

Os sintomas atribuídos à deficiência de Fe (CL) foram minimizados com dosagens iguais ou maiores a  $0,064 \text{ mmol L}^{-1}$  para EDDHA/Fe e iguais ou maiores a  $0,128 \text{ mmol L}^{-1}$  para EDTA/Fe (Tabela 2.6; Figura 2.9). Resultados similares foram obtidos em maracujazeiro por Monteiro et al. (2000) quando a dosagem padrão do MS foi incrementada de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  de EDTA/Fe para  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ . Por outro lado, no mesmo meio basal, dosagens de  $0,1$  e  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de EDDHA/Fe incrementaram quase duas vezes o conteúdo de clorofila nas folhas de *Carlina onopordifolia* em relação a  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  de EDTA/Fe (TREJGELL; LIBRONT; TRETYN, 2012).

O avermelhamento das folhas (AV) é um sintoma geralmente associado a situações de estresse, como as ocasionadas por deficiências de N, S e Zn (HIGASHI, 1996; HIGASHI; GONÇALVES, 2006). Dois pigmentos podem ser considerados como responsáveis pelo AV: os carotenos, que não sendo afetados pela deficiência de Fe ficaram visíveis após a redução da clorofila (BROADLEY et al., 2012); ou as antocianinas, sintetizadas e acumuladas com os carboidratos não utilizados no metabolismo do N (TAIZ; ZEIGER, 2006). Considerando que o AV diminuiu significativamente quando adicionados EDTA/Fe ou EDDHA/Fe em dosagens iguais ou maiores a  $0,064 \text{ mmol L}^{-1}$ , sendo  $0,256 \text{ mmol L}^{-1}$  a de melhor resposta, a hipótese dos carotenoides permanece como a mais plausível (Tabela 2.6; Figura 2.9 L).

Dosagens iguais ou menores a  $0,128 \text{ mmol L}^{-1}$  de Citrato/Fe obtiveram as menores porcentagens de RC em relação às mesmas dosagens nas outras fontes de Fe, porém, foram observados elevados níveis de OX, baixo desenvolvimento de brotações (NB) e baixa MST, em níveis similares aos tratamentos de  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Tabela 2.6; Figura 2.9), pelo que ambas fontes deveriam ser desconsideradas na composição do meio basal. Ao mesmo tempo, foi possível atingir baixos níveis de RC com dosagens iguais ou maiores a  $0,064 \text{ mmol L}^{-1}$  de EDDHA/Fe em relação às mesmas dosagens de EDTA/Fe e  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Tabela 2.6).

Os níveis de oxidação foram diminuídos com dosagens iguais ou maiores a  $0,064 \text{ mmol L}^{-1}$  de EDTA/Fe e para qualquer dosagem de EDDHA/Fe, sendo  $0,256 \text{ mmol L}^{-1}$  de EDDHA/Fe o tratamento que apresentou melhor resposta (Tabela 2.6). Este fato, provavelmente, está relacionado à restauração dos mecanismos de desintoxicação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com a restituição dos níveis adequados de Fe.



Tabela 2.6 – Médias e desvios padrão para as variáveis CL, AV, RC, OX, NB, MST e PCAL, após 50 dias de crescimento em meio basal EDM adicionado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA e sacarose 20 g L<sup>-1</sup> e suplementado com distintas fontes e dosagens de Fe

Fonte	Fe (mmol L <sup>-1</sup> )	CL (1 – 4)	AV (1 – 4)	RC (%)	OX (1 – 4)	NB (número explante <sup>-1</sup> )	MST (mg explante <sup>-1</sup> )	PCAL (%)
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,032	2,52 ± 0,51Aa	2,20 ± 0,76Aa	76,00 ± 16,73Aa	2,04 ± 0,54ABa	0,48 ± 0,87Ab	7,12 ± 2,51Bb	21,00 ± 10,33Ab
	0,064	2,50 ± 0,51Aa	2,20 ± 0,62Aa	64,00 ± 16,73Aa	2,30 ± 0,66Aa	0,65 ± 0,99Ab	7,63 ± 3,19Bb	24,07 ± 15,17Bb
	0,128	2,24 ± 0,52Aa	2,32 ± 0,69Aa	64,00 ± 8,94Aa	2,20 ± 0,58Aa	0,20 ± 0,65Ab	9,38 ± 6,43Bb	28,15 ± 18,47Aab
	0,256	2,42 ± 0,50Aa	2,46 ± 0,59Aa	72,00 ± 10,95Aa	2,28 ± 0,68Aa	0,44 ± 0,92Ab	9,00 ± 4,86Bb	38,31 ± 16,70Ba
Citrato/Fe	0,032	2,20 ± 0,58Aa	2,20 ± 0,58Aa	28,00 ± 10,95Bb	2,16 ± 0,62Aa	0,08 ± 0,40Bb	6,32 ± 1,58Bb	25,55 ± 13,29Aab
	0,064	2,48 ± 0,51Aa	2,12 ± 0,60Aa	36,00 ± 16,73Bb	2,36 ± 0,49Aa	0,16 ± 0,47Bab	6,01 ± 2,06Bb	19,78 ± 14,31Bb
	0,128	2,50 ± 0,61Aa	2,05 ± 0,51Aa	42,00 ± 14,83Bb	2,20 ± 0,77Aa	0,10 ± 0,45Bb	6,30 ± 1,28Bb	21,18 ± 12,63Ab
	0,256	2,48 ± 0,51Aa	2,32 ± 0,63Aa	84,00 ± 8,94Aa	2,20 ± 0,50Aa	0,72 ± 1,24Ba	12,12 ± 7,46Ba	36,04 ± 17,65Ba
EDTA/Fe	0,032	2,24 ± 0,44Aa	2,28 ± 0,68Aa	68,00 ± 17,89Ba	1,68 ± 0,56BCa	3,92 ± 3,71Ab	38,18 ± 27,44Aa	51,47 ± 19,14Aa
	0,064	2,04 ± 0,45Ba	1,56 ± 0,58Bb	64,00 ± 8,94Aa	1,44 ± 0,51Ab	6,08 ± 2,06Aa	52,60 ± 33,28Aa	41,37 ± 13,01Aa
	0,128	1,40 ± 0,50Bb	1,48 ± 0,51Bb	80,00 ± 14,14Aa	1,60 ± 0,50Ab	5,40 ± 1,78Aab	35,53 ± 19,86Aa	28,71 ± 11,49Ab
	0,256	1,35 ± 0,49Bb	1,25 ± 0,44Bb	86,00 ± 8,94Aa	1,75 ± 0,55BCb	4,70 ± 2,54Aab	37,93 ± 26,45Aa	22,55 ± 12,44Ab
EDDHA/Fe	0,032	1,70 ± 0,47Ba	1,40 ± 0,50Ba	54,00 ± 16,73Ab	1,45 ± 0,60Ca	4,35 ± 1,79Aa	36,42 ± 24,31Aa	23,68 ± 16,59Aab
	0,064	1,20 ± 0,41Cb	1,16 ± 0,37Bb	36,00 ± 8,94Ab	1,32 ± 0,48Ba	5,20 ± 3,10Aa	35,52 ± 27,23Aa	19,91 ± 9,76Bb
	0,128	1,16 ± 0,37Bb	1,16 ± 0,37Bb	48,00 ± 17,89Ab	1,32 ± 0,48Ba	5,12 ± 2,80Aa	43,23 ± 36,93Aa	23,96 ± 17,16Aab
	0,256	1,13 ± 0,34Bb	1,04 ± 0,20Bb	44,00 ± 8,94Ab	1,17 ± 0,38Ca	5,42 ± 2,52Aa	45,37 ± 27,20Aa	25,69 ± 13,05ABa

Para cada variável nas colunas, letras minúsculas diferentes representam diferenças entre as dosagens de cada fonte de Fe e letras maiúsculas diferentes representam diferenças para uma mesma dosagem entre as fontes de Fe a  $P = 0,05$  do teste de Tukey para os efeitos simples (interação significativa)

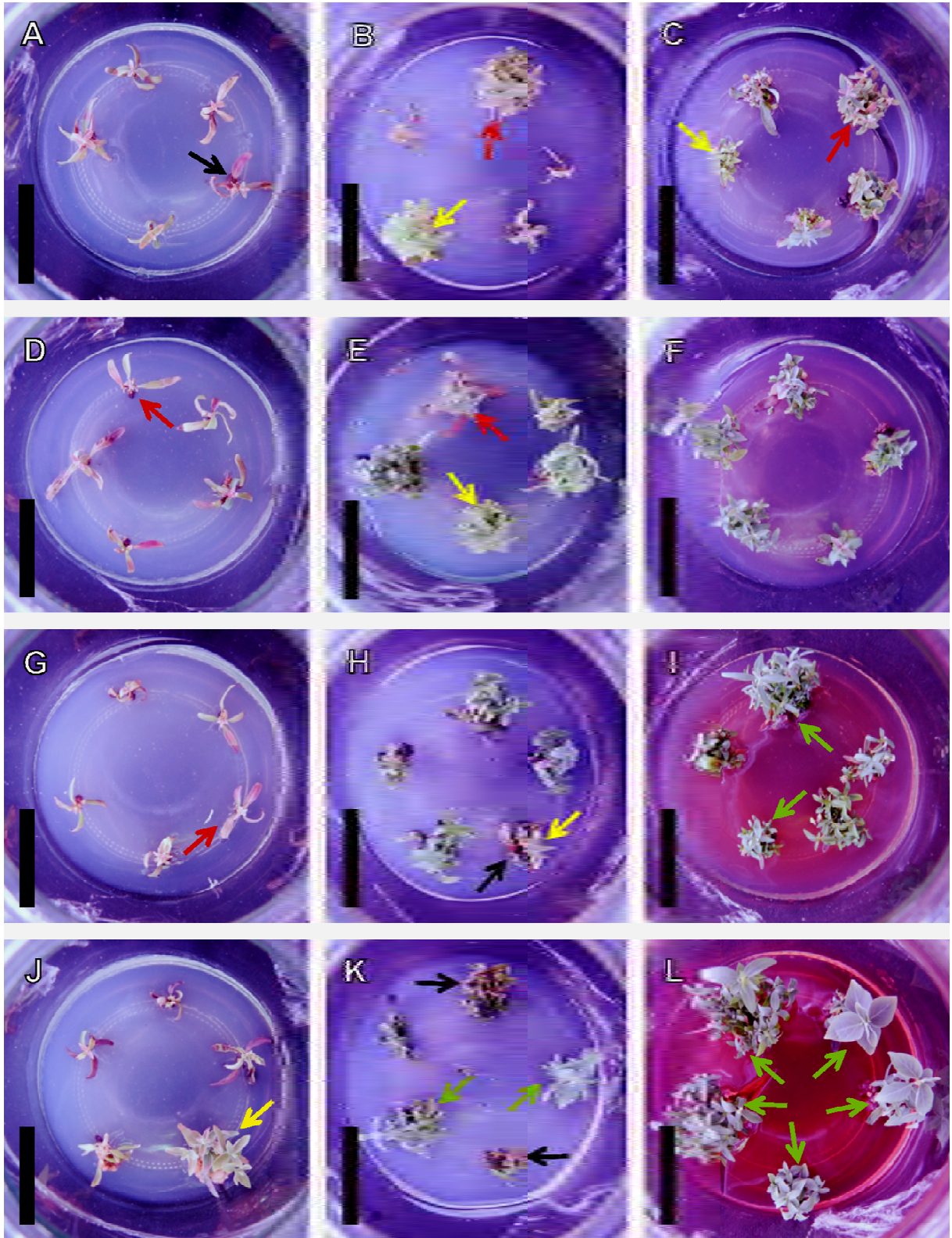


Figura 2.9 – Brotações de *E. dunnii* cultivadas 50 dias no meio EDM adicionado com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP,  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, sacarose  $20 \text{ g L}^{-1}$  e suplementado com dosagens de Fe de A), B) e C)  $0,032 \text{ mmol L}^{-1}$ ; D), E) e F)  $0,064 \text{ mmol L}^{-1}$ ; G), H) e I)  $0,128 \text{ mmol L}^{-1}$  e J), K) e L)  $0,256 \text{ mmol L}^{-1}$ . A), D), G) e J) correspondem a Citrato/Fe; B), E), H) e K) a EDTA/Fe e C), F), I) e L) a EDDHA/Fe. As brotações nos tratamentos adicionados com  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  se apresentaram visualmente similares aos tratamentos de Citrato/Fe. Barras = 2 cm. Setas amarelas = clorose; setas vermelhas = avermelhamento; setas pretas = sintomas de oxidação; setas verdes = brotações normais

Tabela 2.7 – Concentrações médias de nutrientes minerais em brotações de *E. dunnii* após 50 dias de crescimento em meio EDM adicionado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA e sacarose 20 g L<sup>-1</sup>, com distintas fontes e doses de Fe

FONTE	Dose de Fe (mmol L <sup>-1</sup> )	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
		g kg <sup>-1</sup>							mg kg <sup>-1</sup>		
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,032	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,064	27,79	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,128	24,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,256	24,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CITRATO/Fe	0,032	27,86	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CITRATO/Fe	0,064	28,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CITRATO/Fe	0,128	31,92	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CITRATO/Fe	0,256	25,68	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EDTA/Fe	0,032	33,25	7,31	19,13	8,28	1,50	1,38	129,50	105,5	537,0	115,0
EDTA/Fe	0,064	29,46	6,13	19,13	7,33	1,50	1,38	86,50	268,0	595,5	70,0
EDTA/Fe	0,128	31,72	5,03	16,83	5,73	1,20	1,33	81,50	700,0	513,0	51,0
EDTA/Fe	0,256	-	4,51	14,54	5,69	1,10	1,48	76,50	967,0	487,0	43,0
EDDHA/Fe	0,032	-	5,94	20,66	5,84	1,40	1,37	241,50	227,5	544,5	118,5
EDDHA/Fe	0,064	35,24	5,47	14,54	6,10	1,10	1,64	100,00	411,5	689,0	127,5
EDDHA/Fe	0,128	33,81	6,13	22,19	5,83	1,30	1,74	28,00	548,0	580,5	113,5
EDDHA/Fe	0,256	31,75	6,13	19,89	5,29	1,30	1,52	24,50	859,0	516,0	111,5

- = amostra insuficiente para a determinação

A MST obtida foi maior para todas as dosagens de EDDHA/Fe ou EDTA/Fe, porém, a dosagem de 0,032 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA/Fe, que corresponde ao meio basal EDM padrão apresentou 51,47% da massa seca total atribuída à massa de calos (PCAL), evidenciando sua grande predisposição para a formação de calos, aparentemente organogênicos, questão a ser considerada em futuros experimentos. Por outro lado, segundo Grattapaglia e Machado (1998), os calos podem comprometer a multiplicação de gemas axilares e seu alongamento, fato observado neste tratamento, que apresentou o menor NB entre as dosagens de EDTA/Fe. Esta característica foi minimizada com teores iguais ou maiores a 0,128 mmol L<sup>-1</sup> para EDTA/Fe ou com o uso de EDDHA/Fe em qualquer das dosagens.

Como consequência da baixa quantidade de massa seca produzida nos tratamentos que utilizaram Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O e Citrato/Fe, não foi possível realizar a análise química do material vegetal obtido. Contudo, nos tratamentos analisados, foi possível acompanhar o incremento do Fe nos tecidos com o incremento das dosagens (Tabela 2.7). Um efeito secundário do incremento das dosagens de EDDHA/Fe ou EDTA/Fe é uma acentuada tendência na diminuição da concentração do Cu para ambas as fontes e do Zn quando utilizado o EDTA/Fe, por causa da maior afinidade de cada quelato com cada íon metálico, de acordo com a especiação iônica dos meios basais EDM e EDMm (Anexo B e C) e a literatura

(DEGRYSE; SMOLDERS; PARKER, 2006; SCHAIDER et al., 2006; NOWAK; SCHWYZER; SCHULIN, 2008).

Adicionalmente, houve um decréscimo nas concentrações de P, K, Ca e Mg com o incremento das dosagens de EDTA/Fe (Tabela 2.7). No caso do P, esta queda poderia estar associada a uma maior proporção de P complexado com o Fe nas dosagens maiores de EDTA/Fe, como já observado na especiação iônica da solução inicial e do meio EDM (Anexo A e B). Ao mesmo tempo, o K diminuiu a concentração nas brotações com doses maiores de EDTA/Fe, em consonância com as baixas concentrações de Zn, como já observado por Higashi e Gonçalves (2006). Este último poderia ser explicado pela função do Zn na síntese de AIA e seu efeito no relaxamento das paredes celulares para possibilitar a extensão celular, evento que demanda inicialmente elevados níveis de K para sustentar a turgência dos tecidos e, posteriormente, de Ca e Mg para a reestruturação das paredes celulares (MARSCHNER, 1995; SRIVASTAVA, 2002). Uma vez que não se encontraram diferenças na MST entre as dosagens de EDTA/Fe, estes eventos estão mais correlacionados com a proporção de calos observada nestes tratamentos (Tabela 2.6), como já constatado para o Ca em *E. urophylla* por Trevizam et al. (2011).

De um modo geral, dosagens de 0,064 mmol L<sup>-1</sup> ou superiores a o,o-EDDHA/Fe promoveram o desenvolvimento de explantes com folhas maiores, mais verdes e menor explantes com regeneração de calos e/ou sintomas de oxidação. Neste sentido, Al Kai, Salesses e Mouras (1984) trabalhando com avelã, mencionam dosagens de 0,18 mmol L<sup>-1</sup> de EDDHA/Fe para obter o reverdecimento das folhas, evitando a clorose e o baixo crescimento na mesma concentração de EDTA/Fe. Resultados similares foram obtidos em rosa por Van Der Salm et al. (1994), substituindo 0,086 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA/Fe. Christensen et al. (2008) em um estudo mais detalhado com hibisco, relataram o incremento do conteúdo de clorofila, da área foliar, do número de brotações e da massa seca, nas dosagens entre 0,098 e 0,394 mmol L<sup>-1</sup> de EDDHA/Fe em relação as mesmas dosagens de EDTA/Fe, considerando a concentração de 0,295 mmol L<sup>-1</sup> como a mais adequada.

Os resultados deste trabalho sugerem que o meio EDM padrão pode ser indicado para obter regeneração de calos e gemas, sendo necessária a modificação da fonte e concentração de Fe para garantir o normal desenvolvimento das brotações. Contudo, devido as limitações destes experimentos, principalmente em relação das concentrações de reguladores de crescimento testadas, pesquisas com objetivos mais específicos deveriam ser realizadas para confirmar estas hipóteses.

## 2.4 Conclusões

- As diferenças morfofisiológicas entre as brotações juvenis de cepas e as folhas de *E. dunnii* provocam diferenças nos seus conteúdos de macro e micronutrientes.
- A espuma fenólica acondicionada com duas lavagens consecutivas com água deionizada a 100° C apresenta valores de pH maiores de 5, resultando apropriados para sua empregada como meio de suporte no cultivo *in vitro* de brotações de *E. dunnii*.
- O meio basal EDM na forma líquida e com suporte de espuma fenólica favorece o enraizamento *in vitro* de brotações de *E. dunnii*.
- O meio basal EDM com 0,032 ou 0,064 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA/Fe como fonte de Fe e solidificado com ágar induz a uma maior proporção de calos em brotações de *E. dunnii*, evidenciando seu potencial para a organogênese.
- O meio basal EDM com dosagens iguais ou maiores a 0,064 mmol L<sup>-1</sup> de EDDHA/Fe como fonte de Fe e solidificado com ágar, reduz a formação de calos, a clorose e a oxidação na multiplicação *in vitro* de brotações de *E. dunnii*.
- O meio basal formulado com base nos teores de macro e micronutrientes determinados em brotações de cepas, considerando o conceito de equilíbrio dinâmico e priorizando a disponibilidade dos nutrientes minerais, se mostra apropriada para crescimento de brotações de *E. dunnii*.

## Referências

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

AL KAI, H.; SALESSES, G.; MOURAS, A. Multiplication *in vitro* du noisetier (*Corylus avellana* L.). **Agronomie**, Les Ulis, v.4, n. 4, p. 399-402, 1984.

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442 p.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A.; GARCÍA-MARCO, S.; LUCENA, J. J. Evaluation of synthetic iron (III)-chelates (EDDHA/Fe<sup>3+</sup>, EDDHMA/Fe<sup>3+</sup> and the novel EDDHSA/Fe<sup>3+</sup>) to correct iron chlorosis. **European Journal of Agronomy**, Montpellier, v. 22, n. 2, p. 119-130, 2005.

ARANDA-PERES, A.N.; PERES, L.E.P.; HIGASHI, E.N.; MARTINELLI, A.P. Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea*

Bromeliads from the Brazilian Atlantic Forest: the importance of calcium. **Hortscience**, Alexandria, v. 44, n. 1, p. 106-112, 2009.

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

AYNALEM, H.M.; RIGHETTI, T.L.; REED, B.M. Iron formulation affects *in vitro* storage of hops: an image analysis **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, Columbia, v. 42, n. 5., p. 405-410, 2006.

BACCHETTA, L.; ARAMINI, M.; BERNARDINI, C.; RUGINI, E. *In vitro* propagation of traditional Italian hazelnut cultivars as a tool for the valorization and conservation of local genetic resources. **Hortscience**, Alexandria, v. 43, n.2, p. 562-566, 2008.

BARBAROUX, C.; BRENDA, N.; DUFRENE, E. Distribution of above-ground and below-ground carbohydrate reserves in adults trees of two contrasting broad-leaved species (*Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*). **New Phytologist**, Lancaster, v. 157, n. 3, p. 605-615, 2003.

BAK, D.P.; NAIK, S.K.; MUDGAL, A.; CHAND, P.K. Rapid plant regeneration through *in vitro* axillary shoot proliferation of butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) – a twinning legume. **In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant**, Columbia, v. 43, n. 2, p. 144-148, 2007.

BARROS, N.F.; TEIXEIRA, P.C.; TEIXEIRA, J.L. Nutrição e produtividade de povoamentos de eucalipto manejados por talhadia. **Série Técnica IPEF**, v. 11, n. 30, p. 79-87, 1997.

BELLOTE, A.F.J.; SILVA, H.D. Técnicas de amostragem e avaliações nutricionais em plantios de *Eucalyptus* spp. In: GONÇALVES, J. L. M.; BENEDETTI, V. **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2000. p. 105-133.

BERGMANN, W. **Nutritional disorders of plants: development, visual and analytical diagnosis**. Jena; Stuttgart; New York: Gustav Fischer, 1992. 741 p.

BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice**. Amsterdam: Elsevier, 1996. 767 p.

BONGA, J.M. Plant propagation in relation to juvenility, maturity, and rejuvenation. In: BONGA, J.L.; DURZAN, D.J. (Ed.) **Tissue culture in forestry**. Dordrecht: Nijhoff, 1982. p. 387-412.

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

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, London, v. 26, n. 2, p. 211–234, 1964.

BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. Function of nutrients: micronutrients. In: MARSCHNER, P. (Ed.). **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2012. p. 191-248.

- BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F.G.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.
- BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; HANSEL, F.A.; ARAÚJO, M. A. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum. Agronomy** Maringá, v. 33, n. 4, p. 655-663, 2011.
- BROYER, T.C.; CARLTON, A.B.; JOHNSON, C.M.; STOUT, P.R. Chlorine: a micronutrient element for higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 29, n. 6, p. 526–532, 1954.
- CASTILLO, B.; SMITH, M.A.L.; MADHAVI, D.L. Interactions of irradiance level and iron chelate source during shoot tip culture of *Carica papaya* L. **Hortscience**, Alexandria, v. 32, n. 6, p. 1120–1123, 1997.
- CHANEY, R.L.; BROWN, J.C.; TIFFIN, L.O. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. **Plant Physiology**, Rockville, v. 50, n. 2, p. 208-213, 1972.
- CHEN, W.; HE, Z.L.; YANG, X.E.; MISHRA, S.; STOFFELLA, P.J. Chlorine nutrition of higher plants: progress and perspectives. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 33, n. 7, p. 943-952, 2010.
- CHEN, Y.; LI, X.; SHEN, Z. Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextraction process. **Chemosphere**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 187–196, 2004.
- CHRISTENSEN, B.; SRISKANDARAJAH, S.; SEREK, M.; MÜLLER, R. *In vitro* culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 93, n. 2, p. 151–161, 2008.
- CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido**. 1993. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.
- \_\_\_\_\_. **Macronutrientes, aspectos nutricionais e bioquímicos no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis***. 2006. 171 p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11150/tde-21032007-165400/>>. Acesso em: 02 nov. 2013.
- CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.Y.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, Piracicaba, v. 48/49, p. 107-116, 1995.
- DE-EKNAMKUL, W; ELLIS B.E. Effects of macronutrients on growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 4, n. 2 , p. 46-49, 1985.

- DE KLERK, G.J.; HANECAKOVA, J.; JÁSIK, J. Effect of medium-pH and MES on adventitious root formation from stem disks of apple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, n. 3, p. 285-292, 2008.
- DE LA GUARDIA, M.D.; ALCÁNTARA, E. A comparison of ferric-chelate reductase and chlorophyll and growth ratios as indices of selection of quince, pear and olive genotypes under iron deficiency stress. **Plant and Soil**, The Hague, v. 241, n. 1, p. 49-56. 2002.
- DEGRYSE, F.; SMOLDERS, E.; PARKER, D. R. Metal complexes increase uptake of Zn and Cu by plants: implications for uptake and deficiency studies in chelator-buffered solutions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 289, n. 1/2, p. 171-185, 2006.
- DELL, B.; MALAJCZUK, N.; XU, D.; GROVE, T.S. **Nutrient disorders in plantation eucalypts**. 2<sup>nd</sup> ed. Canberra: Australian Center for International Agricultural Research, 2001. 188 p.
- DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 58, n. 1, p 49-59, 2009.
- DRIVER, J.A.; KUNIYUKI, A.H. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. **Hortscience**, Alexandria, v. 19, n. 1, p. 507-509, 1984.
- FAISAL, M.; SIDDIQUI, I.; ANIS, M. An efficient plant regeneration system for *Mucuna pruriens* L (DC) using cotyledonary node explants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant**, Columbia, v. 42, n. 1, p. 59-64, 2006.
- FURZE, M.J.; CRESSWELL C.F. Micropropagation of *Eucalyptus grandis* and *nitens* using tissue culture techniques. **South African Forestry Journal**, Pretoria, v. 135, n. 1, p. 20-23, 1985.
- GABA, V.P. Plant growth regulators in plant tissue culture and development. In: TRIGANO, R.N.; GRAY, D.J. (Ed.). **Plant tissue culture and development**. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 87-99.
- GABRIEL, K.R.; ODOROFF, C.L. Biplots in biomedical research. **Statistics in Medicine**, Chichester, v. 9, n. 5, p. 469-485, 1990.
- GANGOPADHYAY, G.; DAS, S.; MITRA, S.K.; PODDAR, R.; MODAK, B.K.; MUKHERJEE, K.K. Enhanced rate of multiplication and rooting through the use of coir in aseptic liquid culture media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 68, n. 3, p. 301-310, 2002.
- GEBHARDT, K. Development of a sterile cultivation system for rooting of shoot tip cultures (red raspberries) in duroplast foam. **Plant Science**, Limerick, v. 39, n. 2, p. 141-148, 1985.
- GEISS, G.; GUTIERREZ, L.; BELLINI, C. Adventitious root formation: new insights and perspectives. In: BEECKMAN, T. (Ed.). **Root development**. Oxford: Blackwell, 2010. p. 127-156.



GEORGE, E.F.; DE KLERK, G-J. The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. In: GEORGE E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G-J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 65-113.

GILE, P.L.; CARRERO J.O. Assimilation of iron by rice from certain nutrient solutions. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 7, n. 12, p. 503-528, 1916.

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

GRAÇA, M.E.C.; MENDES, S. Micropropagation of *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Annales des Sciences Forestières**, Les Ulis Cedex, v. 46, n. 2, p. 140-144, 1989.

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

GREEN-UP. Disponível em: <<http://www.floralatlanta.com.br/greenup/greenup/default.asp?menu=modo>>. Acesso em: 09 maio 2012.

GRIBBLE, K.; CONROY, J.P.; HOLFORD, P.; MILHAM, P.J. *In vitro* uptake of mineral by *Gypsophila paniculata* and hybrid eucalypt, and relevance to media mineral formulation. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 50, n. 6, p. 713-723, 2002.

GUSTAFSSON, J.P. **Visual MINTEQ, version 3.0**. Stockholm: KTH, Department of Land and Water Resources Engineering, 2010. Disponível em: <<http://www2.lwr.kth.se/English/OurSoftware/vminteq/index.htm>>. Acesso em: 05 maio 2013

HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H.; SCHJOERRING, J.; MØLLER, I.S.; WHITE, P. Functions of macronutrients. In: MARSCHNER, P. (Ed.). **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2012. p. 135-189.

HIGASHI, E.N. **Diagnose da eficiência de nutrientes minerais em três híbridos de *Eucalyptus spp.* cultivados *in vitro***. 1996. 90 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N. **Omissão dos nutrientes minerais na produção de matéria seca, aspectos nutricionais e bioquímicos em *Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden) cultivados *in vitro***. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Ciências Florestais, Laboratório de Fisiologia das Árvores, 2006. 70 p.

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

HU, H.; BROWN, P.H. Absorption of boron by plants roots. **Plant and Soil**, The Hague, v. 193, n. 1/2, p. 49-58, 1997.

HUNT, R. **Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis**. London: Edward Arnold, 1982. 242 p.

INGESTAD, T. New concepts on soil fertility and plant nutrition as illustrated by research on forest trees and stands. **Geoderma**, Amsterdam, v. 40, n. 3/4, p. 237-252, 1987.

INGESTAD, T.; ÅGREN, G.I. Plant nutrition and growth: basic principles. **Plant and Soil**, The Hague, v. 168/169, n. 1, p. 15-20, 1995.

JACOBSON, L. Maintenance of iron supply in nutrient solutions by a single addition of ferric potassium ethylenediamine tetra-acetate. **Plant Physiology**. Rockville, v. 26, n. 2, p. 411-413, 1951.

JAIN, N.; BABBAR, S.H. Gum katira - a cheap gelling agent for plant tissue culture media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, n. 3, p. 223-229, 2002.

JOLLIFFE, I.T. **Principal component analysis**. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2002. 502 p.

KOPPERS COMPANY INC. (United States). CARLSON, J.; KIFER, E.; WOJTYNA, V.; COLTON, J. **Phenol formaldehyde resoles for making phenolic foam, United States Patent (expired)**. 1985. Patent Number: 4539338.

KRONZUCKER, H.J.; COSKUN, D.; SCHULZE, L.M.; WONG, J.R.; BRITTO, D.T. Sodium as nutrient and toxicant. **Plant Soil**, The Hague, v. 369, n. 1/2, p. 1-23, 2013.

LE ROUX, J.J.; VAN STADEN, J. Micropropagation and tissue culture of Eucalyptus-a review. **Tree Physiology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 435-477, 1991.

MA, M.; ZHU, W.; WANG, Z.; WITKAMP, G. Accumulation, assimilation and growth inhibition of copper on freshwater alga (*Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG) in the presence of EDTA and fulvic acid. **Aquatic Toxicology**, Dordrecht, v. 63, n. 3, p. 221-228, 2003.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1995. 889 p.

MONTEIRO, A.C.B.A.; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. F. *flaviacarpa* Deg.). **In Vitro Cell & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 36, n. 6, p. 527-531, 2000.

MORARD, P; HENRY, M. Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture medium. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 21, n. 8, p. 1565-1576, 1998.

MORGAN, G.T.; DREW H.D.K. Researches on residual affinity and co-ordination. Part II. Acetylacetones of selenium and tellurium. **Journal of the Chemical Society**, London, v. 117, p. 1456-1465, 1920.

MOURÃO FILHO, F.A.A. DRIS: concepts and applications on nutritional diagnosis in fruit crops. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 5, p. 550-560, 2004.

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

MURILO, V.G. **Otimização da multiplicação de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. *in vitro***. 2009. 101 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11150/tde-23062009-160515/>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

NAS, M.N.; READ, P.E. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 101, n. 1/2, p. 189-200, 2004.

NAVROSKI, M.C. **Multiplicação *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2011. 101 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

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**, Lavras, v. 19, n. 4, p. 545-550, 2013.

NAYAK, P.; BEHERA, P.R.; THIRUNAVOUKKARASU, M. High frequency plantlet regeneration from cotyledonary node cultures of *Aegle marmelos* (L.) Corr. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbus, v. 43, p. 231-236, 2007.

NEWELL, C.; GROWNS, D.; McCOMB, J. The influence of medium aeration on *in vitro* rooting of Australian plant microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 2, p. 131-142, 2003.

NOWACK, B.; SCHWYZER, I.; SCHULIN, R. Uptake of Zn and Fe by wheat (*Triticum aestivum* var. Greina) and transfer to the grains in the presence of chelating agents (Ethylenediaminedisuccinic acid and Ethylenediaminetetraacetic Acid). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 12, p. 4643-4649, 2008.

OLESEN, P.O. On cyclophysis and topophysis. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 27, n. 5, p. 173-178, 1978.

OLIVEIRA, E.M.M.; RUIZ, H.A.; ALVAREZ, V.V. H.; FERREIRA, P.A.; COSTA, F.O.; ALMEIDA, I.V.C. Nutrient supply by mass flow and diffusion to maize plants in response to soil aggregate size and water potential. **Revista Brasileira da Ciência de Solo**, Viçosa, v. 34, n. 2, p. 317-328, 2010.

PAULUS, D.; MEDEIROS, S.L.P.; SANTOS, O.S; RIFFEL, C.; FABBRIN, G.; PAULUS, E.. Substratos na produção hidropônica de mudas de hortelã. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 48-50, 2005.

PARVEEN, S.; SHAHZAD, A.; SAEMA, S. *In vitro* plant regeneration system for *Cassia siamea* Lam., a leguminous tree of economic importance. **Agroforestry System**, Dordrecht, v. 80, n. 1, p. 109-116, 2010.

PEREIRA-NETTO, A.B.; PETKOWICZ, C.L.O.; CRUZ-SILVA, C.T.A.;GAZZONI, M.T.; ELLO, A.F.P.; SILVEIRA, J.L.M. Differential performance of marubakaido apple rootstock shoots grown in culture media containing different agar brands: dynamic rheological analysis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbus, v. 43, n. 4, p.356–363, 2007.

POOTHONG, S.; REED, B. Modeling the effects of mineral nutrition for improving growth and development of micropropagated red raspberries. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 165, n. 22, p. 132-141, 2014.

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 05 maio 2013.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 38, n. 2, p. 116-124, 2002.

REIS, M.G.F.; KIMMINS, J.P. Importância do sistema radicular no crescimento inicial de brotos de *Eucalyptus spp.* **Revista Árvore**, Viçosa, v. 10, n. 2, p. 112-125, 1986.

ROBINSON, N.J.; PROCTER C.M.; CONNOLLY, E.L.; GUERINOT, M.L. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils, **Letters to Nature**, London, v. 397, n. 6721, p. 694–697, 1999.

RÖMHELD, V. Diagnosis of deficiency and toxicity of nutrients. In: MARSCHNER, P. (Ed.). **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2012. p. 299–312.

RUGINI, E. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 24, n. 2, p. 123-134, 1984.

SCHAIDER, L.A.; PARKER, D.R.; SEDLAK, D.L. Uptake of EDTA-complexed Pb, Cd and Fe by solution and sand-cultured *Brassica juncea*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 286, n. 1/2, p. 377–391, 2006.

SCHACHTMAN, D.P.; REID, R.J.; AYLING, S.M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 447-53, 1998.

SCHOLTEN, H.J.; PIERIK, R.L.M. Ágar as a gelling agent: chemical and physical analysis. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 17, n. 3, p. 230–235, 1998.

- SCHWARZ, G.E. Estimating the dimension of a model. **Annals of Statistics**, Philadelphia, v. 6, n. 2, p. 461–464, 1978.
- SHAFF, J.E.; SCHULTZ, B.A.; CRAFT, E.J.; CLARK, R.T.; KOCHIAN, L.V. GEOCHEM-EZ: a chemical speciation program with greater power and flexibility. **Plant and Soil**, The Hague, v. 330, n. 1/2, p. 207–214, 2010.
- SOUZA, G.M.; GONÇALVES, A.N. Otimização do meio de cultura para a bananeira (*Musa cavendishii* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 51-59, 1996.
- SPAARGAREN, D.H. The design of culture media based on elemental composition of biological material. **Journal of Biotechnology**, Philadelphia, v. 45, n. 2, p. 97–102, 1996.
- SRIVASTAVA, L.M. **Plant growth and development: hormones and environment**. London: Academic Press, 2002. 772 p.
- STEINER, A.A.; VAN WINDEN, H. Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 46, n. 6, p. 862-863, 1970.
- SUBBARAO, G.V.; ITO, O.; BERRY, W.L.; WHEELER, R.M. Sodium: a functional plant nutrient. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v. 22, p. 391–416, 2003.
- TANAKA M.; DAM THI THANH GIANG; MURAKAMI, A. Application of a novel disposable film culture system to photoautotrophic micropropagation of *Eucalyptus urograndis* (*urophylla* × *grandis*). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 41, n. 2, p. 173-180, 2005.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4<sup>th</sup> ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2006. 705 p.
- THORPE, T.; STASOLLA, C.; YEUNG, E.C.; DE KLERK, G-J.; ROBERTS, A.; GEORGE, E.F. The components of plant tissue culture media ii: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G-J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 115-174.
- TREJGELL, A.; LIBRONT, I.; TRETYN, A. The effect of Fe-EDDHA on shoot multiplication and *in vitro* rooting of *Carlina onopordifolia* Besser. **Acta Physiologiae Plantarum**, Krakow, v. 34, n. 5, p. 2051–2055, 2012.
- TREVIZAM, R.; BRONDANI, G.E.; NERY, F.U.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Caracterização morfológica de calos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake sob concentrações de boro e cálcio. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 2, p. 215-222, 2011.
- TROMP, J. Nutrient reserves in roots of fruit trees, in particular carbohydrates and nitrogen. **Plant and Soil**, The Hague, v. 71, n. 1/3, p. 401–413. 1983.
- TSAO, C.; REED, B.M. Gelling agents, silver nitrate, and sequestrene iron influence adventitious shoot and callus formation from *Rubus* leaves. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 38, n. 1, p. 29–32; 2002.

VAN DER SALM, T.P.M.; VAN DER TOORN, C.J.G.; HANISCH TEN CATE, C.H.; DUBOIS, L.A.M.; DE VRIES, D.P.; DONS, H.J.M. Importance of the iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrid* L. 'Moneyway'. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Heidelberg, v. 37, n. 1, p. 73–77, 1994.

VIDELA, P.; CHUNG, P. Micropropagación de *Eucalyptus globulus* a través de segmentos nodales. **Ciencia e Investigación Forestal**, Santiago de Chile, v. 10, n. 2, p. 165-173, 1996.

WALWORTH, J.L.; SUMNER, M.E. The Diagnosis and Recommendation Integrated System (DRIS). **Advances in Soil Science**, Heidelberg, v. 6, p. 149-188, 1987.

WENZEL, W.W.; OBURGER, E.; PUSCHENREITER, M.; SANTNER, J. Trace element biogeochemistry in the rhizosphere. In: MAGDI SELIM, H. (Ed.). **Dynamics and bioavailability of heavy metals in the root zone**. Boca Raton: CRC Press, 2011. p. 147-182.

WIECHETECK, M.; GRAÇA, M.E.C.; DE ARAÚJO, A. Micropropagation of *Eucalyptus viminalis* Labill. **Annals of Forest Science**, Les Ulis, v. 46, p. 161-164, 1989.

WITTE, C.P.; TILLER, S.A.; TAYLOR, M.A.; DAVIES, H.V. Addition of nickel to Murashige and Skoog medium in plant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 68, n. 1, p. 103–104, 2002.

WU, H.; LI, L.; DU, J.; YUAN, Y.; CHENG, X.; LING, H.Q. Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 46, n. 9, p. 1505–1514, 2005.

ZHANG, H.; HERMAN, J.P.; BOLTON, H.; ZHANG, Z.; CLARK, S.; XUN, L. Evidence indicating that a bacterial ABC-type transporter imports free EDTA for metabolism. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 22, p. 7991-7997, 2007.



### 3 REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE *Eucalyptus dunnii* VIA ORGANOGÊNESE *IN VITRO*

#### Resumo

*E. dunnii* é uma boa alternativa a outras espécies de eucaliptos para áreas com ocorrência de geadas, porém, apresenta limitações na disponibilidade de material de propagação. Considerando o grande potencial das técnicas de cultura de tecidos para a propagação de plantas, assim como a sua importância na obtenção de plantas transgênicas, avaliou-se a capacidade de organogênese *in vitro* em cotilédones e hipocótilos de plântulas de *E. dunnii*. Foram testadas várias combinações de ANA ou AIA e BAP (0; 0,1; 0,5 e 1 mg L<sup>-1</sup>) em um meio basal desenvolvido especificamente para a espécie (EDM). Além disso, foi estudado o efeito da topofisis na regeneração de gemas e calos em segmentos de hipocótilos. Por fim, visando a obtenção de microplantas, foram testadas sob condições *ex vitro*, distintas dosagens de AIB e ANA veiculado em pó, nas microestacas obtidas da multiplicação *in vitro* do material originado através da organogênese. Os segmentos de hipocótilos demonstraram maior capacidade de organogênese, sendo os distais os que apresentaram maior competência. Dosagens combinadas de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA e BAP ou 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA e BAP induziram a maior quantidade de explantes com regeneração de gemas. Entretanto, através da análise de regressão foi estimada uma dosagem ótima de 0,59 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,28 mg L<sup>-1</sup> de BAP para atingir 26,8% de regeneração de gemas. Por último, foi possível determinar que a aplicação de AIB ou ANA veiculado em pó não contribuiu com o incremento do enraizamento *ex vitro* das microestacas de *E. dunnii*, obtendo-se em média 51,4 % de sobrevivência após 70 dias do início do experimento, sem a aplicação exógena de hormônios.

Palavras-chave: Propagação *in vitro*; Ácido  $\alpha$ -naftalenoacético; Ácido indolacético; 6-Benzilaminopurina; Topofisis; Enraizamento *ex vitro*; Microestacas

#### Abstract

*E. dunnii* is a good alternative to other eucalypts species in prone-to-frosts areas, however, it has limitations in the availability of propagation material. Given the great potential of tissue culture techniques for plant propagation, as well as its importance in plant genetic transformation processes, we assessed the competence for *in vitro* organogenesis of *E. dunnii* cotyledons and hypocotyls. Several combinations of BAP and NAA or IAA (0; 0.1; 0.5 and 1 mg L<sup>-1</sup>) were added to a specifically developed basal medium (EDM). Moreover, the effect of hypocotyls topophysis on bud and callus regeneration was studied. Finally, in order to achieve plant regeneration, microcuttings obtained from *in vitro* multiplication of the regenerated buds were treated with different dosages of IBA and NAA (powder based) under *ex vitro* conditions. Bud regeneration was observed only in hypocotyls, were the distal segments showed greater competence. Combined dosages of 0.5 mg L<sup>-1</sup> NAA and BAP or 0.5 mg L<sup>-1</sup> IAA and BAP induced the highest bud regeneration rates. Regression analysis predicts an optimal dosage of 0.59 mg L<sup>-1</sup> NAA and 0.28 mg L<sup>-1</sup> BAP to achieve 26.8% of bud regeneration. Finally, it was observed that the use of IBA or NAA did not significantly influence the *ex vitro* rooting of *E. dunnii* microshoots, yielding an average of 51.4% survival after 70 days of growth without the application of growth regulators.

Keywords: *In vitro* propagation;  $\alpha$ -Naphthalene acetic acid; 6-Benzylaminopurine; Indol acetic acid; Topophysis; *Ex vitro* rooting; Microcuttings



### 3.1 Introdução

O enorme potencial de várias espécies de eucalipto para a produção de madeira e fibra para celulose e papel, ligado ao crescente domínio comercial dos membros deste gênero no mercado mundial, o tornam um alvo óbvio para a propagação *in vitro* e a manipulação genética (MERKLE; NAIRN, 2005). A disponibilidade de um protocolo de regeneração de plantas é um dos pré-requisitos essenciais para a implementação da engenharia genética no melhoramento (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; RAO et al., 2009), constituindo o principal obstáculo na transformação genética das árvores (LABATE et al., 2009).

Poucos são os estudos que relatam a organogênese *in vitro* para *E. dunnii*, Termignoni, Wang e Hu (1996) reportaram a indução da embriogênese somática empregando sementes recém-germinadas como explante. Posteriormente, o processo de regeneração de plantas por embriogênese somática a partir de indivíduos adultos foi patenteado (TERMIGNONI, 1998), contudo, sem detalhes disponíveis do protocolo. Finalmente, Oliveira et al. (2011) obtiveram regeneração de gemas trabalhando com um clone híbrido *E. benthamii* x *E. dunnii* a partir de explantes foliares.

Conforme Gamborg et al. (1976), tanto a origem do explante como o meio de cultura são fatores determinantes no sucesso da propagação *in vitro*. Neste sentido, uns dos explantes mais utilizados na otimização de protocolos para a regeneração de plantas através da organogênese são os cotilédones e/ou hipocótilos de plântulas germinadas *in vitro*, tanto para espécies tropicais e subtropicais (TIBOK et al., 1995; BARRUETO CID et al., 1999; BRAVO et al., 2008; DIBAX et al., 2005; HUANG; ZENG; LU, 2010), como para espécies temperadas de eucaliptos (AZMI et al., 1997; BANDYOPADHYAY et al., 1999; NUGENT et al., 2001; GLOCKE; COLLINS; SEDGLEY, 2006). Ao mesmo tempo, trabalhos anteriores utilizaram os meios basais MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962), WPM (LLOYDS; MCCOWN, 1980) e JADS (CORREIA, 1993; CORREIA et al., 1995) com pouco sucesso em *E. dunnii* e o híbrido *E. benthamii* x *E. dunnii* (TERMIGNONI; WANG; HU, 1996; OLIVEIRA et al., 2011).

A oxidação fenólica é um problema frequente na micropropagação de plantas perenes, representando um fator limitante no crescimento das culturas (PREECE, 2008; BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010). Os danos pelo estresse oxidativo são originados quando a produção das espécies reativas do oxigênio (EROs) ultrapassa a capacidade de desintoxicação das enzimas antioxidantes, como as peroxidases e catalasas, evento relacionado, dentre outros fatores, com o teor de sais do meio basal (GEORGE, 1996; CASSELLS; CURRY, 2001) e a deficiência de Fe (MARSCHNER, 1995; RANIERI et al., 2001).

Segundo Vasil (2008), as células somáticas vegetais podem se dêsdiferenciar para dar origem a células embriogênicas totipotentes que possuem a habilidade de proliferar e/ou regenerar um embrião. A re-especificação do tipo celular pode ser induzida em tecidos adultos das plantas como consequência de ferimentos, mudanças nos estímulos externos e/ou internos ou mudanças na informação posicional. Contudo, em muitas espécies, a reprogramação de células adultas para a regeneração de órgãos se torna difícil, especialmente em espécies florestais (ABARCA; DIAZ-SALA, 2008), nas quais a perda da capacidade de regeneração está associada à idade e maturação da árvore (BONGA; ADERKAS, 1993; DAY et al., 2002; VALLEDOR et al., 2010).

A origem do explante determina sua idade ontogênica, sendo os tecidos juvenis os que normalmente apresentam maior resposta organogênica (VALLEDOR et al., 2007, 2010). Neste sentido, um mesmo tipo de explante pode produzir respostas morfogênicas diferentes de acordo com a sua posição hierárquica na planta matriz, efeito denominado topofisis (OLESEN, 1978; PIERIK, 1997), fato demonstrado para várias espécies e tipos de tecidos vegetais (FÁRI; CZAKÓ, 1981; KAMEYA; WIDHOLM, 1981; OKUBO; WADA; UEMOTO, 1991; BREDMOSE; HANSEN, 1996; PEER; GREENWOOD, 2001; HUNG; TRUEMAN, 2011).

O ácido naftalenoacético (ANA), o ácido indol acético (AIA) e a 6-benzilaminopurina (BAP) têm demonstrado ser efetivos na indução da organogênese em várias espécies e híbridos de eucaliptos, em um intervalo de concentrações de 0,05 a 0,7 mg L<sup>-1</sup> para o ANA, de 0,05 a 5 mg L<sup>-1</sup> para o AIA e de 0,25 a 1 mg L<sup>-1</sup> para o BAP (LE ROUX; VAN STANDEN, 1991; GLOCKE; COLLINS; SEDGLEY, 2006; DIBAX et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). A grande variação nas dosagens citadas como eficazes pode estar relacionada ao fato de que as respostas são moduladas pelo genótipo (BHOJWANI; RAZDAN, 1996), evidenciando a necessidade de otimização destes fatores a nível de espécie e, caso seja necessário, a nível individual.

O ácido indol acético (AIA) foi o primeiro hormônio vegetal utilizado para estimular o enraizamento adventício (COOPER, 1935). Quase ao mesmo tempo, foi descoberto o ácido indol butírico (AIB), que induz o enraizamento mais efetivamente do que o AIA (ZIMMERMAN; WILCOXON, 1935), fato que pode ser atribuído à maior estabilidade da sua molécula (GEISS; GUTIERREZ; BELLINI, 2010). Contudo, níveis endógenos elevados de AIA podem dispensar o uso exógeno de auxinas, condições encontradas geralmente em tecidos juvenis e em ativo crescimento.

Um tratamento de enraizamento eficiente deve provocar uma elevada porcentagem de enraizamento e uma elevada qualidade do sistema radicular, determinada pelo comprimento e quantidade de raízes e pela ausência de calos na base do caule (MOHAMMED; VIDAVER, 1990; DE KLERK; TER BRUGGE; MARINOVA, 1997; GONÇALVES; DIOGO; AMANCIO, 1998). O enraizamento em condições *ex vitro* produz raízes mais extensas, mais ramificadas e um maior número de raízes finas, em contraposição as raízes obtidas em meio semissólido, as quais são geralmente grossas, não ramificadas e sem pêlos radiculares (BARRY-ETIENNE et al., 2002; HATZILAZAROU et al., 2006).

Com base no exposto, este trabalho abordou a regeneração *in vitro* de microplantas via organogênese de *E. dunnii*, testando dosagens e combinações de ANA ou AIA e BAP e distintos tipos de explante, em um meio de cultura desenvolvido especificamente para esta espécie (EDM). Por fim, avaliou-se a influência de diferentes dosagens de AIB ou ANA, veiculado em pó, no enraizamento *ex vitro* de brotações obtidas por multiplicação e alongamento do material organogênico produzido.

### 3.1.1 Hipóteses

- Os hipocótilos e cotilédones de plântulas germinadas *in vitro* de *E. dunnii* constituem uma fonte adequada de explantes para obter organogênese.
- Dosagens combinadas de ANA e BAP ou de AIA e BAP nas concentrações adequadas induzem respostas morfogênicas nos explantes.
- A posição original dos segmentos de hipocótilos na plântula matriz (topofisis) afeta a sua competência para a organogênese.
- O enraizamento *ex vitro* de brotações obtidas por regeneração pode ser induzido com dosagens adequadas de AIB e/ou ANA.
- O meio basal EDM é apropriado para a indução da organogênese adventícia em explantes de *E. dunnii*.
- O meio basal EDMm é apropriado para a multiplicação *in vitro* de gemas axilares de *E. dunnii*.

### 3.1.2 Objetivos

- Definir o tipo de explante de maior resposta organogênica.
- Determinar combinações e concentrações ótimas de AIA ou ANA e BAP para a indução da organogênese.

- Determinar se a posição hierárquica dos segmentos de hipocótilos exerce algum efeito nas respostas morfogênicas.
- Determinar concentrações ótimas de AIB e/ou ANA para o enraizamento *ex vitro* das brotações regeneradas de *E. dunnii*.
- Determinar se o meio basal EDM é adequado para a regeneração de plantas de *E. dunnii* via organogênese.
- Determinar se o meio basal EDMm é adequado para a multiplicação *in vitro* de gemas axilares de *E. dunnii*.

## 3.2 Material e métodos

### 3.2.1 Organogênese

A fonte das sementes e os procedimentos para a desinfecção e semeadura *in vitro* foram os mesmos que os detalhados no item 2.2.4.

Após 14 dias em sala de crescimento, as plântulas produzidas foram usadas como fonte de explantes na forma de cotilédones e/ou hipocótilos. Estes últimos foram divididos em duas seções, distal e proximal (da raiz) para o estudo da topófise na organogênese (Figura 3.1).

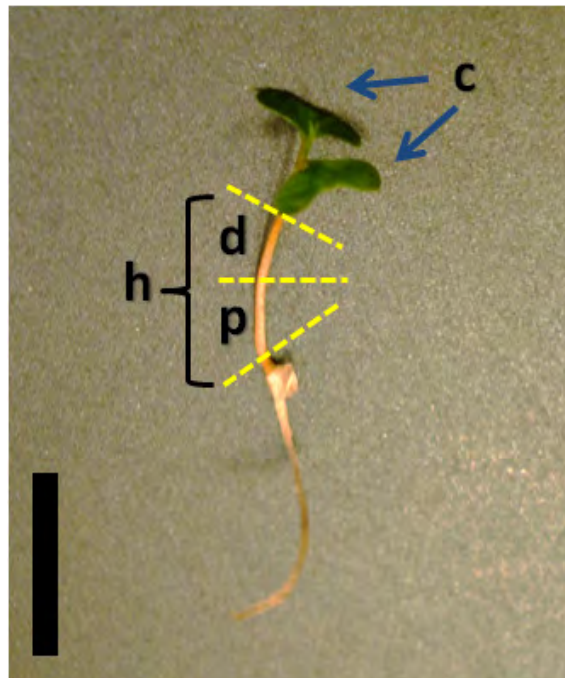


Figura 3.1 – Plântula de *E. dunnii* de 14 dias de idade germinada *in vitro* empregada como fonte de explantes, as linhas pontilhadas indicam as áreas de corte dos hipocótilos. h = hipocótilo; d = segmento distal; p = segmento proximal e c = cotilédones. Barra = 1 cm

Os meios de cultura foram preparados a partir de soluções estoque dos sais minerais, vitaminas e aminoácidos que compõem o meio EDM (Tabela 2.4, p.48), com adição de sacarose 30 g L<sup>-1</sup> para os meios de regeneração e sem adição de sacarose para o meio de germinação. A adição de reguladores de crescimento ao meio para indução da organogênese foi de acordo com as combinações das concentrações 0; 0,1; 0,5 e 1 mg L<sup>-1</sup> para AIA, ANA e BAP. Para o estudo do efeito da topófise, foi usada uma dosagem de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA. O pH dos meios foi ajustado para 5,8 utilizando KOH (1N) ou HCl (1N), prévio a adição de 6 g L<sup>-1</sup> de ágar SIGMA<sup>®</sup> A7921. Foram adicionados 40 ml do meio de cultura para cada frasco de vidro de 250 ml. A esterilização foi feita em autoclave à temperatura de 121°C sob pressão de 1 kg cm<sup>-2</sup>, durante 20 minutos.

Os cultivos foram mantidos na sala de crescimento sob condições de temperatura de 25 ± 2°C, com fotoperíodo de 12 horas e RFA de 22 μmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes de luz clara, tipo luz do dia. Os subcultivos foram realizados a cada 25 dias.

### 3.2.2 Análise histológica da organogênese

Segmentos de hipocótilos foram amostrados a cada sete dias, desde o início do experimento até o dia 28. Os mesmos foram fixados com solução de Karnovski (1965) e bomba de vácuo, seguida de desidratação alcoólica-etílica em concentrações crescentes (10 a 100% v/v). As amostras foram emblocadas em resina de hidroxietil metacrilato (Leica<sup>®</sup>) e seccionadas longitudinalmente a 5 μm de espessura em micrótomo rotativo manual. As lâminas obtidas foram submetidas a dupla coloração, utilizando ácido periódico de Schiff (PAS) e Naphtol blue black (NBB) (FISHER, 1968) e por fim, montadas em lâminas histológicas com resina sintética Entellan<sup>®</sup>. As lâminas foram analisadas e fotografadas na mesma escala com microscópio de luz (Zeiss-Jenemed<sup>®</sup>) e câmera digital (Samsung SDC-313<sup>®</sup>).

### 3.2.3 Enraizamento

As gemas e calos organogênicos obtidos no experimento de organogênese foram multiplicados em meio basal EDM modificado com 0,256 mmol L<sup>-1</sup> de EDDHA/Fe (286 mg L<sup>-1</sup> Basafer<sup>®</sup> Plus) como fonte de Fe (EDMm) e adicionado com 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 5 g L<sup>-1</sup> de ágar SIGMA<sup>®</sup> A7921. Após sete subcultivos, as brotações coletadas foram padronizadas a microestacas apicais de 2 a 3 cm de comprimento e foi retirado o primeiro par de folhas da base. Os procedimentos restantes referentes aos meios de cultura e condições de crescimento foram os mesmos que os mencionados para a

organogênese. Na base das microestacas, foi aplicado AIB ou ANA (0; 1,5; 3; 6 e 12 g L<sup>-1</sup>) veiculado em pó. O enraizamento foi realizado em condições *ex vitro* em bandejas plásticas com células de 13 ml de capacidade, vedadas em recipientes plásticos para evitar a perda de umidade. O substrato empregado foi uma mistura esterilizada de casca de pinus moída e compostada, perlita e vermiculita na proporção 2:1:1. Desde o início, as microestacas foram aspergidas diariamente com água e, a cada sete dias, com a fração mineral do meio EDM e Captan<sup>®</sup> (2 g L<sup>-1</sup>), até os 30 dias, momento da saída para a casa de vegetação. Até o dia 30, as condições de crescimento foram as mesmas que as mencionadas para a organogênese e, entre os dias 30 e 40 as microestacas permaneceram em casa de vegetação com UR de 85 ± 5% e temperatura média de 26 ± 2°C. Após 40 dias, as mesmas foram retiradas da casa de vegetação e levadas para a casa de sombra, passados 60 dias, elas foram levadas para área de pleno sol.

### 3.2.4 Análises estatísticas

Para testar os efeitos do ANA e do BAP na organogênese dos cotilédones e dos segmentos de hipocótilos, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) sob arranjo fatorial 4 x 4 (ANA x BAP) com cinco repetições para cada tipo de explante (cotilédones ou hipocótilos). Para estudar o efeito do AIA, foi utilizado o mesmo delineamento (DIC) sob arranjo fatorial 2 x 5 (tipo de explante x meio de indução) e seis repetições. A unidade experimental foi um frasco de vidro de 250 ml contendo nove hipocótilos ou cotilédones, sendo cada um dos explantes a unidade observacional. As variáveis, regeneração de gemas (RG), número de gemas/brotações por explante (NG), regeneração de raízes (RR), número de raízes adventícias por explante (NR), regeneração de calos (RC), oxidação (OX) e intumescimento (IN) foram aferidas aos 50 dias de cultivo.

Para avaliar o efeito da toposis na organogênese, 180 hipocótilos foram seccionados em dois segmentos, distal e proximal (Figura 3.1), e dispostos sob DIC com 10 repetições. A unidade experimental consistiu de um frasco de vidro de 250 ml contendo 18 segmentos de hipocótilos, nos quais, aos 50 dias de cultivo foram avaliados RG, NG e RC.

No estudo do enraizamento, o delineamento experimental foi DIC com cinco tratamentos, 27 repetições para o teste do AIB e 36 repetições para o teste do ANA, considerando cada estaca como unidade experimental. Aos 70 dias de iniciado o experimento foi avaliado o enraizamento (ER) e aos 90 dias, a presença de calos na base das microestacas.

Previamente às análises, foi verificada a ausência de *outliers*, a homogeneidade da variância e a normalidade dos erros, posteriormente foi feita a análise da regressão polinomial

múltipla, regressão linear quasipoisson ou logística (1 = enraizamento), em função do tipo da variável resposta. Caso as variáveis não se ajustassem as hipóteses necessárias para as análises paramétricas, foram aplicadas as transformações de Box-Cox, e nos casos elas continuassem não se ajustando, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Todas as análises foram realizadas no programa R, versão 3.0.2 (R CORE TEAM, 2013), com os pacotes ‘MASS’, ‘pgirmess’, ‘rsm’, ‘rms’ e ‘popbio’. A escolha do melhor modelo foi baseada no critério da informação bayesiano de Schwarz - BIC (SCHWARZ, 1978), selecionando os modelos mais simples e, por sua vez, com maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

### 3.3 Resultados e discussão

#### 3.3.1 Organogênese

Após passados 50 dias de cultura, não foi observada organogênese nos cotilédones, portanto, as variáveis NR, RR, NG e RG não apresentaram respostas para este tipo de explante. Elevados níveis de oxidação (OX) foram observados na maioria destes explantes (Figura 3.3 A), principalmente nos tratamentos sem adição de BAP ou de ANA, e nos de maior concentração de ANA; entretanto, as menores incidências de OX foram obtidas com dosagens de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP ou  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP (Tabela 3.1).

O intumescimento (IN) e a regeneração de calos (RC) observadas nos cotilédones (Figura 3.3 A) apresentaram uma tendência ao aumento nos seus níveis com o incremento das dosagens de ANA e BAP. A combinação de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP apresentou os maiores níveis de regeneração de calos (77,78%) sem evidenciar intumescimento (Tabela 3.1). Segundo o modelo de regressão selecionado, o ponto máximo predito para RC nas folhas cotiledonares foi 97,6% para as dosagens de  $0,74 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA e  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP (Figura 3.2), combinação que poderia ser experimentada no caso de implementar-se um processo de indução em duas etapas para este tipo de explantes, sendo primeiramente a indução de calos e a posterior indução de gemas nos calos obtidos.

Nos segmentos de hipocótilos de *E. dunnii*, foram observadas tanto RG como RR, as quais começaram a ser visíveis a partir dos 21 dias de cultura *in vitro* (Figuras 3.3 B, C, 3.4 I e 3.5 C). Elevadas porcentagens de RR foram obtidas nos tratamentos sem BAP, dentre os quais o tratamento com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA foi o que apresentou melhor resposta, com 77,1% dos explantes enraizados e  $1,2 \text{ raízes explante}^{-1}$  (Tabela 3.2). Neste sentido, Bandyopadhyay et al. (1999) reportaram a indução de raízes em hipocótilos de *E. globulus* e *E. nitens*, porém, com dosagem de  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA.

Tabela 3.1 - Médias e desvio padrão para as variáveis regeneração de raízes (RR), número de raízes adventícias por explante (NR), regeneração de gemas (RG), número de gemas por explante (NG), regeneração de calos (RC), oxidação (OX) e intumescimento (IN), avaliadas após 50 dias de cultura *in vitro* de cotilédones de *E. dunnii* em meio basal EDM sob distintas dosagens de ANA e BAP

ANA	BAP	RR	NR	RG	NG	RC	OX	IN
(mg L <sup>-1</sup> )		(%)	(número explante <sup>-1</sup> )	(%)	(número explante <sup>-1</sup> )	(%)	(%)	(%)
0	0	0,00±0,00A	0,02 ± 0,04A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	0,00±0,00Ac	95,56±9,94Aa	0,00±0,00Aa
0	0,1	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	11,11±15,71Aa	95,56±9,94Aa	55,56±13,61Ab
0	0,5	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	13,33±12,17Aab	73,33±9,94ABb	35,56±14,49Ab
0	1	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	6,67±6,09Abc	66,67±13,61ABb	40,00±23,04Ab
0,1	0	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	4,44±6,09Ac	95,56±9,94Aa	0,00±0,00Aa
0,1	0,1	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	57,78±14,49Ba	77,78±22,22ABab	46,67±12,17Ab
0,1	0,5	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	24,44±12,17Bab	57,78±24,09Bb	46,67±33,70Ab
0,1	1	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	15,56±9,94Bbc	62,22±21,66Bab	40,00±12,67Ab
0,5	0	0,00±0,00A	0,02 ± 0,04A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	22,22±11,11Bc	97,78±4,97Aa	0,00±0,00Aa
0,5	0,1	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	77,78±22,22Ba	57,78±19,88Bb	0,00±0,00Aa
0,5	0,5	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	53,33±14,49Bab	71,11±12,67ABab	62,22±12,67Ab
0,5	1	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	20,00±9,30Bbc	80,00±12,17ABab	57,78±12,17Ab
1	0	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	2,22±4,97Bc	97,78±4,97Aa	0,00±0,00Aa
1	0,1	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	75,56±16,48Ba	95,56±6,09Aa	57,78±21,37Ab
1	0,5	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	66,67±17,57Bab	88,89±7,86Aa	71,11±18,59Ab
1	1	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	0,00±0,00A	0,00 ± 0,00A	33,33±15,71Bbc	91,67±16,67Aa	63,89±5,56Ab

Para as variáveis RC e IN, letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferenças entre dosagens de ANA e letras minúsculas diferentes nas colunas denotam diferenças entre dosagens de BAP a nível de  $P = 0,05$  do teste de Tukey para os efeitos principais (interação não significativa)

Para a variável OX, letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferenças entre distintas dosagens de ANA sob a mesma concentração de BAP e letras minúsculas diferentes denotam diferenças entre distintas dosagens de BAP sob a mesma concentração de ANA a nível de  $P = 0,05$  do teste de Tukey para os efeitos simples (interação significativa)

Para as variáveis RR, NR, RG e NG letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferenças entre tratamentos a nível de  $P = 0,05$  do teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis



Tabela 3.2 - Médias e desvio padrão para as variáveis regeneração de raízes (RR), número de raízes adventícias por explante (NR), regeneração de gemas (RG), número de gemas por explante (NG), regeneração de calos (RC), oxidação (OX) e intumescimento (IN), avaliadas após 50 dias de cultura *in vitro* de hipocótilos de *E. dunnii* em meio basal EDM sob distintas dosagens de ANA e BAP

ANA	BAP	RR	NR	RG	NG	RC	OX
(mg L <sup>-1</sup> )		(%)	(número explante <sup>-1</sup> )	(%)	(número explante <sup>-1</sup> )	(%)	(%)
0	0	2,22 ± 4,97Aa	0,04 ± 0,09Aa	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Ab	95,56 ± 9,94Aa
0	0,1	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Ab	0,00 ± 0,00Ab	0,00 ± 0,00Aa	100,00 ± 0,00Aa
0	0,5	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Ab	0,00 ± 0,00Ab	2,22 ± 4,97Aab	100,00 ± 0,00Aa
0	1	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Aa	2,22 ± 4,97Aab	66,67 ± 13,61Bb
0,1	0	51,11 ± 9,94Bb	0,69 ± 0,14ABb	0,00 ± 0,00Ba	0,00 ± 0,00Aa	11,11 ± 19,25Bb	84,44 ± 23,04Aa
0,1	0,1	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Aa	11,11 ± 0,00Bb	0,51 ± 0,32Ab	95,56 ± 6,09Ba	71,11 ± 18,59ABa
0,1	0,5	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Aa	17,78 ± 6,09Bb	0,58 ± 0,46Ab	88,89 ± 0,00Bab	55,56 ± 17,57Aa
0,1	1	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Ba	0,00 ± 0,00Aa	66,67 ± 20,79Bab	60,00 ± 12,67Ba
0,5	0	57,78 ± 21,37Bb	0,96 ± 0,43Bb	0,00 ± 0,00Ba	0,00 ± 0,00Aa	64,44 ± 21,37Bb	91,11 ± 12,17Aa
0,5	0,1	2,22 ± 4,97Aa	0,04 ± 0,10Aa	20,00 ± 18,26Bb	0,64 ± 0,60Ab	95,56 ± 9,94Ba	24,44 ± 9,30Bb
0,5	0,5	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Aa	26,67 ± 16,85Bb	1,24 ± 1,19Ab	86,67 ± 9,30Bab	33,33 ± 7,86Bb
0,5	1	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Ba	0,00 ± 0,00Aa	84,44 ± 14,91Bab	51,11 ± 23,04Bb
1	0	71,11 ± 16,85Bb	1,20 ± 0,35Bb	0,00 ± 0,00Ba	0,00 ± 0,00Aa	82,22 ± 12,67Bb	100,00 ± 0,00Aa
1	0,1	11,11 ± 7,86Bab	0,22 ± 0,26Aab	17,78 ± 12,67Bb	0,31 ± 0,40Ab	95,56 ± 9,94Ba	55,56 ± 34,25ABb
1	0,5	0,00 ± 0,00Aa	0,00 ± 0,00Aa	6,67 ± 9,94Bb	0,16 ± 0,22Ab	75,56 ± 14,49Bab	80,00 ± 12,17Aab
1	1	0,00 ± 0,00Aa	0,11 ± 0,25Aa	6,67 ± 6,09Ba	0,13 ± 0,18Aa	66,67 ± 22,22Bab	95,56 ± 6,09Aab

Para as variáveis RG e RC letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferenças entre dosagens de ANA e letras minúsculas diferentes nas colunas denotam diferenças entre dosagens de BAP a nível de  $P = 0,05$  do teste de Tukey para os efeitos principais (interação não significativa)

Para a variável NG letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferenças entre dosagens de ANA e letras minúsculas diferentes nas colunas denotam diferenças entre dosagens de BAP a nível de  $P = 0,05$  do teste de Kruskal-Wallis para os efeitos médios

Para a variável NR letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferenças entre dosagens de ANA sob a mesma concentração de BAP e letras minúsculas diferentes nas colunas denotam diferenças entre dosagens de BAP sob a mesma concentração de ANA a nível de  $P = 0,05$  do teste de Kruskal-Wallis para os efeitos simples (interação significativa)

Para as variáveis RR e OX nas colunas, letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre distintas dosagens de ANA sob a mesma concentração de BAP e letras minúsculas diferentes denotam diferenças entre distintas dosagens de BAP sob a mesma concentração de ANA a nível de  $P = 0,05$  do teste de Tukey para os efeitos simples (interação significativa)

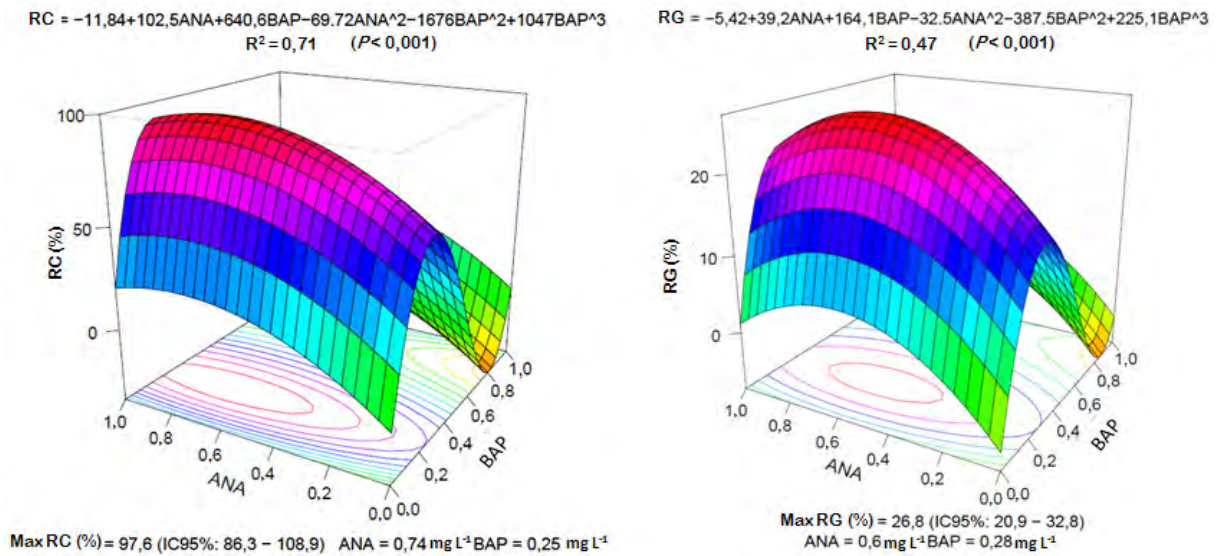


Figura 3.2 - Modelos de regressão múltipla representados em superfícies de resposta.  $R^2$ , valor de  $P$  e valores máximos de predição com intervalos de confiança (95%) para as variáveis RC em cotilédones (esquerda) e RG em hipocótilos (direita) de *E. dunnii*

As três espécies mencionadas são consideradas recalcitrantes ao enraizamento, contudo, estes resultados indicam que a competência para a rizogênese é elevada em material juvenil, ressaltando a importância da idade ontogênica nesta resposta assim como o potencial da aplicação das técnicas de cultura de tecidos para o rejuvenescimento de material adulto nestas espécies.

Independentemente dos níveis de ANA, as concentrações de BAP de 0,1 e 0,5 mg L<sup>-1</sup> se apresentaram adequadas para a indução da RG e maior NG, alcançando um máximo de 26,67% e 1,24 gemas explante<sup>-1</sup> no tratamento com a adição de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA e BAP (Tabela 3.2). Neste caso, o maior valor predito pela equação de regressão para RG foi 26,8% com dosagens de 0,59 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,28 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 3.2), semelhante aos níveis observados.

Em relação à regeneração de gemas para espécies temperadas de eucaliptos, Azmi et al. (1997) obtiveram boas respostas para *E. globulus* com dosagens de 0,2 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,01 mg L<sup>-1</sup> ou 1 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Para esta mesma espécie, Nugent et al. (2001) obtiveram elevadas taxas de regeneração cultivando calos sob concentrações de 1,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ANA, atingindo 46% dos calos com regeneração e 4,8 brotações explante<sup>-1</sup>. Entretanto, Bandyopadhyay et al. (1999) determinaram para *E. globulus* e *E. nitens* dosagens ótimas de BAP 0,5 mg L<sup>-1</sup> e ANA 1 mg L<sup>-1</sup> para a indução de calos organogênicos e BAP 1 mg L<sup>-1</sup> e ANA 0,5 mg L<sup>-1</sup> para a posterior organogênese desses calos, atingindo 13% de hipocótilos regenerantes. Semelhante aos resultados deste trabalho, em todos os casos

mencionados foi necessária a adição combinada de auxina e citocinina ao meio de cultura para induzir a organogênese, evidenciando a necessidade de reguladores exógenos para restabelecer a relação auxina/citocinina apropriada e assim redirecionar as vias de desenvolvimento.

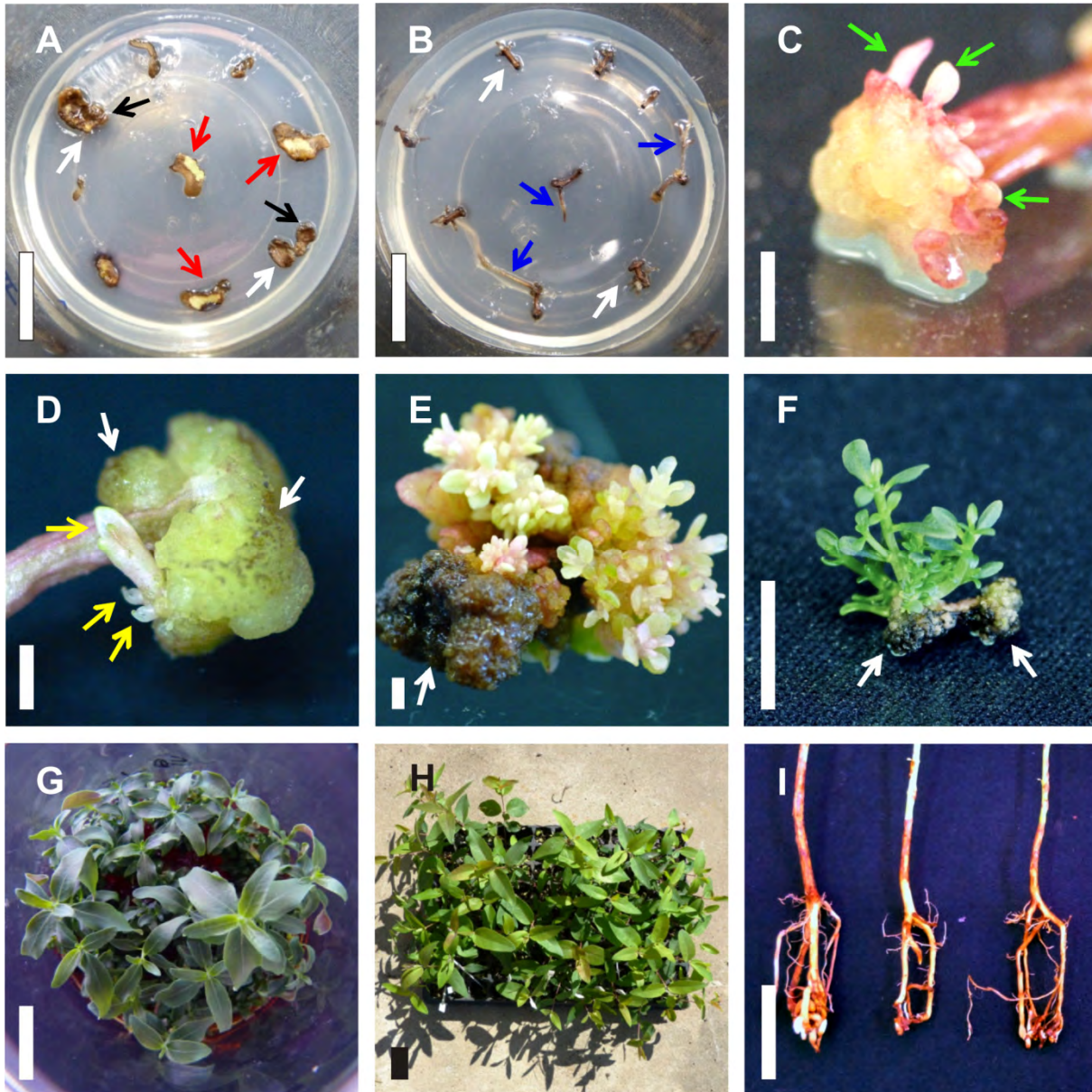


Figura 3.3 – Respostas morfológicas de explantes de *E. dunzii* em meio de cultura EDM sob distintas dosagens de ANA e BAP; (A) cotilédones intumescidos, com presença de calos e sintomas de oxidação; (B) segmentos de hipocótilos com raízes adventícias; (C) detalhe do extremo do hipocótilo após 21 dias de cultura evidenciando estruturas meristemáticas; (D) gemas em desenvolvimento em hipocótilos após 28 dias de cultivo; (E) hipocótilo com gemas desenvolvidas e calos oxidados nos extremos após 50 dias de cultivo. (F) Gemas regeneradas no meio EDM após 25 dias de cultura em meio EDMm; (G) brotações após sete subcultivos no meio EDMm; (H) Microplantas enraizadas de 70 dias de idade e (I) vista das raízes aos 90 dias de idade (raízes finas foram removidas). Barras = 2 cm em (A), (B), (F), (G), (H) e (I); 2 mm em (C), (D) e (E). Setas brancas = sintomas de oxidação; setas vermelhas = intumescimento; setas pretas = calos; setas azuis = raízes adventícias, setas verdes = estruturas meristemáticas e setas amarelas = gemas adventícias

Para a variável RG, o  $R^2$  da regressão foi intermediário (Figura 3.2), fato que pode ter sido causado pela variação introduzida pelo efeito do genótipo na expressão desta característica, (CHRISTIANSON; WARNICK, 1988; BRAVO et al., 2008; GEISS et al., 2010), a qual não foi caracterizada nos modelos de regressão por limitações do desenho experimental e será abordada no capítulo 5. Salienta-se que cada explante, dentro de cada parcela avaliada, representou a um genótipo distinto. Consequentemente, 26,6% dos genótipos regeneraram gemas e 71,1% deles regeneraram raízes nos melhores tratamentos (Tabela 3.2).

Para testar o efeito de distintas concentrações de AIA na organogênese, foi fixado o nível de BAP a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , considerada *a priori* como a concentração de maior potencial de resposta. Não foi detectada interação explante x meio de indução para as variáveis analisadas, portanto os testes de separação de médias foram conduzidos sobre os efeitos principais.

Semelhante ao observado quando empregado ANA como auxina, os segmentos de hipocótilos apresentaram maior potencial organogênico do que os cotilédones (Tabela 3.4). Foi possível induzir 3,7 % de RG nos cotilédones, porém, sem diferenças significativas com relação à testemunha, em decorrência do elevado desvio padrão (Tabela 3.5). A RC acompanhou o incremento dos níveis de AIA desde  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , atingindo um máximo de 87,04% com a dosagem de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  deste regulador. Ao mesmo tempo, os níveis de OX e INT diminuiram com a sua adição ao meio de cultura, favorecendo o desenvolvimento dos explantes (Tabela 3.5).

O intumescimento observado nos cotilédones está associado ao alongamento celular resultante da aplicação de citocininas (HUFF; ROSS, 1975; THOMAS et al., 1981), evento atribuível, nestes experimentos, ao efeito do BAP (Tabelas 3.1 e 3.5). Tanto esta resposta, como a ausência de regeneração de gemas foram observadas por Bandyopadhyay et al. (1999), em cotilédones de *E. globulus* cultivados em meio MS, quando em contato com o meio na face abaxial, semelhante a este experimento. Contudo, para a mesma espécie, Nugent et al. (2001), obtiveram regeneração de gemas, sem encontrar diferenças em função da disposição dos explantes. Estes autores mencionam a regeneração de gemas para este tipo de explantes, em *E. globulus*, sob várias combinações de thidiazuron (TDZ)  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  e auxinas, ou formação de calos organogênicos para *E. globulus* e *E. nitens* sob BAP  $0,5$  e ANA  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , fatos não comprovados neste trabalho.

A utilização de 2,4-D ou TDZ, assim como o subcultivo dos calos regenerados, para induzir organogênese indireta em um segundo estágio, poderiam ser alternativas factíveis para a obtenção de melhores resultados com este tipo de explantes.

Tabela 3.4 - Médias e desvio padrão para as variáveis regeneração de gemas (RG), número de gemas por explante (NG), regeneração de calos (RC), oxidação (OX) e intumescimento (IN), avaliadas após 50 dias de cultura *in vitro* de hipocótilos e cotilédones de *E. dunnii* em meio basal EDM sob distintas dosagens de AIA e BAP

Expl	RG (%)	NG (número explante <sup>-1</sup> )	RC (%)	OX (%)	IN (%)
Cotilédones	1,48 ± 3,84a	0,06 ± 0,21a	49,58 ± 34,93a	63,70 ± 29,02a	13,70 ± 19,50a
Hipocótilos	17,04 ± 16,95b	0,61 ± 0,53b	64,44 ± 36,02a	49,26 ± 33,23a	0,00 ± 0,00b

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças entre tratamentos a nível de  $P = 0,05$  do teste de comparações múltiplas de Kruskal Wallis para os efeitos principais

Tabela 3.5 - Médias e desvio padrão para as variáveis regeneração de gemas (RG), número de gemas por explante (NG), regeneração de calos (RC), oxidação (OX) e intumescimento (IN), avaliadas após 50 dias de cultura *in vitro* de cotilédones de *E. dunnii* em meio basal EDM sob distintas dosagens de AIA e BAP

Trat	AIA BAP (mg L <sup>-1</sup> )		RG (%)	NG (número explante <sup>-1</sup> )	RC (%)	OX (%)	IN (%)
	1	0,0	0,0	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	100,00 ± 0,00a
2	0,0	0,5	1,85 ± 4,54a	0,02 ± 0,05a	29,63 ± 9,07ab	74,07 ± 13,46ab	40,74 ± 15,18b
3	0,1	0,5	1,85 ± 4,54a	0,04 ± 0,09a	53,70 ± 25,74abc	62,96 ± 18,14ab	18,52 ± 21,85ab
4	0,5	0,5	3,70 ± 5,74a	0,24 ± 0,45a	77,55 ± 13,84bc	48,15 ± 31,95b	3,70 ± 9,07a
5	1,0	0,5	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	87,04 ± 8,36c	33,33 ± 15,71b	5,56 ± 9,30ab

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças entre tratamentos a nível de  $P = 0,05$  do teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis para os efeitos principais

Para os hipocótilos, as respostas encontradas foram semelhantes às observadas quando o ANA foi usado como auxina. Foi induzida a RG em todos os tratamentos adicionados com AIA, a maior resposta foi observada no tratamento adicionado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA apresentando 27,8 % de explantes regenerados e 0,99 gemas explante<sup>-1</sup> (Tabela 3.6). A variável OX foi inversamente proporcional a organogênese dos explantes e não foi observado intumescimento dos segmentos de hipocótilos.

Tabela 3.6 - Médias e desvio padrão para as variáveis regeneração de gemas (RG), número de gemas por explante (NG), regeneração de calos (RC), oxidação (OX) e intumescimento (IN), avaliadas após 50 dias de cultura *in vitro* de hipocótilos de *E. dunnii* em meio basal EDM sob distintas dosagens de AIA e BAP

Trat	AIA BAP (mg L <sup>-1</sup> )		RG (%)	NG (número explante <sup>-1</sup> )	RC (%)	OX (%)
	1	0,0	0,0	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a
2	0,0	0,5	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	22,22 ± 9,94a	100,00 ± 0,00a
3	0,1	0,5	16,67 ± 6,09ab	0,72 ± 0,54ab	74,07 ± 21,85ab	42,59 ± 25,74ab
4	0,5	0,5	27,78 ± 19,56b	0,99 ± 0,45b	81,48 ± 11,48ab	22,22 ± 14,05b
5	1,0	0,5	14,81 ± 11,48ab	0,56 ± 0,36ab	88,89 ± 12,17b	22,22 ± 9,94b

Letras diferentes nas colunas indicam diferenças entre tratamentos a nível de  $P = 0,05$  do teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis

Embora a utilização do AIA na organogênese em várias espécies de eucalipto tenha tido sucesso em estudos iniciais (KITAHERA; CALDAS, 1975; LAKSHMI SITA, 1979; BENNETT; McCOMB, 1982; ARYA; SHEKHAWAT, 1986), torna-se difícil encontrar estudos mais recentes do seu uso na organogênese de *Eucalyptus*, sendo o AIA substituído pelas auxinas sintéticas mais estáveis ANA e 2,4 D (SRIVASTAVA, 2002). Contudo, os resultados encontrados neste estudo demonstraram que o AIA pode ser utilizado como uma alternativa ao ANA na regeneração de gemas em segmentos de hipocótilos de *E. dunnii*.

Tabela 3.7 – Médias e desvios padrão para as variáveis RG, NG e RC nos segmentos de hipocótilos na posição distal e proximal

Posição	RG (***)	NG (***)	RC (ns)
Distal	0,275 ± 0,447	0,922 ± 1,942	0,817 ± 0,387
Proximal	0,156 ± 0,363	0,500 ± 1,372	0,775 ± 0,418

ns = não significativo, \*\*\* = significativo  $P < 0,001$  para regressão linear logística (RG e RC) ou quasipoisson (NG)

Ambas as seções dos hipocótilos regeneraram gemas, 27,5% dos segmentos distais (0,275 de incidência) e 15,6% dos segmentos proximais (0,156 de incidência). O efeito da posição do explante foi altamente significativo para RG ( $P < 0,001$ ) e NG ( $P < 0,001$ ), porém, sem efeito para RC ( $P = 0,166$ ) (Tabela 3.7). Níveis maiores de regeneração de gemas em seções distais de hipocótilos foram encontrados em varias espécies, *E. grandis* (BRAVO, 2005), *Glycine canescens* (KAMEYA; WIDHOLM, 1981), *Capsicum annum* (FARÍ; CZAKÓ, 1981; ARROYO; REVILLA, 1991), *Brassica carinata* (YANG; JIA; PUA, 1991), *Morus multicaulis* (XI-LING et al., 2011). Isto é atribuído ao fato que os segmentos próximos do meristema apical apresentam maior conteúdo de auxinas e, as seções basais, maior conteúdo de citocininas (FARÍ; CZAKÓ, 1981; OKUBO; WADA; UEMOTO, 1991), portanto, é possível que a combinação de gradientes hormonais endógenos e exógenos foi a que, em última instância, determinou a resposta organogênica. Ao mesmo tempo, gradientes nutricionais deveriam ser considerados, desde que os segmentos distais estão mais próximos aos cotilédones, órgãos de reserva destas substâncias, e os proximais, ao meio de cultura.

Neste estudo, foi constatado o maior potencial organogênico dos hipocótilos em relação aos cotilédones, fato já determinado para espécies relacionadas como *E. globulus* e *E. nitens* (AZMI et al., 1997; NUGENT et al., 2001), mesmo para *E. urophylla* (TIBOK et al., 1995). Por outro lado, embora as dosagens determinadas neste trabalho como apropriadas para induzir regeneração de gemas em *E. dunnii* não sejam muito diferentes das encontradas na literatura para outras espécies temperadas, estes resultados apresentam maior coincidência

com estudos para *E. urophylla* e *E. grandis* (TIBOK et al., 1995; BRAVO, 2005). Neste sentido, é presumível que as condições nutricionais promovidas pelo meio basal EDM tenham provocado uma maior eficiência dos reguladores de crescimento nos hipocótilos de *E. dunnii*, dispensando dosagens maiores assim como a necessidade de empregar fases intermediárias de indução de calos.

Por outro lado, vale ressaltar que a oxidação fenólica dos explantes não representou um obstáculo para a organogênese nos hipocótilos, evidenciando que a combinação de reguladores de crescimento e o meio basal se mostra apropriada para este objetivo. Possivelmente, uma maior atividade celular nos explantes com atividade organogênica tenha ocasionado uma maior produção de antioxidantes endógenos, como o ácido ascórbico e enzimas desintoxicantes, minimizando os efeitos negativos das EROs. Por outro lado, o baixo nível de ferro no meio basal EDM que provoca a clorose dos explantes (Figura 3.4 C, D e E), já destacado no capítulo anterior, não foi um impedimento para atingir a regeneração de gemas e/ou diminuir os níveis de oxidação.

### 3.3.2 Análise histológica da organogênese

As observações aos sete dias de cultura no meio de indução evidenciaram que tanto as células epidérmicas como as subepidérmicas retomaram a atividade meristemática, dando origem a estruturas polarizadas em regiões com proliferação de calo (Figuras 3.4 B, C, D, E e F). Nas mesmas regiões, aos 14 dias foram observados meristemóides subepidérmicos e áreas meristemáticas superficiais (Figuras 3.4 G e H).

Após 21 dias de cultura, começaram a ser evidentes gemas com primórdios foliares nos extremos dos segmentos de hipocótilos, observadas tanto a nível micro como macroscópico (Figuras 3.3 C, D e 3.4 I).

Entretanto, em estágios mais avançados (28 dias) novas áreas meristemáticas e meristemoides continuaram a se desenvolver a partir dos calos regenerados nos extremos dos segmentos de hipocótilos (Figuras 3.5 A e B), assim como as gemas previamente diferenciadas (Figura 3.5 C). Ao mesmo tempo, começou a ser evidente a produção e acúmulo de substâncias fenólicas nas células dos calos dos hipocótilos (Figuras 3.5 E e F), coincidindo com a aparição de sintomas de oxidação externos (Figura 3.3 D). Estes eventos estão correlacionados, uma vez que o escurecimento é geralmente causado pelas quinonas, produto da oxidação pela polifenoloxidase das substâncias fenólicas acumuladas nas células (ROBARDS et al., 1999). Diante disso, e considerando que tanto as gemas como as estruturas meristemáticas que as originam já têm sido induzidas, seria conveniente retirar os explantes

do meio de indução aos 25 - 30 dias de cultura para iniciar o processo de multiplicação das gemas, minimizando, deste modo, a senescência dos explantes por estresse oxidativo.

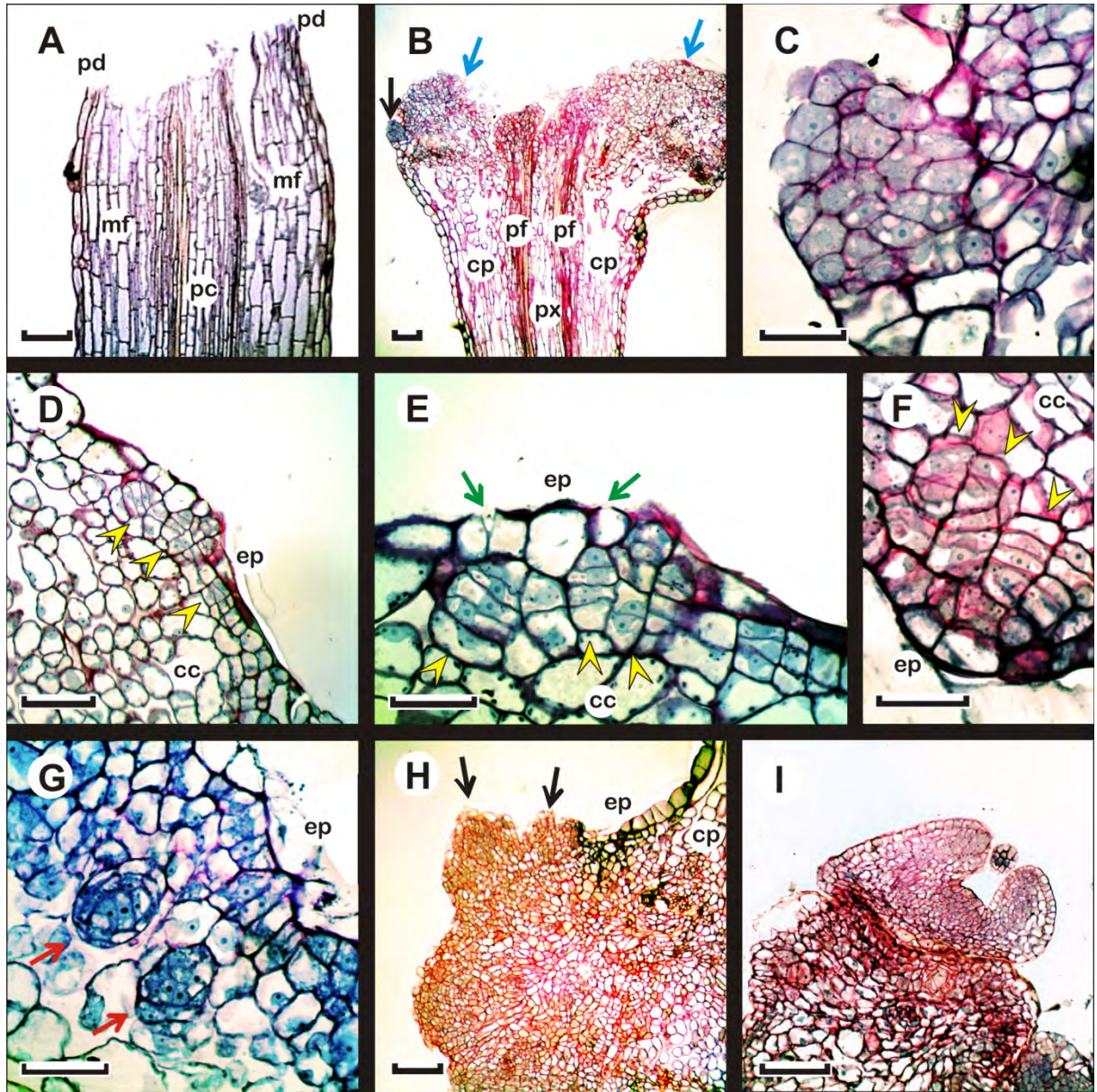


Figura 3.4 - Vistas dos cortes histológicos longitudinais em segmentos de hypocótilos de *E. dunnii* corados com PAS-NBB. Dia zero: A) extremo distal do explante. Dia sete: B) calo formado no extremo distal com grupo de células meristemáticas; C) detalhe da área meristemática em (B); D) conjunto de células epidérmicas e subepidérmicas em ativa divisão; E) detalhe das células subepidérmicas em ativa divisão e evidente polarização visualizadas em (D); F) detalhe de células epidérmicas e subepidérmicas em ativa divisão no extremo proximal. Dia 14: G) meristemóides subepidérmicos no extremo distal; H) calo formado no extremo proximal apresentando uma zona meristemática. Dia 21: I) gema advéncia com primórdios foliares diferenciada no extremo distal. Setas vermelhas = meristemóides; setas pretas = agrupamento de células meristemáticas; setas verdes = células epidérmicas evidenciando interrupção da continuidade; setas azuis = calos nos extremos dos segmentos de hypocótilos; pontas de seta amarelas = células em divisão e polarização. Barras em A, B, H, = 200  $\mu$ m; C, E, F e G = 50  $\mu$ m; D e I = 100  $\mu$ m. pd = protoderme; mf = meristema fundamental; pc = procâmbio; cc = células regeneradas nos calos; cp = células parenquimáticas do córtex; pf = protofloema; px = protoxilema; ep = epiderme



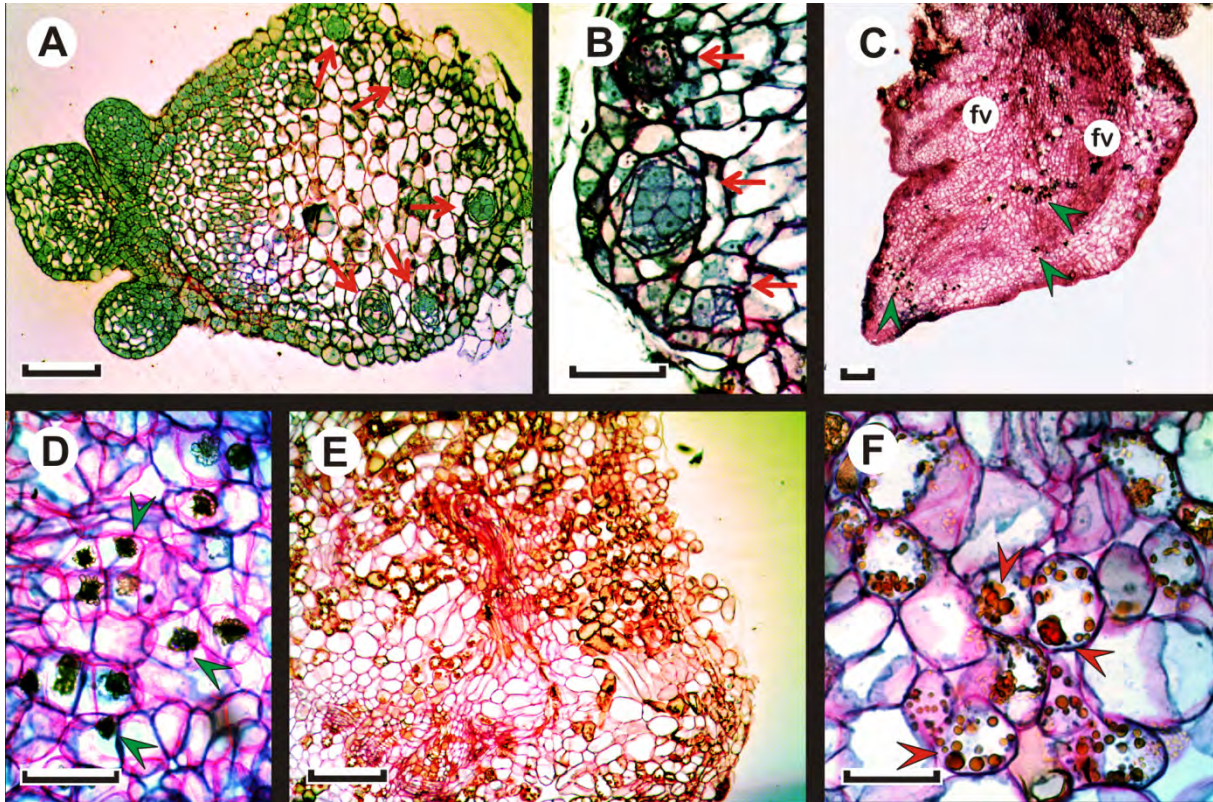


Figura 3.5 - Vistas dos cortes histológicos longitudinais em segmentos de hypocótilos de *E. dunnii* corados com PAS-NBB aos 28 dias de cultura em meio basal EDM: A) porção de calo do extremo proximal com áreas meristemáticas e meristemóides subepidérmicos; B) detalhe dos meristemóides em (A); C) corte transversal de uma gema desenvolvida no extremo proximal, com dois primórdios foliares; D) detalhe das drusas em (C); E) vista de calo do segmento distal evidenciando áreas de maior atividade meristemática e acúmulo de substâncias fenólicas e F) detalhe das células do calo com acúmulo de fenóis em (E). Setas vermelhas = meristemóides; pontas de seta vermelhas = fenóis; pontas de seta verdes = drusas. Barras em A e E = 100  $\mu$ m; C = 200  $\mu$ m; B, D e F = 50  $\mu$ m

Os cortes realizados nos hypocótilos amostrados sugerem que cada meristemóide pode ter sido originado de só uma célula subepidérmica (Figura 3.4 D, E e F). Mesmo assim, pode-se considerar que as brotações adventícias se desenvolveram via organogênese indireta (Figura 3.4 I e 3.5 C), uma vez que todas as estruturas meristemáticas observadas foram regeneradas nos extremos dos explantes, áreas de regeneração ativa de calos (Figura 3.4 B, C, E, F, G, H e 3.5 A e B). Provavelmente, as áreas de regeneração de calos criaram o nicho apropriado para o desenvolvimento de células pluripotentes caracterizadas pelas divisões assimétricas, produto da adequada sinalização e o suporte físico que redefiniram as vias de desenvolvimento (SCHERES, 2007; DE SMET; BEECKMAN, 2011).

Foi percebida a aparição de uma grande quantidade de drusas nas brotações de 28 dias de idade (Figura 3.5 C e D). As drusas são cristais de oxalato de Ca de ocorrência normal em muitas dicotiledôneas (PRYCHID; RUDALL, 1999), porém, existem estudos que associam o acúmulo destes cristais com um excesso de Ca ou de ácido oxálico nos tecidos. Este último

pode ser originado na redução do nitrato (LIBERT; FRANCESCHI, 1987; FINK, 1991) ou na oxidação do etileno nos tecidos das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Por outro lado, um hipotético excesso de Ca só poderia ser atribuído ao meio de cultura, contudo, o teor de Ca do meio basal EDM não se mostra excessivo quando comparado com outros meios (Anexo D). Estas possibilidades deveriam ser estudadas em futuras pesquisas, dado que todos eles são fatores de grande relevância na propagação *in vitro* de plantas.

### 3.3.3 Enraizamento

As brotações advindas das gemas regeneradas dos hipocótilos e multiplicadas no meio EDMm (Figura 3.3 F e G) apresentaram boas taxas de enraizamento, considerando os resultados obtidos previamente para o material *in vitro* da espécie (GRAÇA, 1997; BILLARD; LALLANA, 2005; NAVROSKI, 2011).

Segundo os modelos de regressão logística, a aplicação do AIB não apresentou um efeito significativo ( $P = 0,5$ ) atingindo em média 47,4 % de brotações enraizadas. Por outro lado, o incremento das concentrações do ANA afetou negativamente ao ER ( $P < 0,001$ ), onde a ausência do regulador (55,5%) e dosagens de  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  (66,6%) e  $3 \text{ g L}^{-1}$  (62,6%) forneceram os melhores resultados (Figura 3.6).

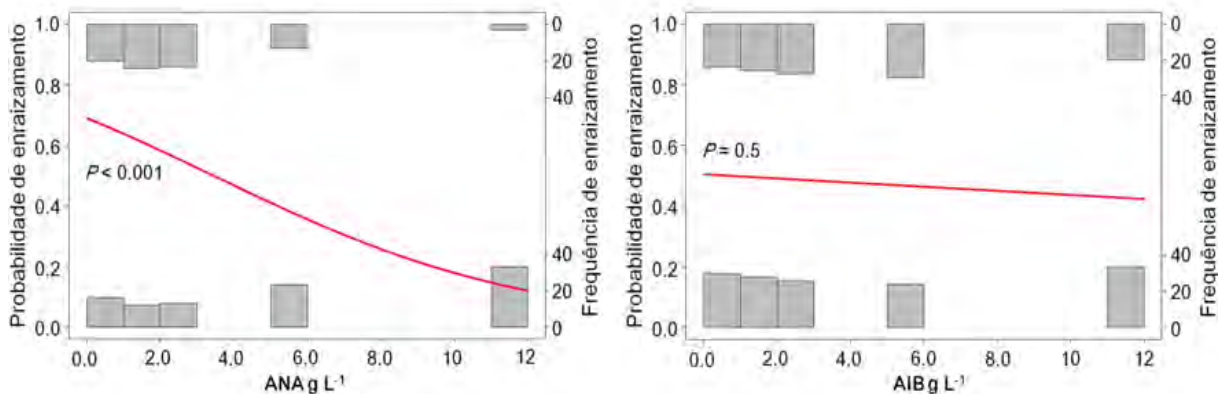


Figura 3.6 - Frequências de enraizamento *ex vitro* nas barras e regressão logística em microestacas de *E. dunnii* para as dosagens testadas de ANA (esquerda) e AIB (direita), avaliada aos 70 dias do início do experimento

Em condições semelhantes, Brondani et al. (2011) citaram 22,2% de sobrevivência na saída da casa de sombra para dois clones híbridos de *E. benthamii* x *E. dunnii*, sem efeito significativo da aplicação de AIB. Entretanto que, para dois clones de *E. benthamii*, foi determinada 76% de sobrevivência após aclimatização, sem aplicação de reguladores de

crescimento (BRONDANI et al., 2012b). De forma similar, neste estudo, ficou evidente que a aplicação de AIB não apresenta efeitos significativos e que o incremento das dosagens de ANA afeta negativamente ao enraizamento *ex vitro* de microestacas de *E. dunnii*.

A formação de calos externos afeta negativamente a qualidade do sistema radicular, assim como a estabilidade e continuidade das conexões vasculares (BALTIERRA et al., 2004; BRONDANI et al., 2012a), prejudicando o desenvolvimento das plantas produzidas (ŠTEFANČIČ; ŠTAMPAR; OSTERC, 2005). Além do sucesso restrito, o enraizamento *in vitro* de *E. dunnii* induz a presença de calos na base dos explantes (BILLARD; LALLANA, 2005; NAVROSKI, 2011). Em contrapartida, nenhuma das microplantas avaliadas neste experimento apresentaram calos visíveis na área de origem das raízes (Figura 3.4 H e I), conforme os resultados do enraizamento *ex vitro* de *E. benthamii* (BRONDANI et al., 2012b).

Foi comprovado que o enraizamento *ex vitro* representa uma alternativa viável ao enraizamento *in vitro*, sendo mais simples, menos oneroso e apto para produzir plantas com sistema radicular de boa qualidade (XAVIER; OTONI, 2009; BRONDANI et al., 2012b).

Em geral, estes resultados constituem a primeira referência conhecida de regeneração de plantas via organogênese *in vitro* para *E. dunnii*, estágio essencial para a aplicação da maioria dos métodos de transformação genética de plantas (RAO et al., 2009; LABATE et al., 2009; GIRIJASHANKAR, 2011), validando a metodologia empregada para o desenvolvimento do meio basal EDM, empregado com sucesso em todas as etapas de cultura *in vitro*. Ao mesmo tempo, a disponibilidade de um meio basal adequado para a regeneração e multiplicação de material juvenil, encoraja o seu uso na micropropagação de indivíduos adultos de *E. dunnii*, pois representa a técnica de propagação *in vitro* rotineira para o rejuvenescimento de genótipos superiores de eucaliptos (XAVIER; SILVA, 2010).

### 3.4 Conclusões

- O tipo de explante utilizado tem um efeito determinante na obtenção da organogênese de *E. dunnii*, resultando os segmentos de hipocótilos os de maior competência para a regeneração de gemas.
- As combinações de auxinas e citocininas nas dosagens de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA e BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA e BAP induzem a maior quantidade de explantes regenerados e o maior número de gemas, minimizando a oxidação dos explantes.
- A topófise nos segmentos de hipocótilos afeta a regeneração e o número de gemas, sendo os segmentos distais os que apresentam maior competência para a organogênese.

- A aplicação de AIB veiculado em pó nas concentrações testadas não afeta o enraizamento *ex vitro* de microestacas de *E. dunnii*.
- O incremento das concentrações do ANA veiculado em pó afeta negativamente o enraizamento *ex vitro* de microestacas de *E. dunnii*.
- O meio basal EDM se mostra adequado para a regeneração de plantas de *E. dunnii* através da organogênese em segmentos de hipocótilos.
- O meio basal EDMm se mostra adequado para a multiplicação e alongamento de brotações juvenis de *E. dunnii*.
- A regeneração de gemas foi obtida por via indireta e foi apenas evidenciada nos extremos dos segmentos de hipocótilos.

## Referências

ABARCA, D.; DÍAZ-SALA, C. Reprogramming adult cells during organ regeneration in forest species. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 4, n. 8, p. 793-795, 2009.

ARROYO, R.; REVILLA, M.A. *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 10, n. 8, p. 414-416, 1991.

ARYA, H.C.; SHEKHAWAT, N.S. Clonal multiplication of tree species in the Thar desert through tissue culture. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 16, n. 1/4, p. 201-208, 1986.

AZMI, A.; NOIN, M.; LANDRE, P.; PROUTEAU, M.; BOUDET, A. M.; CHRIQUI, D. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. hypocotyls: ontogenesis and ploidy level of the regenerants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 9-16, 1997.

BALTIERRA, X.C.; MONTENEGRO, G.; GARCÍA, E. Ontogeny of *in vitro* rooting processes in *Eucalyptus globulus*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 499–503, 2004.

BANDYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSSEN, G.; HAMILL, J. D. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species - *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Plant Science**, Limerick, v. 140, n. 2, p. 189-198; 1999.

BARRUETO CID, L.P.; TEIXEIRA, J.B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: BARRUETO CID, L.P. (Org.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 50-66.

BARRUETO CID, L.P.; MACHADO, A.C.M.; CARVALHEIRA, S.R.C.; BRASILEIRO, A.C.M. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 56, n. 1, p. 17-23, 1999.

BARRY-ETIENNE, D.; BERTRAND, B.; VÁSQUEZ, N.; ETIENNE, H. Comparison of somatic embryogenesis-derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex vitro* conditions: morphological, mineral and water characteristics. **Annals of Botany**, Exeter, v. 90, n. 1, p. 77–85, 2002.

BENNETT, I.J.; MCCOMB, J.A. Propagation of jarrah (*Eucalyptus marginata*) by organ and tissue culture. **Australian Forestry Research**, Canberra, v. 12, n. 2, p. 121-127, 1982.

BILLARD, C. E.; LALLANA, V.H. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, Curitiba, v. 16, n. 30, p. 199-216, 2005. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14503008>>. Acesso em: 08 fev. 2014.

BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice**. Amsterdam: Elsevier, 1996. 767 p.

BONGA, J.M., ADERKAS P. von. Rejuvenation of tissues from mature conifers and its implications for propagation *in vitro*. In: AHUJA, M.R.; LIBBY, W.J. (Ed.). **Clonal forestry I, genetics and biotechnology**. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1993. p. 182–199.

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistics Society. Series B (Methodological)**, London, v. 26, n. 2, p. 211–234, 1964.

BRAVO, V.C.D. **Controle genético e histogênese na regeneração de progênies de *Eucalyptus grandis* *in vitro***. 2005. 80 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11150/tde-16112005-165649/>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

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

BREDMOSE, N.; HANSEN, J. Topophysis affects the potential of axillary bud growth, fresh biomass accumulation and specific fresh weight in single-stem roses (*Rosa hybrida* L.). **Annals of Botany**, Exeter, v. 78, n. 2, p. 215-222, 1996.

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

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; HANSEL, F.A.; ARAÚJO, M.A. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum. Agronomy** Maringá, v. 33, n. 4, p. 655-663, 2011.

BRONDANI, G.E.; BENEDINI BACCARIN, F.J.; WIT ONDAS, H.W.; STAPE, J.L.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Low temperature, IBA concentrations and optimal time for adventitious rooting of *Eucalyptus benthamii* mini-cuttings. **Journal of Forestry Research**, Harbin, v. 23, n. 4, p. 583-592, 2012b.

CASSELS, A.C.; CURRY, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 64, n. 2/3, p. 145-157, 2001.

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **Hortscience**, Alexandria, v. 23, n. 3, p. 515-519, 1988.

COOPER, W.C. Hormones in relation to root formation on stem cuttings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 10, n. 4, p. 789-794, 1935.

CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido**. 1993. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

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

DAY, M.; GREENWOOD, M.S.; DÍAZ-SALA, C. Age-and size-related trends in woody plant shoot development: regulatory pathways. **Tree Physiology**, Oxford, v. 22, n. 8, p. 507-513, 2002.

DE KLERK, G.J.; TER BRUGGE, J.; MARINOVA, S. Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* 'Jork 9'. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 49, n. 1, p. 39-44, 1997.

DE SMET, I.; BEECKMAN, T. Asymmetric cell division in land plants and algae: the driving force for differentiation. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, London, v. 12, n. 3, p. 177-188, 2011.

DIBAX, R. ; QUISEN, R. C. ; BONA, C. ; QUOIRIN, M. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and histological study of organogenesis *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 311-318, 2010.

DIBAX, R.; EISFELD, C.L.; CUQUEL, F.; KOEHLER, H.; QUOIRIN, M. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 62, n. 4, p. 406-412, 2005.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 58, n. 1, p. 49-59, 2009.

FÁRI, M.; CZAKÓ M. Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyls explants cultured *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 207-213, 1981.

FINK, S. The micromorphological distribution of bound calcium in needles of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). **New Phytologist**, Lancaster, v. 119, n. 1, p. 33-40, 1991.

FISHER, D.B. Protein staining of ribboned epon section for light microscopy.

**Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 16, n. 1, p. 92-96, 1968.

GAMBORG, O.L.; MURASHIGE, T.; THORPE, T.A.; VASIL, J.K. Plant tissue culture media. **In vitro**, New York, v. 12, n. 7, p. 473-478, 1976.

GEISS, G.; GUTIERREZ, L.; BELLINI, C. Adventitious root formation: new insights and perspectives. In: BEECKMAN, T. (Ed.). **Root development**. Oxford: Blackwell, 2010. p. 127-156.

GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: part 2: in practice**. Basingstoke: Exegetics 1996. 574 p.

GIRIJASHANKAR, V. Genetic transformation of eucalyptus. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, Lucknow, v. 17, n. 1, p. 9-23, 2011.

GLOCKE, P.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. 6-Benzylamino purine stimulates *in vitro* shoot organogenesis in *Eucalyptus erythronema*, *E. stricklandii* and their interspecific hybrids. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 109, n. 4, p. 339-344, 2006.

GONÇALVES, J.C.; DIOGO, G.; AMÂNCIO, S. *In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*): effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 72, n. 3/4, p. 265-275, 1998.

GRAÇA, M.E.C. **Enraizamento *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii* utilizando altas concentrações de auxinas**. Colombo: EMBRAPA, CNPF, 1997. 3 p. (Pesquisa em Andamento, 48).

HATZILAZAROU, S.P.; SYROS, T.D.; YUPSANIS, T.A.; BOSABALIDIS, A.M.; ECONOMOU, A.S. Peroxidases, lignin and anatomy during *in vitro* and *ex vitro* rooting gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) microshoots. **Journal of Plant Physiology**, Philadelphia, v. 163, n. 8, p. 827-836, 2006.

HUANG, Z.C.; ZENG, F.H.; LU, X.Y. Efficient regeneration of *Eucalyptus urophylla* from seedling-derived hypocotyls. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 1, p. 131-134, 2010.

HUFF, A.K.; ROSS, C.W. Promotion of radish cotyledon enlargement and reducing sugar content by zeatin and red light. **Plant Physiology**, Rockville, v. 56, n. 3, p. 429-433, 1975.

HUNG, C.D.; TRUEMAN, S.J. Topographic effects differ between node and organogenic cultures of the eucalypt *Corymbia torelliana* x *C. citriodora*. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, Dordrecht, v. 104, n. 1, p. 69-77, 2011.

KAMEYA, T.; WIDHOLM, J. Plant regeneration from hypocotyl sections of *Glycine* species. **Plant Science Letters**, Dordrecht, v. 21, n. 3, p. 289-294, 1981.

KARNOVSKI, M.J.A. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, n. 2, p. 137-138, 1965.

KITAHARA, E.H.; CALDAS, L.S. Shoot and root formation in hypocotyl callus cultures of *Eucalyptus*. **Forestry Science**, Bethesda, v. 21, n. 3, p. 242-243, 1975.

LABATE, C.A.; DE ASSIS, T.F.; ODA, S.; DE MELLO, E.J.; GONZÁLEZ, E.R.; ZAUZA, E.A.V.; MORI, E.S.; DE MORAES, M.L.T.; CID, L.P.B.; ALFENAS, A.C., FOELKEL, C.; MOON, D.H.; DE CARVALHO, M.C.D.C.G.; CALDAS, D.G.G.; CARNEIRO, R.T.; DE ANDRADE, A.; SALVATIERRA, G.R. *Eucalyptus*. In: KOLE, C.; HALL, T.C. (Ed.). **Compendium of transgenic crop plants**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009. p. 35-108.

LAKSHMI SITA, G. Morphogenesis and plant regeneration from cotyledonary cultures of *Eucalyptus*. **Plant Science Letters**, Dordrecht, v. 14, n. 1, p. 63-68, 1979.

LE ROUX, J.J.; VAN STADEN, J. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus*-a review. **Tree Physiology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 435-477, 1991.

LIBERT, B.; FRANCESCHI, V.R. Oxalate in crop plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 35, n. 6, p. 926-938, 1987.

LLOYD, G.; MCCOWN, B.H. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagation Society**, Ashville, v. 30, p. 421-427, 1980.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1995. 889 p.

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

MOHAMMED, G.H.; VIDAVER, W.E. The influence of acclimatization treatment and plantlet morphology on early greenhouse performance of tissue-cultured Douglas fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 21, n. 2, p. 111-117, 1990.

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

NAVROSKI, M. C. **Multiplicação *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2011. 101 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

NUGENT, G.; CHANDLER, S.F.; WHITEMAN, P.; STEVENSON, T.W. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus* Labill. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 37, n. 3, p. 388-391, 2001.



OKUBO, H.; WADA, K.; UEMOTO, S. *In vitro* morphogenetic response and distribution of endogenous plant hormones in hypocotyl segments of snapdragon (*Antirrhinum majus* L). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 10, n. 10, p. 501–504, 1991.

OLESEN, P.O. On cyclophysis and topophysis. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 27, n. 5, p. 173-178, 1978.

OLIVEIRA, Y.; GOMES ADAMUCHIO, L.; OLIVEIRA, C.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; GERHARDT, I.; BESPALHOK, J.C.F.; DIBAX, R.; QUOIRIN, M. Indirect organogenesis from leaf explants of *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* and shoot multiplication. **BMC Proceedings**, London, v. 5, n. 7, p. 145, 2011.

PEER, K.R.; GREENWOOD, M.S. Maturation, topophysis and other factors in relation to rooting in *Larix*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 267–272, 2001.

PIERIK, R.L.M. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht: Kluwer, 1997. 348 p.

PREECE, J. Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. In: GEORGE E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G-J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 403-422.

PRYCHID, C.J.; RUDALL, P.J. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematic. **Annals of Botany**, London, v. 84, n. 6, p. 725–739, 1999.

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 05 maio 2013.

RANIERI, A.; CASTAGNA, A.; BALDAN, B.; SOLDATINI, G.F. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 354, p. 25–35, 2001.

RAO, A.Q.; BAKHSH, A.; KIANI, S.; SHAHZAD, K.; SHAHID, A.A.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. The myth of plant transformation. **Biotechnology Advances**, Philadelphia, v. 27, n. 6, p. 753-763, 2009.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, Philadelphia, v. 66, n. 4, p. 401–436, 1999.

SCHERES, B. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 8, n. 5, p. 345–354, 2007.

SCHWARZ, G.E. Estimating the dimension of a model. **Annals of Statistics**, Philadelphia, v. 6, n. 2, p. 461–464, 1978.

ŠTEFANČIČ, M.; ŠTAMPAR, F.; OSTERC, G. Influence of IAA and IBA on root development and quality of *Prunus* “GiSela 5” leafy cuttings. **Horticultural Science**, Praha, v. 40, n. 7, p. 2052–2055, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4<sup>th</sup> ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2006. 705 p.

TERMIGNONI, R.R. **Clonagem de plantas adultas selecionadas de *Eucalyptus* spp. pelo processo de regeneração *in vitro* pro embriogênese somática**. Depositário: Universidade Federal do Rio Grande do Sul: patente de invento do processo, 1998. Inventor: Profa. Dra. Regina Ramos Termignoni. Patent No. PI 9801485-4 INPI.

TERMIGNONI, R.R.; WANG, P.; HU, C. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 45, n. 2, p. 129-132, 1996.

THOMAS, J.; ROSS, C.W.; CHASTAIN, C.J.; KOOMANOFF, W.; HENDIX, J.E.; VAN VOLKENBURGH, E. Cytokinin-induced wall extensibility in excised cotyledons of radish and cucumber. **Plant Physiology**, Rockville, v. 68, n. 1, p. 107–110, 1981.

TIBOK, A.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Optimised plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. **Plant Science**, Limerick, v. 110, n. 1, p. 139-145, 1995.

VALLEDOR, L.; MEIJON, M.; HASBUN, R.; JESUS CAÑAL, M.; RODRIGUEZ, R. Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of *in vitro* organogenic capability. **Journal of Plant Physiology**, Philadelphia, v. 167, n. 5, p. 351–357, 2010.

VALLEDOR, L.; HASBUN, R.; MEIJON, M.; RODRIGUEZ, J.L.; SANTAMARIA E.; VIEJO, M.; BERDASCO, M.; FEITO, I.; FRAGA, M.F.; CANAL, M.J.; RODRIGUEZ, R. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 91, n. 2, p. 75–86, 2007.

VASIL, I.K. A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 27, n. 9, p. 1423-40, 2008.

XAVIER, A.; OTONI, R.L. Aplicações da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía costarricense**, San Jose, v. 33, n. 2, p. 303-307, 2009.

XAVIER, A.; SILVA, R.L. Evolução da silvicultura clonal de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**, San José, v. 34, n. 1, p. 93-98, 2010.

XI-LING, W.; JIN-XING, Z.; MAO-DE, Y.; ZHEN-GANG, L.; XIAO-YUN, J.; QI-YOU, L. Highly efficient plant regeneration and *in vitro* polyploid induction using hypocotyl explants from diploid mulberry (*Morus multicaulis* Poir.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 47, n. 3, p.434–440, 2011.

YANG, M.Z.; JIA, S.R.; PUA, E.C. High Frequency of plant regeneration from hypocotyl explants of *Brassica carinata* A. Br. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 24, n. 2, p. 79-82, 1991.

ZIMMERMAN, P.W.; WILCOXON, F. Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. **Contributions from Boyce Thompson Institute**, Ithaca, v. 7, p. 209–229, 1935.



## 4 ESTADO NUTRICIONAL E RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus dunnii*

### Resumo

A modulação das respostas morfogênicas de um determinado genótipo na cultura de tecidos pode ser governada basicamente por duas formas, a nutrição mineral e os reguladores de crescimento. Na micropropagação, esta possibilidade vai depender de um frágil equilíbrio entre os distintos componentes do meio de cultura. Apenas uma apropriada eleição do meio basal pode levar ao sucesso ou ao fracasso da aplicação desta técnica, uma vez que o meio é o responsável de prover as condições nutricionais para que os órgãos/tecidos se desenvolvam. Embora os meios basais JADS, MS e WPM sejam os mais empregados na cultura de tecidos de eucaliptos, estes não tem tido muito sucesso na micropropagação de *E. dunnii*. As respostas morfofisiológicas obtidas nestes meios basais, podem ser atribuídas ao fato de que suas composições geram condições nutricionais diferentes para o desenvolvimento das brotações. Tentar reconhecê-las, compreendê-las e associá-las, pode contribuir para a otimização dos meios basais empregados na micropropagação de *E. dunnii*. Para isto, foram avaliadas as respostas morfofisiológicas e os teores de nutrientes minerais em quatro clones de *E. dunnii* desenvolvidas nos meios basais EDMm, MS, JADS e WPM ou sob determinadas restrições nutricionais em meio basal EDMm. As condições nutricionais fornecidas pelos quatro meios basais foram adequadas para a multiplicação das brotações, porém, apenas as brotações desenvolvidas no meio EDMm se apresentaram sem clorose e oxidação, e com maiores taxas de enraizamento. Entre os meios basais, as principais diferenças nas repostas morfofisiológicas foram provocadas pelos teores de Cu, Fe, Mn e Zn, sendo maiores nas brotações desenvolvidas em EDMm. A restrição de nutrientes no meio EDMm permitiu associar a clorose das folhas com a deficiência de Fe e a deficiência de N com a queda de folhas e a oxidação das brotações dominantes. Além disso, as restrições na disponibilidade de K, Mg, Mn, Zn, Mo, Ni, Co e NaCl causaram menor desenvolvimento das brotações, porém, sem desenvolver sintomas visuais característicos.

Palavras-chave: Cultura de tecidos; Nutrição mineral; Meio basal; Enraizamento; Micronutrientes; Sintomas de deficiência

### Abstract

Morphogenic response modulation of a given genotype in tissue culture could be assessed essentially by two means, mineral nutrition and grow regulators. In micropropagation this relies on a delicate equilibrium among the various components of the culture media. Only an appropriate basal media selection could define the success or failure of this technique, since it is responsible for recreating the nutritional conditions for the development of tissues/organs. Although MS, JADS and WPM are the most common basal media in eucalypts tissue culture, they have shown little success in *E. dunnii* micropropagation. The diverse morphophysiological responses reported for this media could be related to the different nutritional conditions for axillary shoots development induced by the media composition. Identifying, understanding and associating them, could contribute to *E. dunnii* basal media optimization. Having this in mind, morphophysiological responses and mineral nutrient content of four *E. dunnii* clones grown in EDMm, JADS, MS and WPM basal media or under imposed nutritional restrictions were assessed. All media tested were able to propagate axillary shoots, however, only the shoots grown in EDMm media did not showed chlorosis or oxidation symptoms, and were able to root in a fair level. Among the

media, the main differences in morphophysiological responses were caused by the different levels of Cu, Fe, Mn and Zn, all of them higher in EDMm media. Nutritional restrictions in EDMm media allow associating leaves chlorosis with Fe deficiency and leaves drop and oxidation of dominant shoots with N deficiency. Moreover, restriction on K, Mn, Zn, Mo, Ni, Co and NaCl levels reduced axillary shoot development, however, without visual symptoms.

Keywords: Tissue culture; Mineral nutrition; Basal media; Rooting; Micronutrients; Deficiency symptoms

#### 4.1 Introdução

As plantas vasculares são organismos sésseis que vêm evoluindo há mais de 400 milhões de anos e que têm conseguido se estabelecer em ambientes extremamente diversos. Esta característica adaptativa sugere uma grande especialização, conseqüentemente, os requerimentos ambientais para o seu ótimo desenvolvimento, dentre eles os nutricionais, vão diferir entre táxons, fato reconhecido e aproveitado há muito tempo na agricultura (MARSCHNER, 1995).

Na cultura de tecidos, o crescimento e a morfogênese são muito influenciados pela composição do meio de cultura e o genótipo (BHOJWANI; RAZDAN, 1996; KOTHARI; AGARWAL; KUMAR, 2004). Contudo, desde que Murashigue e Skoog publicaram “*A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture*” (1962), a maioria dos pesquisadores envolvidos na cultura de tecidos começaram a utilizar esta combinação de minerais (MS) de forma indistinta, para uma grande variedade de plantas (GRIBBLE, 2002; GEORGE; DE KLERK, 2008).

Na propagação *in vitro* do eucalipto, o MS ou versões modificadas dele, se encontram entre os meios mais empregados, porém, outros meios basais de menor teor salino, como o WPM (LLOYDS; MCCOWN, 1980) e o JADS (CORREIA, 1993; CORREIA et al., 1995), têm demonstrado ser apropriados para várias espécies e híbridos (LE ROUX; VAN STANDEN, 1991; GLOCKE et al., 2006; PINTO et al., 2008; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; BRONDANI et al., 2012b). Porém, os meios mencionados têm tido pouco sucesso quando utilizados na propagação *in vitro* de material adulto de *E. dunnii*. Trabalhos anteriores indicam que, embora seja possível atingir taxas de multiplicação razoáveis, a clorose, a oxidação, a hiperhidricidade, a formação de calos e a dificuldade em atingir o enraizamento são denominadores comuns (GRAÇA, 1989; GRAÇA, 1997; GRAÇA et al., 2001; BILLARD; LALLANA, 2005; MALYZ et al., 2011; NAVROSKI, 2011; NAVROSKI et al., 2013).

Meios de cultura subótimos podem causar desordens fisiológicas ou até a morte dos tecidos (NAS; READ, 2004). Em decorrência de desequilíbrios nutricionais, a alteração do funcionamento normal do metabolismo afeta à sensibilidade dos tecidos e das células aos reguladores de crescimento (RAMAGE; WILLIAMS, 2002). Por outro lado, o emprego de reguladores de crescimento pode ser reduzido ou até suprimido do meio de cultura uma vez que as deficiências são supridas (PREECE, 1995; KOTHARI; AGARWAL; KUMAR, 2004), evitando problemas associados ao seu uso em elevadas concentrações, como a formação excessiva de calos, evento citado para *E. dunnii* (GRAÇA et al., 2001; BILLARD; LALLANA, 2005; MALYZ et al., 2011; NAVROSKI, 2011; NAVROSKI et al., 2013).

Sempre que os nutrientes minerais se encontrarem em quantidades insuficientes, o funcionamento normal do metabolismo é afetado antes da aparição de qualquer sintoma visual (BERGMANN, 1992). Estes estão sempre presentes nos meios de cultura, a diferença das fontes de carbono, os reguladores de crescimento, as vitaminas, os aminoácidos, os gelificantes e outras substâncias que podem ou não estar incluídas (GEORGE; DE KLERK, 2008). Diante disso, a definição da composição mineral do meio de cultura é especialmente importante para favorecer o desenvolvimento *in vitro* dos tecidos (MEZZETTI; ROSATI; CASALICCHIO, 1991).

Na aclimatização, a sobrevivência das microplantas está muito relacionada ao estado nutricional *in vitro*, culturas com maior absorção de nutrientes e maiores taxas de multiplicação apresentam maior sobrevivência (HALLORAND; ADELBERG, 2011), contudo, esta afirmação não pode ser generalizada para todas as espécies e genótipos (ADELBERG; DELGADO; TOMKINS, 2010). Provavelmente, nutrientes críticos para o enraizamento e a sobrevivência não o sejam para o crescimento e multiplicação *in vitro*, implicando na necessidade de avaliar o processo todo, desde a multiplicação até o enraizamento e posterior aclimatização das microplantas.

Meios basais formulados com base nos teores de nutrientes minerais encontrados em tecidos vegetais têm sido utilizados com êxito na micropropagação de várias espécies vegetais (RUGINI, 1984; CORREIA et al., 1995; SOUZA; GONÇALVES, 1996; MORARD; HENRY, 1998; MONTEIRO et al., 2000; GRIBBLE, 2002; NAS; READ, 2004; BACCHETTA et al., 2008; ARANDA-PERES et al., 2009), indicando o grande potencial que apresenta esta estratégia.

Uma vez que a maioria dos nutrientes possui uma ou mais funções no metabolismo das plantas, as deficiências, em contraste aos excessos, quase sempre provocam sintomas muito característicos, os quais podem ser considerados boas ferramentas de diagnóstico

(DELL et al., 2001; RÖMHELD, 2012). Mesmo sendo um método simples, a identificação visual de sintomas de deficiência ou excesso nem sempre resulta um processo fácil, pois um mesmo sintoma em distintos estágios pode ter diferentes descrições, ou pior ainda, em estágios avançados, os sintomas de deficiência ou toxidez são muito similares. Na medida em que a deficiência se torna mais severa, aparecem sintomas secundários devido a perturbação dos estágios sucessivos do metabolismo, tornando a identificação ainda mais complexa (BERGMANN, 1992). Neste sentido, a clorose e a necrose dos tecidos e os seus padrões de desenvolvimento são os critérios importantes para o diagnóstico visual (RÖMHELD, 2012), eventos já observados nas brotações de *E. dunnii* nos capítulos anteriores deste trabalho.

O meio basal EDM, desenvolvido com base na análise de nutrientes minerais de brotações de cepas e da disponibilidade de nutrientes em solução, já demonstrou ser apropriado para a organogênese e a multiplicação de material juvenil, quando modificada a concentração e fonte de Fe (EDMm) de *E. dunnii* (Capítulo 3). No entanto, para determinar se sua utilização pode ser vantajosa na micropropagação de material adulto desta espécie, torna-se necessário avaliar seu desempenho em relação a outros meios de cultura disponíveis. Por outro lado, é necessário desenvolver ferramentas que permitam otimizar este meio de cultura, que *a priori* parece promissor, como a identificação de sintomas de deficiências *in vitro* e a caracterização das respostas morfogênicas em níveis adequados e/ou deficientes de nutrientes minerais.

Com base no exposto, avaliou-se o efeito de quatro meios basais, EDMm, JADS, MS e WPM, assim como o efeito da restrição parcial e/ou total de nutrientes do meio EDMm na micropropagação de quatro matrizes selecionadas para o volume e forma de fuste de *E. dunnii*.

#### 4.1.1 Hipóteses

- As diferentes concentrações de nutrientes minerais fornecidos através dos distintos meios basais provocam diferenças nas respostas morfofisiológicas.
- O apropriado estado nutricional, produto do crescimento das brotações no meio basal EDMm, é mais favorável para a micropropagação de *E. dunnii* em relação aos meios basais JADS, MS e WPM.
- As deficiências de nutrientes minerais *in vitro* estão associadas a sintomas visuais reconhecíveis.

#### 4.1.2 Objetivos

- Identificar relações entre nutrientes minerais e a qualidade e intensidade das respostas morfofisiológicas.
- Determinar o meio basal de melhor aptidão para a multiplicação *in vitro* de quatro clones de *E. dunnii*.
- Identificar sintomas associados às deficiências nutricionais induzidas por restrições na disponibilidade dos nutrientes do meio EDMm.

#### 4.2 Material e métodos

##### 4.2.1 Material vegetal

Foram utilizados cinco clones do programa de melhoramento genético de *E. dunnii* do INTA, selecionados para volume e forma em um teste de progênies localizado em Ubajay, Entre Ríos, Argentina (31°49'33"S 58°13'44"O) (Figura 4.2 A). Os mesmos foram estabelecidos *in vitro* através de brotações epicórmicas de seções de tronco de rebrotas (8 a 12 cm de diâmetro x 1 m de comprimento). As seções, com suas extremidades seladas com cera de abelhas, foram mantidas em casa de vegetação por 60 dias sob condições de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $84 \pm 5\%$  de UR e sombreamento parcial (Figura 4.2 B e C). As brotações foram coletadas a partir do dia 30, seccionadas em segmentos nodais sem as folhas e submersas por 30 segundos em álcool 70%, seguido de 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio ( $15 \text{ g L}^{-1}$ ) acrescida de Tween 20 ( $0,5 \text{ ml L}^{-1}$ ) e triplo enxágue de água destilada estéril em fluxo laminar. Por fim, os segmentos foram introduzidos verticalmente em tubos de 35 ml de capacidade com 10 ml de meio de cultura. Após 30 dias, as gemas axilares desenvolvidas em brotações (Figura 4.2 D) foram transferidas para o meio de multiplicação EDMm, no qual foram subcultivadas a cada 30 dias, 8 vezes, antes do início dos experimentos. Explantes padronizados dentre três e quatro brotações, sem calos e oxidação evidente foram utilizados para cada tratamento (Figura 4.2 E).

Para obter as microestacas, após 90 dias de cultura em cada meio basal, foram coletadas todas as brotações maiores de 2 cm de cada tratamento. As brotações foram padronizadas em microestacas dentre 2 e 3 cm de comprimento, sendo retirado o primeiro par de folhas da base antes de serem colocadas no substrato.

##### 4.2.2 Meios de cultura e condições de crescimento

Para o estabelecimento do material vegetal, foi empregado o meio basal EDM (Tabela 2.4) sem reguladores de crescimento, adicionado com sacarose  $20 \text{ g L}^{-1}$  e ágar BRITANIA® 6



g L<sup>-1</sup>. Para a multiplicação, usou-se o meio basal EDMm (Tabela 4.1) adicionado com ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA) 0,01 mg L<sup>-1</sup>, 6-benzilaminopurina (BAP) 0,2 mg L<sup>-1</sup>, sacarose 20 g L<sup>-1</sup> e ágar SIGMA A7921<sup>®</sup> 5 g L<sup>-1</sup>.

Tabela 4.1 – Sais minerais, vitaminas e aminoácidos que compõem os meios basais empregados no experimento

Sais minerais	PM	MS	JADS	WPM	EDMm
		mg L <sup>-1</sup>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80,05	1600,00	320,00	400,00	380,00
KNO <sub>3</sub>	101,10	1900,00	809,00	-	540,00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	132,14	-	-	-	95,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	170,00	408,00	170,00	250,00
K <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> )	174,26	-	-	990,00	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	236,15	-	1181,00	556,00	970,00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	147,03	440,0	-	96,00	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246,50	369,8	739,50	370	-
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	256,41	-	-	-	310,00
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	372,24	37,30	74,50	37,30	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	278,01	27,80	55,60	27,80	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,84	6,20	3,10	6,20	3,00
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	169,01	16,90	16,90	16,90	20,45
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	287,56	8,60	4,32	8,60	4,00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	241,98	0,250	0,15	0,25	0,15
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	249,69	0,025	1,25	0,25	10,00
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	237,95	0,025	0,25	-	0,30
KI	166,02	0,83	-	-	-
Cl <sub>2</sub> Ni.6H <sub>2</sub> O	237,69	-	-	-	0,025
NaCl	58,44	-	-	-	12,00
Basafer <sup>®</sup> Plus (5% o,o-EDDHA/Fe <sup>3+</sup> )	434,80	-	-	-	286,00
Componentes orgânicos	mg L <sup>-1</sup>				
Pirodoxina	205,64	0,50	0,50	0,50	0,50
Ácido nicotínico	123,11	0,50	0,50	0,50	0,50
Tiamina	337,27	0,10	5,00	1,00	5,00
Mioinositol	180,16	100,00	100,00	100,00	100,00
L-Arginina	174,21	-	7,00	-	7,00
L-Glutamina	146,15	-	145,00	-	145,00
L-Cisteína	121,15	-	2,50	-	2,50
Glicina	75,07	2,00	-	2,00	-
Pantotenato de cálcio	219,24	-	1,10	-	1,10

De acordo com Murashigue e Skoog (1962), Correia et al. (1995) e Lloyds e McCown (1980).

Para o experimento I, os meios basais EDMm, JADS, MS e WPM foram elaborados de acordo a Tabela 4.1, adicionados com sacarose 20 g L<sup>-1</sup>, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e gelificados com 5 g L<sup>-1</sup> de ágar SIGMA<sup>®</sup> A7921. Foi adicionado 40 ml de meio de cultura para cada frasco de 250 ml. Para cada tratamento, três subcultivos foram realizados a cada 30 dias, antes da avaliação. Em cada subcultivo, os tufo foram divididos até o tamanho

do explante padrão original em quatro frascos (repetições) e transferido o material sobran-te para o mesmo meio de cultura, sem dividir os tufos, para multiplicar e alongar o material, e assim obter brotações para a etapa de enraizamento. Portanto, até o momento da avaliação, as brotações de cada clone se desenvolveram por 90 dias no mesmo meio basal, para cada tratamento.

Para o experimento II, foi empregado o meio basal EDMm, modificado para cada restrição nutricional segundo a tabela 4.2 e adicionado com sacarose 20 g L<sup>-1</sup>, ANA 0,01 mg L<sup>-1</sup>, BAP 0,1 mg L<sup>-1</sup> e ágar SIGMA A7921<sup>®</sup> 5 g L<sup>-1</sup>. Para cada tubo de vidro de 50 ml de capacidade foi adicionado 10 ml de meio de cultura. O pH de todos os meios de cultura foi ajustado para 5,8 prévio ao acréscimo do ágar. Em seguida, os tubos e os frascos foram esterilizados em autoclave a temperatura de 121°C sob pressão de 1 kg cm<sup>-2</sup> durante 20 minutos.

Tabela 4.2 - Modificações ao meio basal EDMm para cada restrição nutricional e concentração padrão para os nutrientes minerais avaliados

Restrição nutricional	Concentração padrão (mmol L <sup>-1</sup> )	Concentração sob restrição (mmol L <sup>-1</sup> )	Componentes e concentrações modificadas do EDMm
Full	-	-	Meio basal EDMm (Tabela 4.1)
	Total = 26,9	17,41	
- N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> = 20,7 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> = 6,2	15,97 1,44	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> = 0 mg L <sup>-1</sup>
- P	1,84	0,37	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> = 50 mg L <sup>-1</sup> + K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = 130 mg L <sup>-1</sup>
- K	7,18	1,84	KNO <sub>3</sub> = 0 mg L <sup>-1</sup> + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> = 595 mg L <sup>-1</sup>
- Ca	4,11	0,85	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O = 200 mg L <sup>-1</sup> + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> = 640 mg L <sup>-1</sup>
- Mg	1,21	0,25	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O = 65 mg L <sup>-1</sup> + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> = 460 mg L <sup>-1</sup>
- S	0,89	0,17	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> = 0 mg L <sup>-1</sup> + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> = 440 mg L <sup>-1</sup>
- B	0,05	0,00	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> = 0 mg L <sup>-1</sup>
- Cu	0,04	0,00	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O = 0 mg L <sup>-1</sup>
- Fe	0,26	0,05	o,o-EDDHA/Fe <sup>+3</sup> = 2,8 mg L <sup>-1</sup> (56 mg L <sup>-1</sup> de Basafer <sup>®</sup> Plus)
- Mn	0,12	0,00	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O = 0 mg L <sup>-1</sup>
- Zn	0,014	0,00	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O = 0 mg L <sup>-1</sup>
- Co	0,001	0,00	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O = 0 mg L <sup>-1</sup>
- Mo	0,0006	0,00	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O = 0 mg L <sup>-1</sup>
- Ni	0,0001	0,00	Cl <sub>2</sub> Ni.6H <sub>2</sub> O = 0 mg L <sup>-1</sup>
- NaCl	Cl = 0,21 Na = 0,21	Cl = 0,027 Na = 0,012	NaCl = 0 mg L <sup>-1</sup>
- ORG	Padrão (Tabela 4.1)	0,00	Componentes orgânicos = 0 mg L <sup>-1</sup>

Após a introdução do material vegetal nos tubos e os frascos, sob fluxo laminar, estes foram vedados com filme de PVC Resinite<sup>®</sup>. As condições ambientais para o crescimento das culturas foram as mesmas que as descritas no item 2.2.6.

Com base nos resultados do capítulo 3, o enraizamento foi conduzido *ex vitro*, sem aplicação de reguladores de crescimento. Foram utilizadas bandejas plásticas com células de 24 ml de capacidade, os materiais e métodos não mencionados para esta etapa foram os mesmos que os descritos no item 3.2.3.

#### 4.4.3 Análise nutricional

Para o experimento I, foram coletadas três amostras para cada tratamento, já para o experimento II, para cada nível de restrição nutricional foram coletadas quatro amostras (uma para cada clone). Em seguida, as amostras foram enxaguadas três vezes com água destilada para retirar qualquer resíduo do meio de cultura, secas até peso constante em estufa a 65°C, moídas com gral e pistilo (almofariz) de porcelana, peneiradas em malha de 20 mesh e armazenadas em tubos tipo eppendorf.

As análises foram realizadas no Laboratório de Tecidos Vegetais do Departamento de Ciência do Solo – ESALQ/USP, seguindo as metodologias propostas por Sarruge e Haag (1974).

#### 4.4.4 Delineamento experimental e análise estatística

Para avaliar os distintos meios basais (experimento I), foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial 4 x 4 (4 clones e 4 meios), com quatro repetições e cinco explantes por frasco, sendo a unidade observacional cada explante. O mesmo delineamento foi empregado para o estudo da restrição de nutrientes (experimento II), em arranjo fatorial 20 x 4 (20 tipos de restrição nutricional e 4 clones), com cinco repetições, sendo a unidade observacional cada explante. As variáveis analisadas aos 90 dias do início para o experimento I e, aos 30 dias para o experimento II, foram: número de brotações (NB); número de brotações alongadas (NBA); taxa de multiplicação (TM); taxa de crescimento (TC); e massa seca total (MST). Foram consideradas alongadas, as brotações maiores que 20 mm, estimado como comprimento mínimo para seu uso como microestacas. A variável MST para o experimento I foi calculada de acordo a eq. (1), já para o experimento II foi de acordo a eq. (2).

$$MST = (MSEF - MSEP) + (MSBA * NBA) \quad (1)$$

MST = massa seca total por explante (mg);

MSEF = massa seca final por explante (mg);

MSEP = massa seca inicial do explante padrão (média de 10 explantes amostrados) (mg);

MSBA = massa seca por brotação alongada (média de 10 explantes amostrados) (mg);

NBA = número de brotações alongadas.

$$\text{MST} = (\text{MSEF} - \text{MSEP}) \quad (2)$$

MST = massa seca total por explante (mg);  
 MSEF = massa seca final por explante (mg);  
 MSEP = massa seca inicial do explante padrão (média de 10 explantes amostrados) (mg).

A TM foi calculada de acordo com Halloran e Adelberg (2011) e o mesmo conceito foi empregado para calcular a TC (eq. 3 e 4).

$$\text{TM} = \text{NBF}/\text{NBI} \quad (3)$$

NBF = número de brotações por explante obtidas no final do período de avaliação;  
 NBI = número de brotações iniciais por explante;

$$\text{TC} = \text{MSEF}/\text{MSEP} \quad (4)$$

MSEF = massa seca final por explante (mg);  
 MSEP = massa seca inicial do explante padrão (média de 10 explantes amostrados por tratamento) (mg);

Aos 40 dias de idade, foi avaliado o enraizamento (ER) de 28 microestacas para cada tratamento na escala binomial (0/1).

Verificou-se a ausência de *outliers*, a homogeneidade da variância e a normalidade dos erros, posteriormente foram conduzidos a análise da variância, a regressão linear quasipoisson ou logística (1 = enraizamento) e/ou o teste de Tukey, em função do tipo de variável resposta e do objetivo da análise. Quando as variáveis não obedeceram às pressuposições necessárias para aplicar as análises paramétricas, foram aplicadas transformações de Box-Cox, e, nos casos nos quais as variáveis continuaram não se ajustando, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Para a ANOVA e posteriores testes de Tukey e/ou de Kruskal-Wallis das concentrações de nutrientes minerais, as análises foram realizadas para os efeitos principais (médios) dos tratamentos de restrição.

Além disso, os dados obtidos das análises químicas e as variáveis morfofisiológicas TM, TC e NBA foram submetidos à análise de componentes principais (ACP) (JOLLIFFE, 2002) e representados em gráficos *biplot* (GABRIEL; ODOROFF, 1990). Os teores dos nutrientes minerais foram analisados como variáveis quantitativas e cada meio basal como variável categórica, sendo utilizados para estimar as elipses de confiança dos agrupamentos do experimento I.

Todas as análises foram realizadas no programa R, versão 3.0.2 (R CORE TEAM, 2013), com os pacotes ‘FactoMineR’, ‘laercio’, ‘MASS’, ‘rms’ e ‘pgirmess’.

## 4.5 Resultados e discussão

### 4.5.3 Experimento I - Meios basais

Para facilitar a interpretação e evitar problemas de multicolinearidade e redundância na análise, na ACP foram consideradas unicamente as variáveis morfofisiológicas NBA, TM, TC e ER, assim como todos os nutrientes minerais analisados, totalizando 14 variáveis. A ACP conseguiu sintetizar em três componentes 79% da variância acumulada, os quais são apresentados em quatro gráficos *biplot* (Figura 4.1 A, B, C e D). Esta análise multivariada evidencia que a maior proporção da variância pode ser atribuída aos meios basais, uma vez que os agrupamentos responderam a esta variável qualitativa. Nesse sentido, o meio basal MS promoveu maiores diferenças nas respostas entre os clones avaliados. Além disso, foi observada uma sobreposição das observações dos meios MS e WPM quando considerados os CP1 e CP2 (Figura 4.1 B), resposta atribuível ao fato de compartilharem a mesma composição para P, Ca, Mg, os micronutrientes e as substâncias orgânicas. Da mesma forma, quando considerados os CP2 e CP3, essa sobreposição se estende parcialmente ao meio EDMm, principalmente em decorrência dos valores similares de Zn e Mn das brotações cultivadas no WPM (Figura 4.1 E, Tabela 4.5).

O ER e os níveis de Cu, Fe, Mn, Zn e em menor extensão o N (CP3), foram determinantes nas respostas observadas no meio EDMm, manifestado tanto pelas correlações destas variáveis com os componentes principais, como pelos vetores das variáveis originais (Tabela 4.3 e Figura 4.1 A e C).

Considerando o CP1 e CP2, fica evidente que a TC e a TM são favorecidas com o incremento das concentrações de K e S, fornecido pelos meios basais MS e WPM, e afetadas negativamente pelas concentrações de Fe e Ca do JADS e do EDM. Os elevados níveis de Zn nas brotações desenvolvidas no meio EDMm e de P e Mg obtidas no JADS, correlacionados significativamente com o CP2, também contribuíram no agrupamento das observações, contudo, sem uma evidente relação com as variáveis morfofisiológicas, denotada pela direção e sentido dos vetores no *biplot* (Figura 4.1 A e B).

O CP3 apresentou uma correlação negativa significativa com o N e, ao mesmo tempo, correlações positivas com K, ER e NBA, sugerindo um efeito inibidor do N e um efeito benéfico do K sobre estas variáveis, quando presentes em elevadas concentrações no meio de cultura (Tabela 4.3 e Figuras 4.1 C e D). Neste caso, esta resposta é claramente atribuível aos elevados níveis de N do meio MS (Tabelas 4.5 e 4.6) e que pode estar relacionada ao fato de muitas espécies de eucaliptos precisarem da diluição pela metade deste meio basal para atingir o alongamento e/ou enraizamento *in vitro* (LE ROUX; VAN STANDEN, 1991).

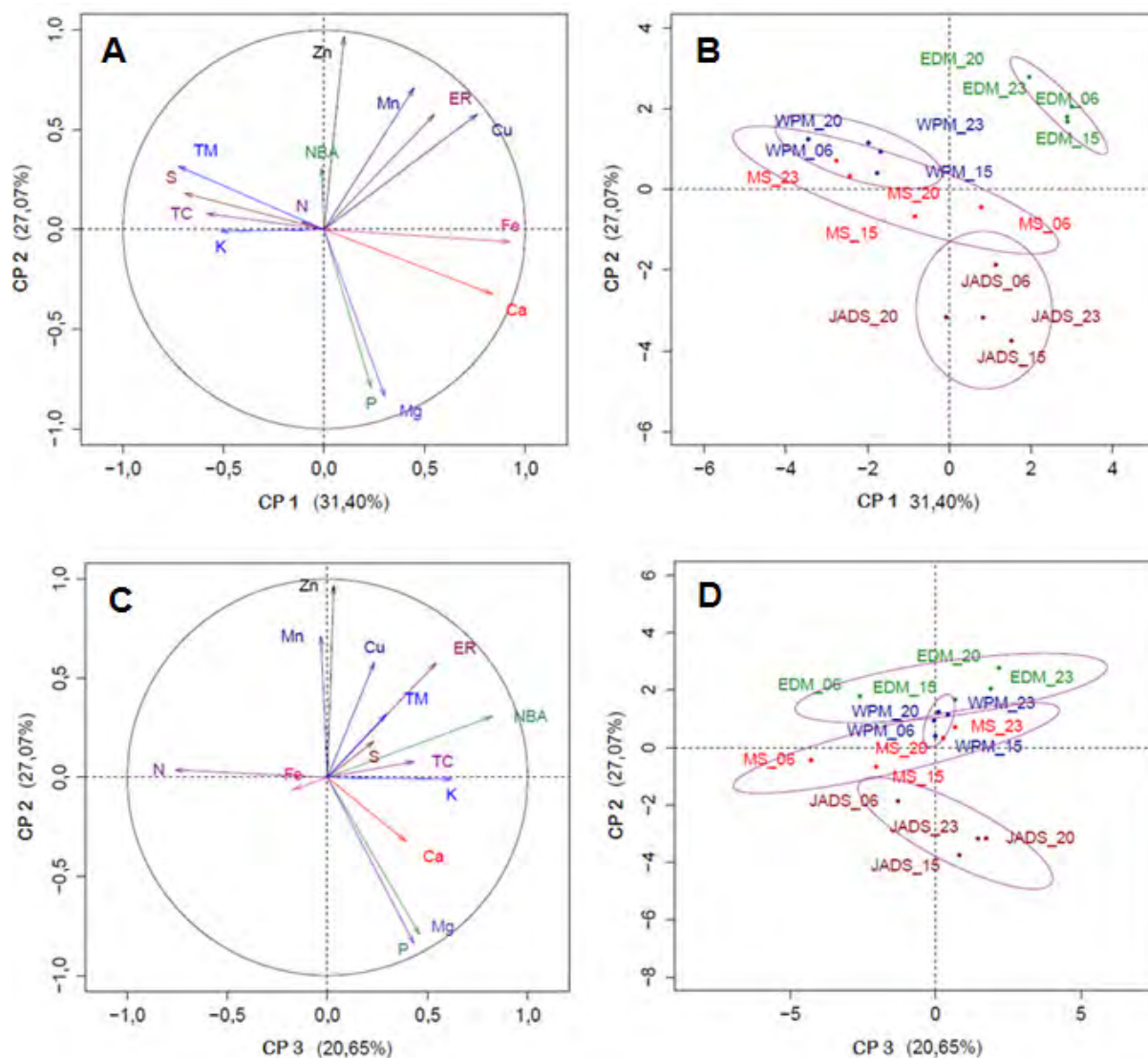


Figura 4.1 - Gráficos *biplot* do ACP para os teores de nutrientes minerais, TC, TM, NBA e ER de quatro clones de *E. dunnii* cultivados nos meios basais EDMm, JADS, MS e WPM. A) *Biplot* dos vetores das variáveis originais e B) agrupamento das observações por meio basal e elipses de confiança ( $P = 0,05$ ) quando considerados os componentes principais 1 e 2. C) *Biplot* dos vetores das variáveis originais e D) agrupamento das observações por meio basal e elipses de confiança ( $P = 0,05$ ) quando considerados os componentes principais 2 e 3

Tabela 4.3 – Componentes principais (CP), variância proporcional acumulada (VAC) e correlações significativas das variáveis originais com cada componente, para os teores de nutrientes e variáveis morfofisiológicas de quatro clones de *E. dunnii* cultivados nos meios basais EDMm, JADS, MS e WPM

CP	VAC (%)	Variáveis significativas													
		N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn	ER	TC	TM	NBA
CP1	31,4	-	-	-0,51*	0,83**	-	-0,69**	0,76**	0,93**	-	-	0,55*	-0,58*	-0,72*	-
CP2	58,5	-	-0,79**	-	-	-0,84**	-	0,58*	-	0,71**	0,97**	0,58*	-	-	-
CP3	79,1	-0,76**	-	0,62*	-	-	-	-	-	-	-	0,54*	-	-	0,82**

\* =  $P \leq 0,05$  e \*\* =  $P \leq 0,01$

Tabela 4.4 - Médias e desvios padrão para as variáveis NB, NBA, TM, MST, TC e ER por clone e meio basal após 30 dias da última transferência e 90 dias de cultura em cada meio basal

Meio BASAL	Clone	NB (número explante <sup>-1</sup> )	NBA (número explante <sup>-1</sup> )	TM	MST (mg explante <sup>-1</sup> )	TC	ER (0/1)
EDMm	ED_006	8,70 ± 2,03 Bb	0,15 ± 0,37 ABb	2,18 ± 0,51 Bb	35,73 ± 6,04 Cd	5,70 ± 0,79 Cb	0,17 ± 0,38 <i>ns</i>
	ED_015	6,35 ± 1,23 Cc	1,25 ± 0,55 Aa	1,59 ± 0,31Cc	77,71 ± 8,47 Aa	7,67 ± 0,73 Aa	0,42 ± 0,50 °
	ED_020	10,80 ± 2,63 Ba	1,85 ± 0,81 Aa	2,23 ± 0,50 Bab	51,48 ± 13,82 Cc	7,60 ± 1,43 BCa	0,63 ± 0,49 **
	ED_023	8,93 ± 2,02 Bab	1,67 ± 0,82 Aa	2,70 ± 0,66 Ba	63,36 ± 13,71 BCb	8,50 ± 2,02 Ca	0,50 ± 0,51 *
Total EDM		8,68 ± 2,58	1,20 ± 0,93	2,17 ± 0,65	56,65 ± 19,15	7,35 ± 1,69	0,42 ± 0,49
JADS	ED_006	8,85 ± 2,30 Ba	0,25 ± 0,44 ABb	2,21 ± 0,58 Ba	45,59 ± 9,22 Bb	7,00 ± 1,21 Bc	0,08 ± 0,28 <i>ns</i>
	ED_015	6,40 ± 1,23 Cb	0,75 ± 0,79 BCab	1,60 ± 0,31 Cb	64,31 ± 12,63 Ba	6,52 ± 1,08 Bc	0,08 ± 0,28 <i>ns</i>
	ED_020	9,75 ± 2,17 Ba	1,05 ± 0,83 BCa	2,41 ± 0,57 Ba	62,85 ± 14,09 BCa	8,37 ± 1,02 Bb	0,08 ± 0,28 <i>ns</i>
	ED_023	9,65 ± 2,28 Ba	1,05 ± 0,51 Aa	2,44 ± 0,54 Ba	70,76 ± 9,83 Ba	10,16 ± 2,05 BCa	0,16 ± 0,38 <i>ns</i>
Total JADS		8,66 ± 2,42	0,78 ± 0,73	2,17 ± 0,61	60,87 ± 14,76	8,01 ± 1,98	0,10 ± 0,30
MS	ED_006	7,00 ± 1,25 Cb	0,00 ± 0,00 Bb	1,75 ± 0,31 Cb	41,42 ± 12,43 BCd	6,45 ± 1,64 BCb	- ± -
	ED_015	8,40 ± 1,60 Bb	0,15 ± 0,49 Cb	2,10 ± 0,40 Bb	59,46 ± 10,81 Bc	6,10 ± 0,93 Bb	0,04 ± 0,20 <i>ns</i>
	ED_020	10,75 ± 2,49 Ba	1,55 ± 0,69 ABa	3,09 ± 0,78 Aa	77,99 ± 12,51 Ab	10,85 ± 1,40 Aa	0,08 ± 0,28 <i>ns</i>
	ED_023	12,35 ± 3,13 Aa	1,50 ± 0,76 Aa	2,69 ± 0,62 Ba	92,84 ± 11,90 Aa	12,37 ± 1,82 Aa	0,13 ± 0,34 <i>ns</i>
Total MS		9,80 ± 3,03	0,85 ± 0,93	2,45 ± 0,76	69,69 ± 22,13	9,11 ± 3,11	0,08 ± 0,24
WPM	ED_006	10,73 ± 1,67 Ab	0,47 ± 0,52 Ab	2,68 ± 0,42 Ab	68,68 ± 13,58 Aab	10,04 ± 1,79 Aa	0,13 ± 0,34 <i>ns</i>
	ED_015	9,75 ± 1,74 Ab	0,85 ± 0,59 Bab	2,44 ± 0,44 Ab	62,31 ± 12,04 Bab	6,35 ± 1,03 Bb	0,08 ± 0,28 <i>ns</i>
	ED_020	14,87 ± 3,66 Aa	0,53 ± 0,74 Cb	2,68 ± 0,55 ABb	71,65 ± 18,11 ABa	6,97 ± 1,62 Cb	0,04 ± 0,20 <i>ns</i>
	ED_023	10,70 ± 2,20 ABb	1,50 ± 0,89 Aa	3,72 ± 0,92 Aa	57,35 ± 15,56 Cb	11,45 ± 2,64 ABa	0,16 ± 0,38 <i>ns</i>
Total WPM		11,33 ± 3,02	0,89 ± 0,81	2,83 ± 0,75	64,26 ± 15,54	8,41 ± 2,74	0,10 ± 0,31

Para cada variável nas colunas, letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre meios basais em cada clone a  $P = 0,05$  do teste deTukey e letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre clones em cada meio basal  $P = 0,05$  do teste de Tukey para os efeitos simples (interação significativa)

*ns* = não significativo; (°)  $P \leq 0,10$ ; (\*)  $P \leq 0,05$  e (\*\*)  $P \leq 0,01$  para regressão logística de todas as combinações de clone e meio basal

Tabela 4.5 – Concentrações médias de nutrientes minerais em brotações de *E. dunnii* para cada clone e meio basal após 30 dias da última transferência e 90 dias de cultura em cada meio basal

Meio basal	Clone	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
		g kg <sup>-1</sup>						mg kg <sup>-1</sup>			
EDMm	ED_006	52,01	4,38	17,34	6,72	0,90	2,06	84,67	1762,17	405,83	136,83
	ED_015	25,06	4,77	22,19	8,59	1,33	3,34	91,67	1269,00	380,33	127,33
	ED_020	31,86	5,25	25,76	7,34	1,57	3,19	87,17	1156,67	367,67	160,67
	ED_023	29,75	6,01	24,48	8,68	1,73	3,76	103,33	1312,33	433,17	133,67
JADS	ED_006	39,07	5,98	20,66	6,24	2,30	2,56	12,17	1406,23	316,67	38,83
	ED_015	29,96	8,03	26,78	9,23	3,40	3,80	17,50	1129,33	243,33	38,33
	ED_020	27,27	7,84	27,29	7,16	3,33	3,65	14,17	988,83	229,00	35,17
	ED_023	32,05	7,92	22,95	9,42	3,23	4,21	16,67	1035,83	209,83	40,50
MS	ED_006	-	4,56	12,41	4,32	1,03	2,32	11,67	1219,83	279,83	89,83
	ED_015	55,67	5,27	26,27	4,44	1,43	4,07	11,17	508,50	274,83	85,00
	ED_020	49,92	4,92	28,05	3,45	1,27	3,72	9,67	468,17	235,50	101,17
	ED_023	55,09	4,30	36,98	4,09	1,40	4,06	7,17	467,00	268,83	97,67
WPM	ED_006	35,67	5,90	27,03	3,60	1,07	7,49	12,50	638,17	420,00	98,67
	ED_015	26,98	5,07	27,80	4,05	1,13	7,99	13,17	383,50	311,83	92,50
	ED_020	29,30	4,75	23,46	3,04	0,90	8,02	13,33	369,17	292,33	114,33
	ED_023	29,81	5,14	24,99	2,95	1,00	7,74	15,50	382,33	272,83	122,83

- = amostra insuficiente para analisar

Tabela 4.6 - Concentrações médias e desvios padrão de nutrientes minerais em brotações de *E. dunnii* após 30 dias da última transferência e 90 dias de cultura em cada meio basal

Meio basal	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
	g kg <sup>-1</sup>						mg kg <sup>-1</sup>			
EDMm	34,67±10,78b	5,10±0,81b	22,44±3,82a	7,83±0,91a	1,38±0,34b	3,09±0,68b	91,71±10,15a	1375,04±246,9a	396,8±31,45a	139,6±24,09a
JADS	32,09±5,18b	7,20±1,41a	24,42±3,65a	8,01±1,43a	3,07±0,51a	3,56±0,66b	15,13±2,37b	1140,06±194,2a	249,7±43,33c	38,2±2,68c
MS	53,56±5,67a	4,76±0,81b	25,93±10,39a	4,08±0,50b	1,28±0,20b	3,54±0,89b	9,92±2,23c	665,88±337,9b	264,8±23,29c	93,4±7,14b
WPM	30,44±3,37b	5,22±0,53b	25,82±2,17a	3,41±0,50c	1,03±0,11c	7,81±0,37a	13,63±1,91b	443,29±121,7c	324,3±61,02b	107,1±13,59b

Para cada nutriente mineral nas colunas, letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre meios basais de acordo ao teste de Tukey ( $P = 0,05$ )



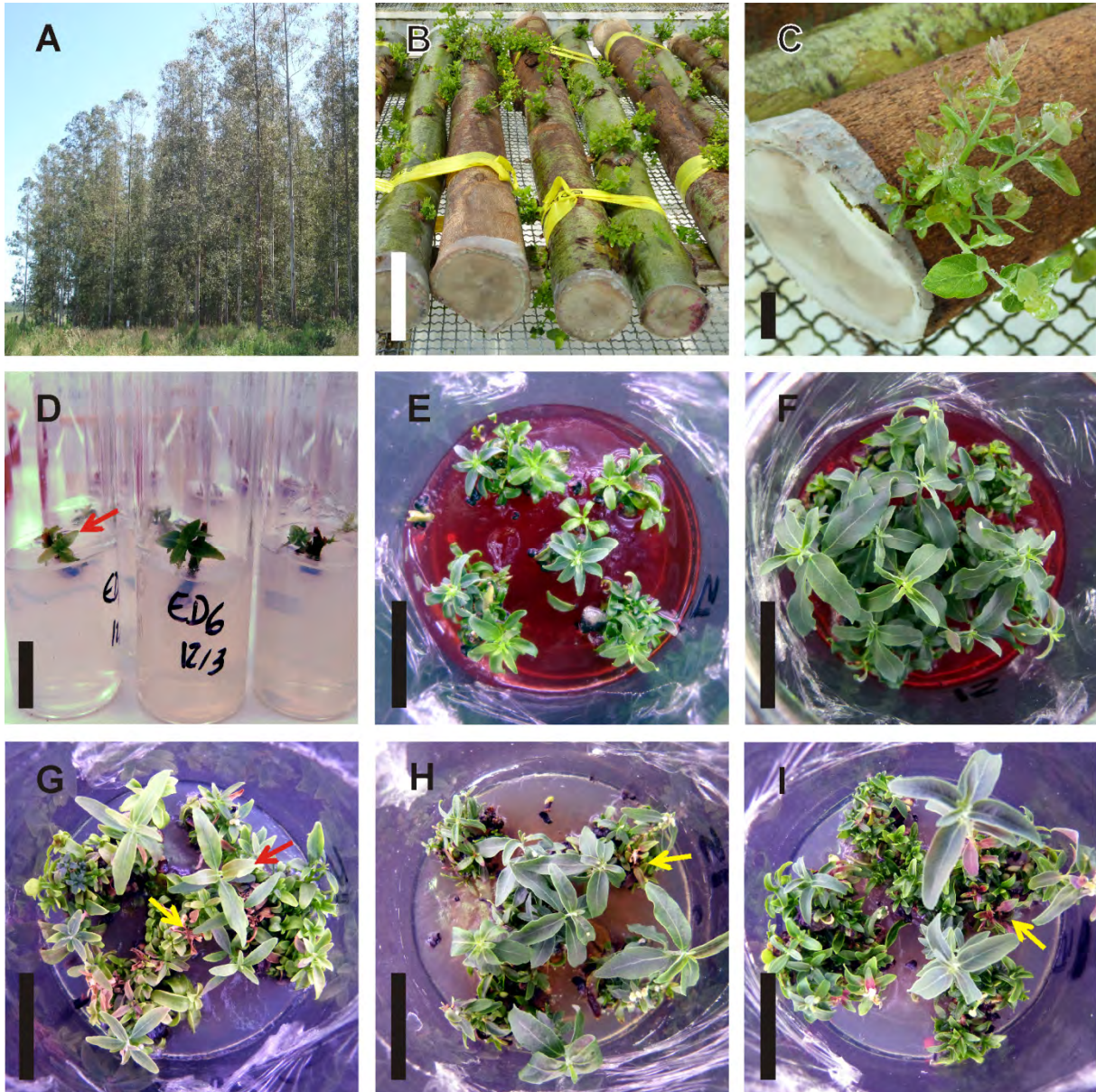


Figura 4.2 - A) Vista do teste de progênies de *E. dunzii*, antes do corte raso da área onde foram selecionadas as árvores matrizes; B) porções de tronco de rebrotas de 16 meses de idade aos 45 dias da colheita e acondicionamento em casa de vegetação; C) detalhe das brotações epicórmicas usadas como fonte de explantes no estabelecimento *in vitro*; D) estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais em meio EDM. Vistas das brotações do clone ED\_015; E) no início do período de avaliação do experimento em meio EDMm; F) no final do período de avaliação do experimento em meio EDMm; G) em meio basal MS; H) em meio basal JADS; e I) em meio basal WPM. Setas amarelas = oxidação; setas vermelhas = clorose. Barras = 10 cm (B), 2 cm (C, D, E, F, G, H e I)

Os elevados níveis de P, Ca e Mg que caracterizam ao meio basal JADS, foram refletidos no conteúdo das brotações (Tabelas 4.5 e 4.6). Estas variáveis, assim como os baixos níveis de Zn, Mn, Cu e ER contribuíram com o agrupamento das observações do JADS, como evidenciado pelas correlações significativas destas características com o CP2 (Tabela 4.3 e Figura 4.1). No caso de WPM, suas elevadas concentrações de S provocaram maiores acúmulos deste nutriente nas brotações, em relação aos outros meios de cultura

(Tabela 4.6) e favoreceram as TM e TC em detrimento do ER (Figura 4.1 A). O meio WPM promoveu os maiores NB e TC na maioria dos clones, com exceção do clone ED\_023 que apresentou boas respostas também no meio MS para estas variáveis (Tabela 4.4).

Tanto o JADS como o EDMm contêm os maiores teores de Fe na sua formulação, diferindo na fonte deste nutriente, sendo EDTA/Fe para o JADS e o,o-EDDHA/Fe<sup>3+</sup> para o EDMm (Anexo D). Diferente dos resultados obtidos no MS e WPM, para ambos os meios o nível de Fe foi elevado nas brotações (Tabela 4.6) e a clorose não foi observada (Figuras 4.2 F, H, 4.3 A, B, C e D). Contudo, o menor conteúdo de Zn e as maiores concentrações de EDTA no JADS provocaram quedas na disponibilidade deste nutriente, evidenciado pelas análises químicas e pela modelagem no GEOCHEM-EZ (Tabela 4.6, Anexo D). Efeitos similares foram observados para o Cu nos meios JADS, MS e WPM, nos quais os menores teores do nutriente e o emprego do EDTA como agente quelante nos meios basais provocaram baixas concentrações nas brotações (Tabela 4.6, Anexo D).

Uma maior produção de biomassa nos clones ED\_020 e ED\_023 foi observada no meio MS, por outro lado, o clone ED\_015 teve melhor comportamento para esta característica no meio WPM e o clone ED\_006, no meio EDMm. Estas respostas foram similares tanto para a MST como para a TC, ambas as variáveis que avaliam estas características (Tabela 4.4). Uma particularidade do MS que poderia explicar esta resposta é sua elevada concentração iônica, principalmente devido aos elevados níveis de N e K (Anexo D), muito superiores em relação aos meios EDMm, JADS e WPM, e que poderiam ser considerados excessivos, aspecto já mencionado para outras culturas (MONCALEAN et al., 1999; DANTAS et al., 2001).

No meio basal EDMm foi observado um maior NBA para a maioria dos clones, contudo, o clone ED\_006 (Figura 4.3 A), caracterizado pelo baixo crescimento e alongamento *in vitro*, apresentou melhor resposta no meio WPM. Por outro lado, o clone ED\_023 não apresentou especificidade em relação ao meio de cultura para esta característica, manifestando bom desenvolvimento em todos os meios basais (Figura 4.3 A; Tabela 4.4).

De forma geral, todos os meios basais permitiram multiplicar o material empregado nesta experiência (Figura 4.3 A, B, C e D). O clone ED\_006, que não teve uma boa predisposição para o alongamento nestas condições, apresentou elevados níveis de N e de Fe nos tecidos, indicando que as concentrações destes nutrientes provavelmente estão fora do seu intervalo ótimo (Tabelas 4.5 e 4.6). Possivelmente, um ajuste do meio basal e relações apropriadas de reguladores de crescimento poderiam contribuir para superar estes inconvenientes e otimizar as respostas deste clone, aspecto não abordado neste trabalho.

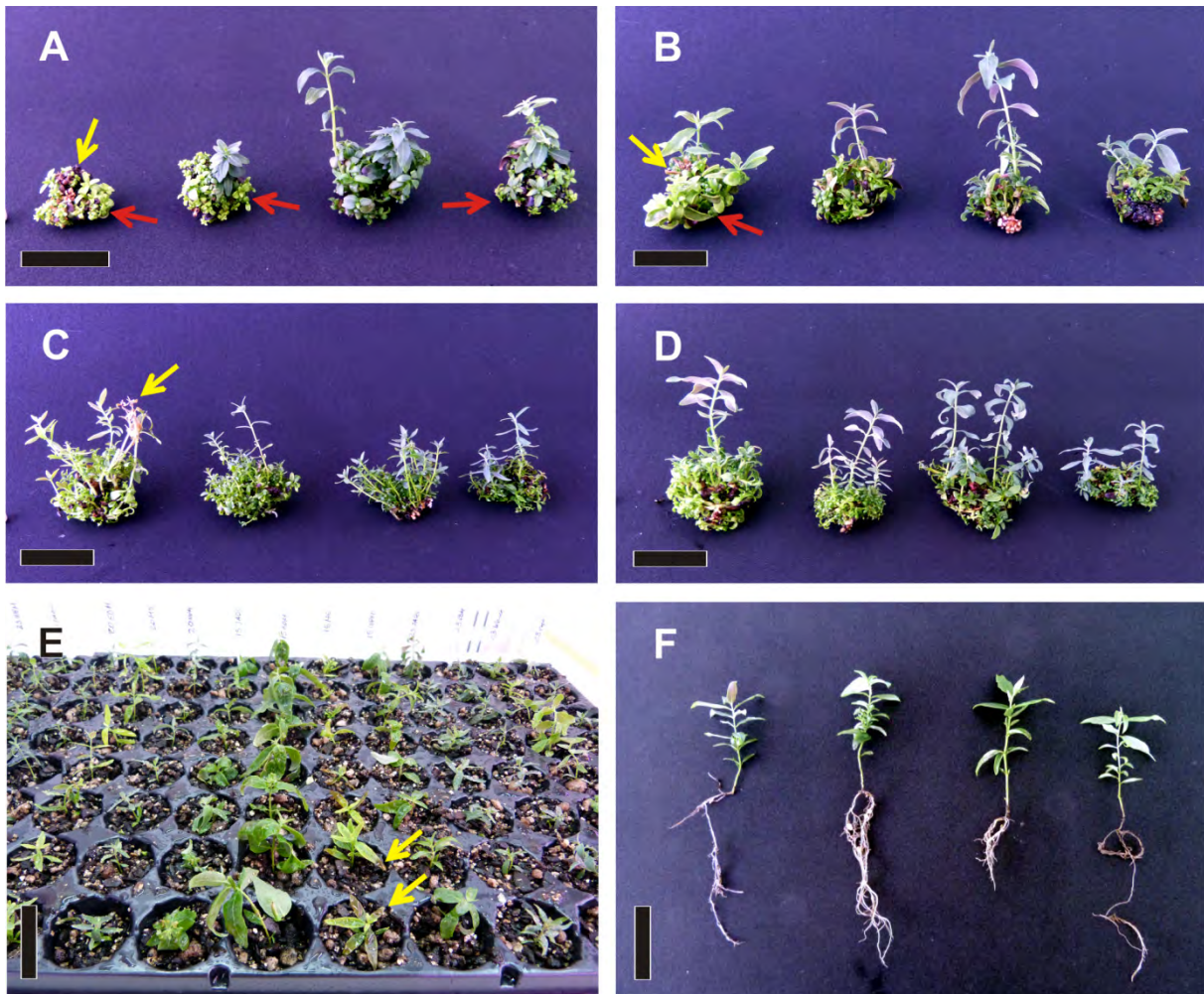


Figura 4.3. Vistas das brotações dos clones A) ED\_006; B) ED\_015; C) ED\_020 e D) ED\_023 após 30 dias do início do experimento, nos meios basais MS, WPM, EDMm e JADS (da esquerda para a direita em cada imagem). Microestacas aos 7 dias de idade, note-se a oxidação incipiente nas folhas das microestacas advindas das brotações desenvolvidas no MS (seta amarela) em E); F) Microestacas enraizadas aos 40 dias de idade dos clones ED\_006, ED\_015, ED\_020 e ED\_023. Barras = 2 cm

O fator fundamental que determina as diferenças nas respostas entre os meios basais é o ER, o qual só foi atingido em níveis aceitáveis para os clones ED\_015, ED\_020 e ED\_023 quando as microestacas foram obtidas de brotações cultivadas no meio basal EDMm (Tabela 4.4). Em média, os quatro clones avaliados para esta característica atingiram 42% de enraizamento no meio EDMm, superiores aos valores citados para material adulto de *E. dunnii* (GRAÇA, 1997; BILLARD; LALLANA, 2005; NAVROSKI, 2011) e *E. benthamii* x *E. dunnii* (BRONDANI et al., 2011). Esta resposta possui uma grande relevância, desde que o enraizamento adventício de brotações constitui uma das vias mais importantes para a propagação vegetativa e é um pré-requisito para a obtenção de clones viáveis em nível comercial (LI et al., 2009).

Semelhantes a estes resultados, meios de cultura adicionados com EDDHA/Fe têm melhorado o aspecto dos explantes e, ao mesmo tempo, incrementado as taxas de enraizamento em *Prunus amygdalus* x *P.persica* (MOLASSIOTIS et al., 2004) e *Juglans major* x *J. regia* (MORENO et al., 2012).

As brotações cultivadas no meio EDMm não apresentaram alterações visuais ao normal desenvolvimento, entretanto, sintomas de oxidação foram observados nos meios restantes e clorose nos meios basais MS e WPM, para todos os clones (Figuras 4.2 F, G, H, I, 4.3 A, B, C e D). Provavelmente, a clorose é decorrente das menores concentrações de Fe e do uso do EDTA como agente quelante nas suas composições (Tabela 4.1 e Anexo D), ambos os fatores possivelmente envolvidos na clorose e oxidação *in vitro* de *E. dunnii*, segundo os resultados do capítulo 2 deste trabalho. As análises químicas de nutrientes minerais corroboram esta hipótese, uma vez que os valores de Fe foram significativamente menores nos meios MS e WPM para todos os clones (Tabela 4.6).

A oxidação observada nas brotações de *E. dunnii* cultivadas nos meios JADS, MS e WPM poderia estar relacionada aos baixos teores de Cu encontrados nas brotações. Este elemento tem um papel fundamental na síntese de lignina e na proteção contra o estresse oxidativo, a sua deficiência tem demonstrado ocasionar efeitos significativos nas plantas lenhosas (BERGMANN, 1992; MARSCHNER, 1995). Por um lado, menores concentrações de CuZnSOD (superóxido dismutase) podem afetar a capacidade de desintoxicação e, por outro lado, uma queda na síntese de lignina pode ocasionar um acúmulo de substâncias fenólicas (BROADLEY, 2012). Um efeito secundário, porém de enorme relevância neste caso, que pode se atribuir ao Cu é a enorme diferença nas respostas observadas quanto ao enraizamento adventício das brotações advindas dos distintos meios de cultura. De acordo com Gaspar (1985), a gênese da parede celular e a formação do xilema durante a rizogênese requerem dos processos de lignificação, evento possivelmente afetado nos meios basais JADS, MS e WPM. Além disso, uma outra evidência em favor do Cu é a prematura oxidação observada nas microestacas obtidas das brotações desenvolvidas no meio MS (Figura 4.3 E).

O meio MS já foi mencionado como indutor de clorose em *Corylus avellana* (NAS; READ, 2004) e *E. benthamii* (BRONDANI et al., 2012), e de clorose e oxidação na micropropagação de *E. erythronema* x *E. stricklandii* (GLOCKE et al., 2006) e na organogênese de *E. benthamii* x *E.dunnii* (OLIVEIRA et al., 2011). Neste último caso, também foram citados elevados níveis de oxidação para explantes desenvolvidos no meio JADS.

Outro nutriente que apresentou elevada correlação com o ER foi o Mn (Figura 4.1 A), presente em maiores concentrações nas brotações desenvolvidas no meio EDMm (Tabela 4.6). Ressalta-se que o conteúdo de Mn dos meios basais não difere significativamente entre eles, em consequência, as diferenças observadas nas brotações são atribuíveis à disponibilidade do nutriente na solução como resultado da sua menor afinidade com o EDDHA (Anexo D). Os níveis deste nutriente também podem estar relacionados à ausência de sintomas de oxidação nos explantes, uma vez que ele faz parte da MnSOD, como o Cu e o Zn, porém com atividade específica na mitocôndria e nos peroxissomos. As SOD são enzimas responsáveis pela sobrevivência dos organismos aeróbicos na presença de oxigênio, protegendo-os dos radicais livres do oxigênio ( $O_2^-$ ) produzidos nas reações enzimáticas, através da catálise de reações que convertem estes radicais em  $H_2O_2$  (ELSTNER, 1982; KLIEBENSTEIN; MONDE; LAST, 1998).

O Mn também participa na síntese da lignina como cofator enzimático na produção e polimerização de compostos fenólicos, além disso, alguns estudos mencionam o Mn como necessário para o alongamento celular nas raízes. Porém, este efeito pode ser atribuído ao fato do Mn substituir ao Ca e ao Mg em decorrência dos seus raios iônicos similares (BROADLEY et al., 2012), fato já observado por Higashi (1996) e Higashi e Gonçalves (2006), em brotações de *E. grandis* e *E. grandis* x *E. urophylla*, quando omitidos o Ca e Mg do meio basal JADS.

De forma geral, os resultados referidos à absorção de nutrientes por brotações desenvolvidas nos meios de cultura JADS, MS e WPM são similares aos mencionados por Almeida (2012) para *E. citriodora*, em que os maiores níveis de N foram no MS, os de P, Ca, Mg, Cu e Mn no JADS e o de S, no WPM. Contudo, os clones de *E. dunnii* neste estudo apresentaram maiores concentrações de Cu, Fe e Mn nos mesmos meios basais, sugerindo uma maior demanda destes micronutrientes para esta espécie.

Uma vez que o enraizamento foi atingido em níveis aceitáveis apenas nas microestacas obtidas das brotações desenvolvidas no meio EDMm e que neste meio basal não foram observados sintomas de clorose e oxidação, pode-se inferir que os micronutrientes metálicos Cu, Fe, Mn e Zn tiveram uma importância fundamental, fato que pode ser atribuído principalmente à proteção dos explantes contra o estresse oxidativo, através da constituição de enzimas desintoxicantes e/ou na polimerização das substâncias fenólicas.

Contudo, o equilíbrio iônico do meio EDMm pode ser atingido apenas quando empregado EDDHA/Fe como fonte de Fe, desde que, com exceção do Cu, ele apresenta baixa afinidade por outros nutrientes. Por outro lado, o EDTA tem maior afinidade pelo Cu, Mn e

Zn, fato que pode provocar baixa disponibilidade destes nutrientes caso se elevem as concentrações do quelato, como já observado para o Zn no capítulo 2 (Tabela 2.7).

#### 4.5.4 Experimento II - Restrição de nutrientes

A análise multivariada com o método de ACP foi menos eficiente que no experimento anterior, precisando de quatro componentes para caracterizar 64% da variância entre as observações das 13 variáveis analisadas conjuntamente (Tabela 4.7). Provavelmente, as restrições nutricionais incrementaram as diferenças nas respostas entre os genótipos. Não entanto, foi possível identificar várias relações entre nutrientes e respostas morfofisiológicas das brotações, de grande importância para a propagação *in vitro* de *E. dunnii*.

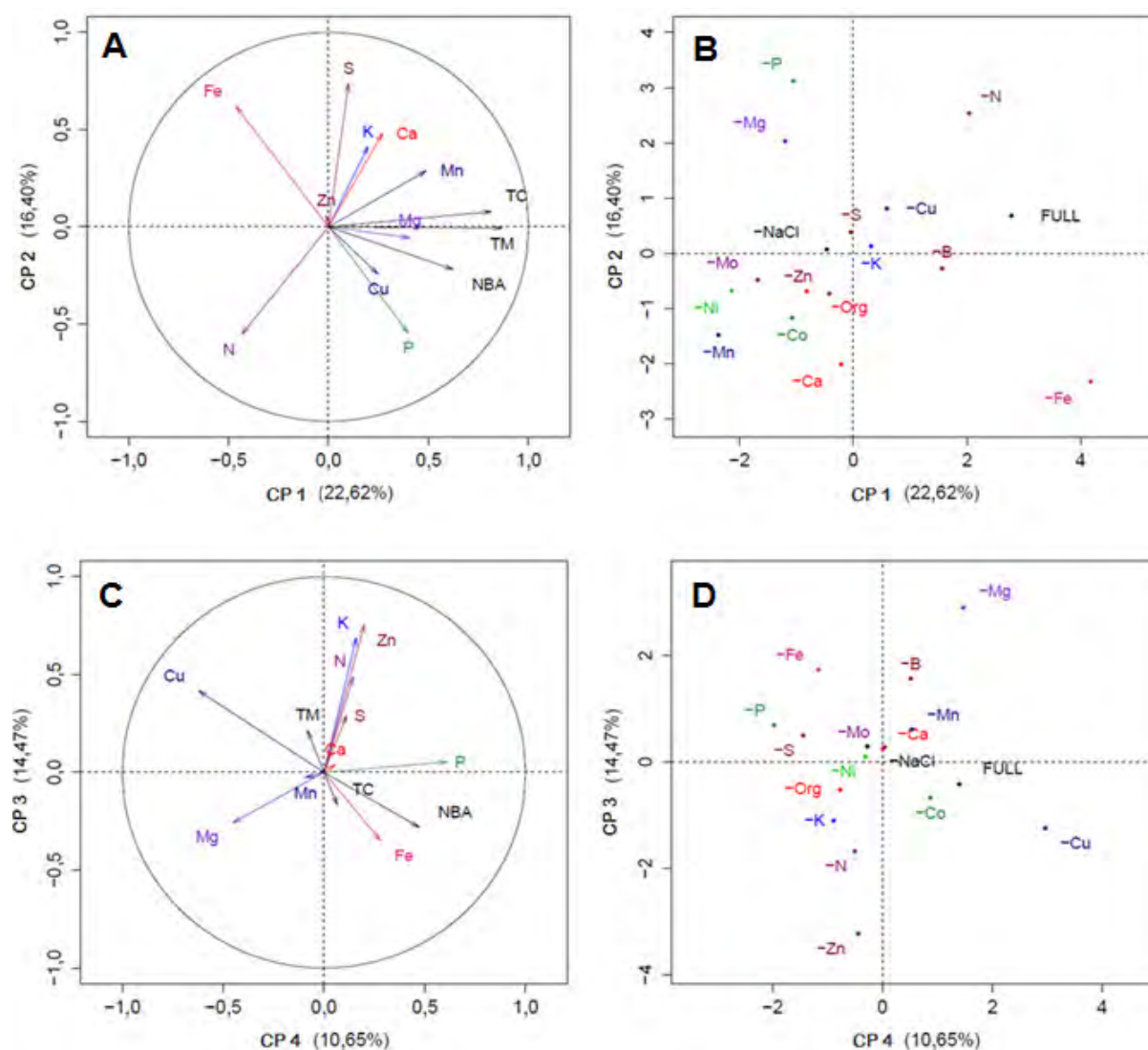


Figura 4.4 - Gráficos *biplot* do ACP para os teores de nutrientes minerais, TC, TM e NBA de quatro clones de *E. dunnii* cultivados sob restrição de nutrientes. A) *Biplot* dos vetores das variáveis originais e B) agrupamento das observações para os componentes principais 1 e 2. C) *Biplot* dos vetores das variáveis originais e D) agrupamento das observações para os componentes principais 3 e 4

Tabela 4.7 – Componentes principais (CP), variância proporcional acumulada (VAC) e correlações significativas das variáveis originais com cada componente, para os teores de nutrientes e variáveis morfofisiológicas de quatro clones de *E. dunnii* cultivados nos tratamentos de omissão

CP	VAC (%)	Variáveis significativas											
		N	P	K	Ca	S	Cu	Fe	Mn	Zn	TM	TC	NBA
CP1	22,6	-	-	-	-	-	-	-	0,49*	-	0,87**	0,81**	0,62**
CP2	39,0	-0,55*	-0,54*	-	0,48*	0,74**	-	0,62**	-	-	-	-	-
CP3	53,5	0,49*	-	0,69**	-	-	-	-	-	0,75**	-	-	-
CP4	64,1	-	0,61**	-	-	-	-0,62**	-	-	-	-	-	0,47°

° =  $P \leq 0,1$ ; \* =  $P \leq 0,05$  e \*\* =  $P \leq 0,01$

Tabela 4.8 – Médias e desvios padrão das variáveis NB, NBA, MST, TM e TC para o meio basal EDMm padrão (FULL) e cada restrição nutricional aos 30 do início do experimento

Restrição nutricional	NB (número explante <sup>-1</sup> )	NBA (número explante <sup>-1</sup> )	PS (mg explante <sup>-1</sup> )	TM	TC
FULL	15,10 ± 6,41 ab	0,60 ± 0,75 a	85,57 ± 31,70 a	3,78 ± 1,60 ab	10,42 ± 2,07 a
-N	11,95 ± 4,58 bcde	0,55 ± 0,83 a	72,25 ± 29,58 a	2,99 ± 1,15 bcde	8,84 ± 2,09 abc
-P	11,60 ± 5,47 bcde	0,20 ± 0,41 a	69,82 ± 28,74 a	2,90 ± 1,37 bcde	8,44 ± 1,86 abcd
-K	10,55 ± 4,06 cde	0,35 ± 0,49 a	74,92 ± 36,59 a	2,64 ± 1,01 cde	8,79 ± 2,74 abcd
-Ca	11,30 ± 2,98 bcde	0,45 ± 0,69 a	75,01 ± 34,44 a	2,83 ± 0,74 bcde	8,98 ± 2,70 abc
-Mg	9,68 ± 3,87 cde	0,32 ± 0,48 a	66,48 ± 36,42 a	2,42 ± 0,97 cde	7,65 ± 2,80 abcd
-S	10,65 ± 3,59 bcde	0,30 ± 0,57 a	65,49 ± 30,84 a	2,66 ± 0,90 bcde	7,79 ± 2,10 abcd
-B	12,45 ± 5,12 bcd	0,55 ± 0,89 a	72,59 ± 36,48 a	3,11 ± 1,28 bcd	8,58 ± 3,00 abcd
-Fe	17,65 ± 7,15 a	0,55 ± 0,76 a	81,59 ± 40,32 a	4,41 ± 1,79 a	9,58 ± 3,18 ab
-Cu	12,05 ± 4,96 bcde	0,55 ± 0,69 a	75,89 ± 38,40 a	3,01 ± 1,24 bcde	8,85 ± 2,95 abcd
-Mn	8,60 ± 3,78 cde	0,30 ± 0,47 a	63,09 ± 28,74 a	2,15 ± 0,94 cde	7,62 ± 2,61 abcd
-Zn	8,45 ± 2,84 de	0,50 ± 0,69 a	70,92 ± 29,85 a	2,11 ± 0,71 de	8,59 ± 2,08 abcd
-Co	8,20 ± 3,12 de	0,60 ± 0,68 a	59,63 ± 28,11 a	2,05 ± 0,78 de	7,12 ± 2,10 bcd
-Mo	7,70 ± 3,18 e	0,40 ± 0,60 a	54,90 ± 29,56 a	1,93 ± 0,80 e	6,55 ± 2,72 cd
-Ni	8,10 ± 3,42 de	0,35 ± 0,49 a	52,33 ± 22,82 a	2,03 ± 0,85 de	6,37 ± 1,80 cd
-NaCl	11,25 ± 4,29 bcde	0,40 ± 0,50 a	62,55 ± 34,00 a	2,81 ± 1,07 bcde	7,26 ± 2,58 bcd
-ORG	12,95 ± 5,05 bc	0,20 ± 0,41 a	67,85 ± 32,05 a	3,24 ± 1,26 bc	8,10 ± 2,92 abcd

Nas colunas, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de  $P = 0,05\%$  segundo o teste de Tukey

O CP1 denota correlações positivas significativas com Mn, NBA, TC e TM, cujos vetores no *biplot* são coincidentes com a localização do EDMm padrão (FULL), indicando que a presença deste nutriente no meio basal é responsável, pelo menos em grande parte, de um melhor desenvolvimento das brotações (Figura 4.4 A e B; Tabela 4.7). Apoiando esta hipótese, as concentrações de Mn sob restrição nutricional foram significativamente menores, assim como o NB e TM (Tabelas 4.8 e 4.9). Contudo, além das respostas observadas, não foi possível identificar sintomas visuais característicos para este nutriente.

Tabela 4.9 – Concentrações médias de nutrientes minerais em brotações de quatro clones de *E. dunnii* para o meio basal EDMm padrão (FULL) e cada restrição nutricional após 30 dias de cultura *in vitro*

Restrição nutricional	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Fe	Mn	Zn
	g kg <sup>-1</sup>						mg kg <sup>-1</sup>			
Full	35,5 a	5,6 a	19,6 abc	7,1 a	1,4 ab	1,7 ab	104,3 b	1173,6 a	607,8 a	181,2 ab
-N	27,6 a	3,7 ab	21,1 abc	8,3 a	1,8 ab	1,6 ab	88,2 b	1075,0 a	651,7 a	164,0 b
-P	35,5 a	1,6 b	21,8 abc	6,1 a	1,4 ab	2,0 a	99,7 b	1101,7 a	509,0 a	177,2 ab
-K	38,8 a	4,7 a	14,3 c	7,3 a	2,1 a	1,6 ab	104,3 b	1140,0 a	600,3 a	181,3 ab
-Ca	40,8 a	4,3 a	18,6 bc	2,0 b	1,3 bc	1,3 bc	92,8 b	857,5 ab	613,7 a	189,8 ab
-Mg	40,4 a	4,5 a	26,8 a	7,1 a	0,7 c	1,8 ab	102,7 b	1148,5 a	630,2 a	217,2 a
-S	36,5 a	3,8 a	22,6 abc	7,4 a	1,7 ab	1,2 c	111,7 ab	985,5 a	616,2 a	188,5 ab
-B	41,8 a	5,2 a	24,8 ab	7,2 a	1,8 ab	1,6 ab	106,7 ab	896,7 a	583,2 a	190,5 ab
-Cu	35,2 a	5,2 a	20,4 abc	6,9 a	1,4 abc	1,5 abc	14,2 c	1067,2 a	531,5 a	188,3 ab
-Fe	37,4 a	5,5 a	21,7 abc	7,2 a	1,7 ab	1,3 bc	142,0 a	420,3 b	587,7 a	191,8 ab
-Mn	39,8 a	4,9 a	18,4 bc	6,1 a	1,3 bc	1,5 abc	94,2 b	945,3 a	51,6 b	197,0 ab
-Zn	36,6 a	4,3 a	17,3 bc	6,4 a	1,4 abc	1,3 bc	95,7 b	1049,2 a	522,3 a	48,0 c
-Co	40,1 a	4,6 a	17,6 bc	6,5 a	1,3 bc	1,3 bc	95,5 b	1066,5 a	543,2 a	179,5 ab
-Mo	40,4 a	4,6 a	19,5 abc	6,7 a	1,6 ab	1,4 bc	101,7 b	1075,5 a	522,7 a	190,2 ab
-Ni	40,4 a	4,1 a	19,1 abc	6,4 a	1,5 ab	1,3 bc	92,0 b	1020,2 a	511,7 a	182,7 ab
-NaCl	38,9 a	4,1 a	21,4 abc	6,9 a	1,6 ab	1,4 bc	89,7 b	1005,7 a	544,7 a	180,2 ab
-ORG	36,8 a	4,1 a	16,1 c	6,4 a	1,2 bc	1,0 c	88,8 b	1006,7 a	549,8 a	182,8 ab

Nas colunas, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de  $P = 0,05\%$  segundo o teste de Tukey

O CP2 apresentou correlações significativas negativas com o N e o P, e positivas com o Ca, S e Fe, sem correlacionar com as variáveis morfológicas, em decorrência de não apresentar diferenças nas respostas morfofisiológicas sob restrição destes nutrientes (Tabela 4.8), mesmo tendo apresentado diferenças no teor dos nutrientes nas brotações sob restrição (Tabela 4.9).

Um efeito similar pode-se observar para o CP3, que apresentou correlações significativas para o N, K e Zn, sem associar-se às variáveis de crescimento. Porém, considerando a ANOVA e posterior teste de Tukey, as restrições de K e Zn exerceram um efeito negativo no NB, TM e nos teores de nutrientes, respostas não detectadas para o N (Tabela 4.8 e 4.9).

No CP4, foram observadas correlações positivas para P e NBA e negativas para Cu, sugerindo que as maiores concentrações de P observadas estão relacionadas a um maior NBA. Este fato foi evidenciado sob restrição deste nutriente, na qual o normal desenvolvimento das brotações foi afetado (Tabela 4.9), porém, sem diferenças significativas em decorrência dos elevados desvios padrão (Tabela 4.8). Por outro lado, a relação dos menores teores de Cu com maior NBA, poderia ser interpretada como um efeito de diluição, uma vez que esse nutriente



não afetou a expressão desta característica na sua omissão do meio EDMm, mesmo que suas concentrações tenham sido reduzidas significativamente (Tabela 4.8 e 4.9).

Os gráficos de *biplot* permitem observar como as observações sob restrição do Fe e do N não se agruparam em diferentes quadrantes em relação do meio basal padrão (FULL) em relação ao CP1 (Figura 4.4 B), mesmo com redução dos teores destes nutrientes nas brotações sob restrição, sendo significativas para o Fe (Tabela 4.8 e 4.9). Isto resulta pela ausência de grandes diferenças nas variáveis morfofisiológicas sob restrição destes nutrientes e no meio padrão EDMm, devido ao fato da restrição nutricional não ter sido suficientemente intensa para provocá-las. Contudo, para ambos os nutrientes foram identificados sintomas de deficiência, clorose nas brotações novas e aparição de calos organogênicos para o Fe (Figura 4.4 D, F e G), e queda de folhas, oxidação e necrose para o N (Figura 4.4 H e I). Neste último caso, deve-se fazer uma distinção em quanto à forma do N, uma vez que o  $\text{NH}_4^+$  foi restrito em maior proporção do que o  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 4.2).

A maioria das plantas, tecidos e órgãos absorvem mais N e crescem mais rapidamente em soluções que contenham as duas fontes de N,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  (GEORGE; DE KLERK, 2008), porém, esta é uma característica que depende da espécie (EDWARDS; HORTON, 1982). Considerando que a omissão de Mo teve efeitos negativos no desenvolvimento dos explantes, pode-se inferir que as brotações de *E. dunnii* estão satisfazendo grande parte da sua demanda de N assimilando o  $\text{NO}_3^-$ , que representa o 75% do N total do meio EDMm (Anexo D). Futuras pesquisas na micropropagação de *E. dunnii* deveriam abordar esta questão e verificar se tanto a concentração final de N, como a proporção  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ , são ótimas neste meio de cultura.

A identificação oportuna destes sintomas poderia contribuir para uma rápida correção das deficiências, minimizando os efeitos negativos dos meios de cultura subótimos. Ao mesmo tempo, as concentrações destes nutrientes sob restrição nutricional deveriam ser consideradas como deficientes para o desenvolvimento normal das brotações de *E. dunnii*.

O fato de não ter-se observado efeito das restrições de Fe e N nas variáveis morfofisiológicas avaliadas é atribuível a que os efeitos provocados são, nesta instância, de natureza qualitativa. Contudo, se o estudo tivesse sido prolongado, o impacto nestas variáveis seria mais evidente, como o caso do NB e NBA na restrição de N, as quais foram contabilizadas uma vez que não apresentaram necrose total nas brotações (Figura 4.4 H e I).

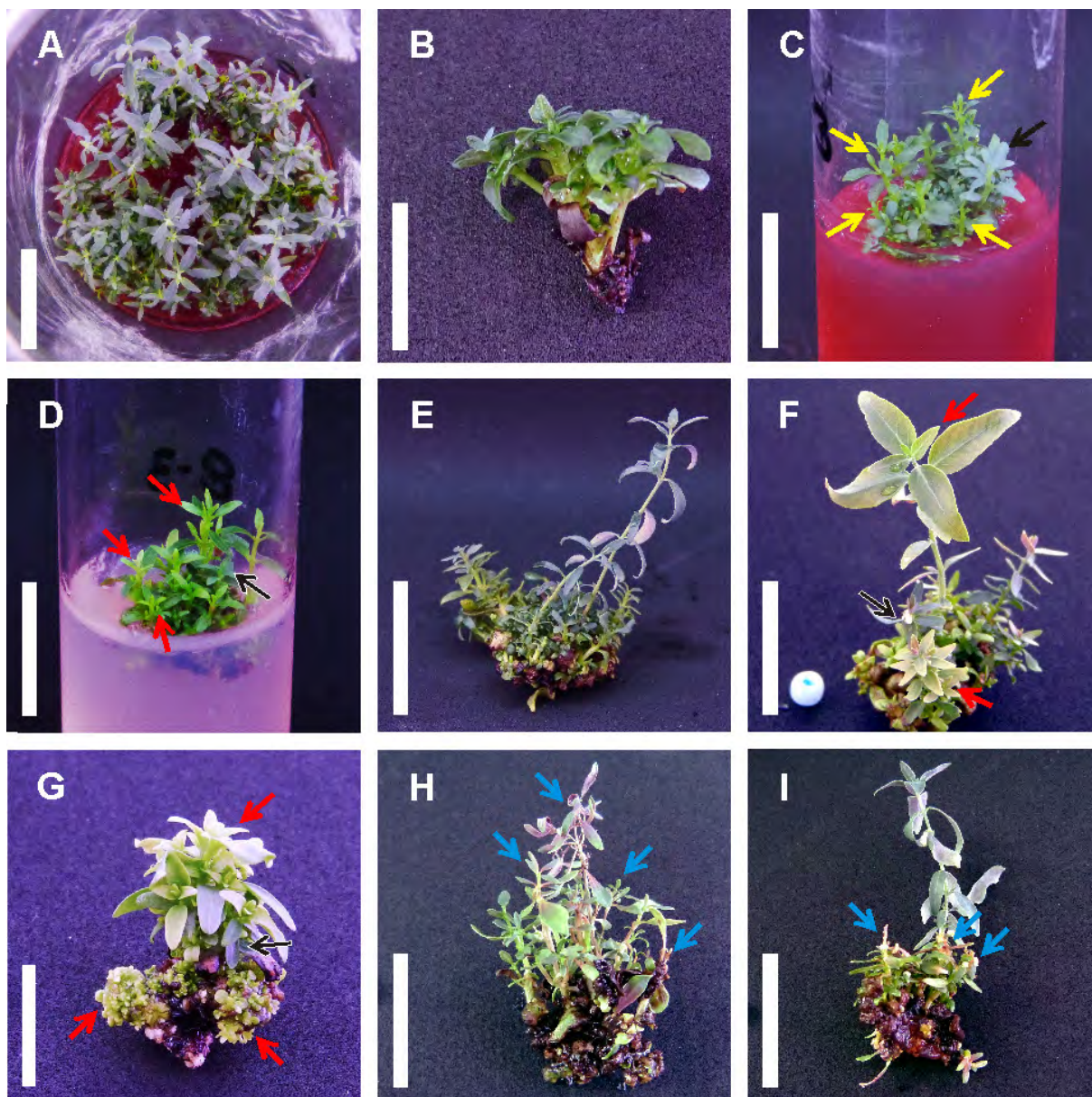


Figura 4.4 – A) Fonte de explantes do clone ED\_020 em meio EDMm; B) detalhe do explante padrão do clone ED\_014; C) brotações do clone ED\_020 aos 10 dias de cultura com grande quantidade de gemas novas em crescimento; D) brotações do clone ED\_020 aos 10 dias de cultura no meio EDMm (-Fe), evidenciando clorose incipiente nas brotações novas, as brotações originais continuam verdes. Brotações de 30 dias de idade; E) do clone ED\_020 em meio EDMm completo; F) do clone ED\_023 em meio EDMm (-Fe); G) do clone ED\_021 em meio EDMm (-Fe); H) do clone ED\_020 no meio EDMm (-N) e I) do clone ED\_023 no meio EDMm (-N). Barras = 2 cm em A, C, D, E, F, H e I; = 1cm em B e G. Setas amarelas = brotações novas normais; setas vermelhas = brotações novas com clorose; setas pretas = brotações do explante original; setas azuis = necrosis dos ponteiros

Todos os nutrientes minerais analisados, com exceção do N, apresentaram uma queda significativa nas suas concentrações nas brotações quando restritos e/ou omitidos do meio basal EDMm (Tabela 4.9). Contudo, ressalta-se que a deficiência ou excesso de um elemento não induz diretamente a aparição de um ou mais sintomas, sendo os efeitos iniciais: um desequilíbrio nos processos metabólicos; o acúmulo de alguns produtos intermediários

enquanto produtos finais não são produzidos em quantidades suficientes; e o retardo ou queda do metabolismo energético (BERGMANN, 1992). Estas afirmações explicam, em parte, por que não foram identificados sintomas adicionais para nutrientes que apresentaram uma queda nos teores das brotações, quando restritos e/ou omitidos do meio basal EDMm (Tabela 4.9).

O teor dos micronutrientes metálicos Co, Ni e Mo nas brotações não foi analisado por limitações na quantidade de material vegetal, conseqüentemente, não foram incluídas na ACP. Mesmo assim, foi possível observar que a omissão destes nutrientes provocou menor desenvolvimento das brotações (Tabelas 4.8 e 4.9). Estas respostas indicam que a presença destes minerais no meio basal é de grande relevância para manter o adequado desenvolvimento das brotações. Tanto o Ni como o Mo estão envolvidos no metabolismo do N, fato que poderia explicar a sua importância. O Co, embora tenha demonstrado efeitos benéficos nas plantas superiores e seja mencionado como inibidor da síntese de etileno (ROUSTAN; LATSHE; FALLOT, 1989; TAIZ; ZEIGER, 2006), é considerado essencial apenas para leguminosas fixadoras de N (BERGMANN, 1992).

A omissão de NaCl do meio EDMm afetou ao crescimento das brotações, fato evidenciado no ACP (Figura 4.4 A e B) e pela menor TM em relação das brotações desenvolvidas no EDMm completo (Tabela 4.6). Embora o Na em baixas concentrações seja reconhecido como um elemento benéfico para as plantas por sua capacidade de substituir parcialmente ao K (SUBBARAO et al., 2003; RAPOSO ALMEIDA et al., 2010; KRONZUCKER et al., 2013), as respostas observadas sob omissão de NaCl dificilmente possam ser atribuídas a esta suposição, considerando as concentrações omitidas em relação dos teores de K no meio EDMm completo (Tabela 4.2). Por outro lado, o Cl participa na fotossíntese e no controle estomático e tem demonstrado beneficiar o crescimento em muitas culturas (MARSCHNER, 1995; CHEN et al., 2010). Contudo, na cultura de tecidos são abundantes apenas as referências em relação aos efeitos negativos destes nutrientes, provavelmente em decorrência das concentrações utilizadas, geralmente maiores a 20 mmol L<sup>-1</sup> (MORABITO et al., 1994; CHEN et al., 1998; KENNEDY; DE FILIPPIS, 1999; SOUZA et al., 2002; ALVAREZ et al., 2003; EHSANPOUR; FATAHIAN, 2003; SHIBLI et al., 2003).

Nem a restrição de S nem a omissão da fração orgânica afetaram às respostas morfofisiológicas em forma significativa, porém, apresentaram níveis significativamente baixos de S nas brotações (Tabelas 4.8 e 4.9). A Cisteína, que compõe a fração orgânica do meio EDMm, é o primeiro aminoácido sintetizado pelas plantas no metabolismo do S e contém 27% deste nutriente. Possivelmente, o S orgânico é absorvido e metabolizado pelas

brotações de *E. dunnii* com maior preferência do que o S inorgânico, pelo menor custo energético ou porque exerce algum efeito sinérgico na assimilação do S inorgânico.

Além das interações entre nutrientes, claramente identificadas através do ACP e já discutidas, os *biplots* sugerem a existência de interações adicionais, que são evidenciadas apenas quando considerados os resultados individuais das variáveis. O caso mais evidente é do antagonismo do Mg e o K. Tanto o K como o Mg afetaram negativamente o NB e a TM enquanto suas concentrações decresceram quando aplicada a restrição, incrementando as concentrações do segundo nutriente (Tabelas 4.8 e 4.9). Neste sentido, a deficiência de Mg por competência com outros cátions, dentre eles o K, é um fenômeno amplamente conhecido (HAWKESFORD, 2012), fato que deveria ser considerado quando incrementados os níveis destes nutrientes de forma separada nos meios de cultura.

Vários dos nutrientes omitidos parcial ou totalmente do meio EDMm, não apresentaram efeitos apreciáveis no desenvolvimento *in vitro* das brotações de *E. dunnii*. Estas respostas podem ser atribuídas ao fato que a intensidade da restrição imposta não foi suficiente para induzir as deficiências nos 30 dias de cultura, que no caso dos macronutrientes e o Fe, foi apenas parcial e passível de ser incrementada. Para os restantes micronutrientes, a omissão total não provocou sintomas visuais, porém, com exceção do B e Cu, restrições ao normal desenvolvimento foram observadas e, provavelmente, um segundo subcultivo nas mesmas condições tivesse magnificado os efeitos e expressado sintomas mais característicos.

Estas respostas também sugerem que o meio de cultura EDMm, que vinha sendo utilizado para multiplicar o material empregado no experimento proveu as condições adequadas para que as brotações se desenvolvessem e acumulassem nutrientes, na forma de substâncias orgânicas ou íons de nutrientes no simplasto ou no apoplasto, que sustentaram, em maior ou menor medida, o crescimento das brotações nas distintas restrições nutricionais.

Se a deficiência de um elemento não for considerável e os sintomas visuais não estiverem presentes, a inibição do crescimento será apenas detectada. Deficiências destas magnitudes são denominadas “deficiências latentes” (BERGMANN, 1992). Os sintomas são claramente visíveis quando a deficiência é importante e o crescimento é reduzido (RÖMHELD, 2012). No entanto, neste estudo, a deficiência de Fe se manifestou apenas através da clorose nas folhas (Figura 4.4 D, F e G), sem afetar o desenvolvimento das brotações, fato atribuível à função do Fe na fotossíntese e às condições mixotróficas da cultura de tecidos. Por outro lado, a restrição de Fe provocou um maior acúmulo de Cu nos tecidos, resposta que pode estar relacionada ao incremento na atividade da CuZnSOD, já observada em plantas deficientes de Fe como mecanismo compensatório da baixa atividade da

FeSOD (ITURBE-ORMAETXE et al., 1995; SHARMA; KUMAR; TEWARI, 2004; TEWARI et al., 2005).

No decorrer destas experiências, foi possível observar a grande influência da composição mineral dos meios de cultura no crescimento e desenvolvimento das brotações de *E. dunnii*. Dentre eles, alguns nutrientes como o N, K, Mg, Mn, Fe, Zn, Co, Mo e Ni foram os mais relevantes na modulação das respostas quantitativas e/ou qualitativas, evidenciando a importância da sua disponibilidade em níveis adequados no meio de cultura.

A variação introduzida pelas respostas características de cada genótipo dificultou a identificação de efeitos adicionais, aspecto esperado e não aprofundado neste trabalho, uma vez que a finalidade principal foi criar um meio basal genérico para *E. dunnii*. A otimização do meio basal para materiais genéticos específicos poderia ser abordada em futuros estudos, adequando os requerimentos nutricionais para cada caso particular e utilizando como base os resultados destas experiências. Além disso, estudos mais aprofundados do controle genético da capacidade de propagação de indivíduos/progênes poderiam contribuir para que a aplicação deste conjunto de técnicas e metodologias seja mais eficiente, incrementando no conjunto a disponibilidade de material de propagação da espécie.

#### 4.6 Conclusões

- Todos os meios basais testados possibilitaram a multiplicação e o alongamento *in vitro* das brotações de *E. dunnii*.
- O enraizamento adventício *ex vitro* das microestacas de *E. dunnii* foi favorecido quando as brotações foram desenvolvidas no meio basal EDMm.
- Os teores de Ca, Cu, Fe, Mn e Zn, determinados nas brotações desenvolvidas no meio EDMm, estão associados ao maior ER e as menores TM e TC.
- As concentrações dos macronutrientes S e K, determinadas nas brotações desenvolvidas nos meios MS e WPM, estão relacionadas com as maiores TM e TC.
- O maior acúmulo de N nas brotações desenvolvidas nos meios basais testados está associado a um menor NBA e menor ER.
- A omissão de K, Mg, Mn, Zn, Mo, Ni, Co ou NaCl do meio EDMm afetou ao desenvolvimento *in vitro* das brotações de *E. dunnii*.
- O sintoma de clorose nas folhas e a aparição de calos organogênicos nas brotações de *E. dunnii* é provocado pela deficiência de Fe.

- O sintoma de oxidação e queda de folhas de brotações dominantes dos tufos de *E. dunnii* está associado à restrição de N do meio EDMm.

## Referências

ADELBERG, J.; DELGADO, M.; TOMKINS, J. Spent medium analysis for liquid culture micropropagation of *Hemerocallis* on Murashige and Skoog medium. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 46, n. 1, p. 95–107, 2010.

ALMEIDA, L.V. **Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K.D. Hill & L.A.S. Johnson**. 2012. 106 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11150/tde-02012013-101147/>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

ALVAREZ, I.; TOMARO, M.L.; BENAVIDES, M.P. Changes in polyamines, proline and ethylene in sunflower calluses treated with NaCl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, n. 1, p. 51-59, 2003.

ARANDA-PERES, A.N.; PERES, L.E.P.; HIGASHI, E.N.; MARTINELLI, A.P. Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea* Bromeliads from the Brazilian Atlantic Forest: the importance of calcium. **Hortscience**, Alexandria, v. 44, n. 1, p. 106-112, 2009.

BACCHETTA, L.; ARAMINI, M.; BERNARDINI, C.; RUGINI, E. *In vitro* propagation of traditional Italian hazelnut cultivars as a tool for the valorization and conservation of local genetic resources. **Hortscience**, Alexandria, v. 43, n.2, p. 562-566, 2008.

BERGMANN, W. **Nutritional disorders of plants: development, visual and analytical diagnosis**. Jena; Stuttgart; New York: Gustav Fischer, 1992. 741 p.

BILLARD, C.E.; LALLANA, V.H. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, Curitiba, v. 16, n. 30, p. 199-216, 2005. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14503008>>. Acesso em: 08 fev. 2014.

BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. **Plant tissue culture: theory and practice**. Amsterdam: Elsevier, 1996. 767 p.

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistics Society. Series B (Methodological)**, London, v. 26, n. 2, p. 211–234, 1964.

BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. Function of nutrients: micronutrients. In: MARSCHNER, P. (Ed.). **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2012. p. 191-248.

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

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; GROSSI F.; HANSEL, F.A.; ARAÚJO, M. A. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum. Agronomy** Maringá, v. 33, n. 4, p. 655-663, 2011.

CHEN, D.M.; KEIPER, F.J.; FILIPPIS, L.F. Physiological changes accompanying the induction of salt tolerance in *Eucalyptus microcorys* shoots in tissue culture. **Journal of Plant Physiology**, Philadelphia, v. 152, n. 4/5, p. 555-563, 1998.

CHEN, W.; HE, Z.L.; YANG, X.E.; MISHRA, S.; STOFFELLA, P.J. Chlorine nutrition of higher plants: progress and perspectives. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 33, n. 7, p. 943-952, 2010.

CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp in vitro em meio de cultura líquido e sólido**. 1993. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

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

DANTAS, A.K.; MAJADA, J.P.; FERNÁNDEZ, B.; CAÑAL, M.J. Mineral nutrition in carnation tissue cultures under different ventilation conditions. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 33; n. 3, p. 237-243, 2001.

DELL, B.; MALAJCZUK, N.; XU, D.; GROVE, T.S. **Nutrient disorders in plantation eucalypts**. 2<sup>nd</sup> ed. Canberra: Australian Center for International Agricultural Research, 2001. 188 p.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 58, n. 1, p 49-59, 2009.

EDWARDS, J.; HORTON, B.D. Interaction of peach seedlings to NO<sub>3</sub>:NH<sub>4</sub> ratios in nutrient solutions. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 107, n. 1, p. 142-147, 1982.

EHSANPOUR, A.A.; FATAHIAN, N. Effects of salt and proline on *Medicago sativa* callus. **Plant Cell, Tissue and Culture**, Dordrecht, v. 73, n. 1, p. 53-56, 2003.

ELSTNER, E.F. Oxygen activation and oxygen toxicity. **Annual Review on Plant Physiology**, Palo Alto, v. 33, p. 73-96, 1982.

GABRIEL, K.R.; ODOROFF, C.L. Biplots in biomedical research. **Statistics in Medicine**, Chichester, v. 9, n. 5, p. 469-485, 1990.

GASPAR, T.; PENEL, C.; CASTILLO, F.; GREPPIN, H. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 64, n. 3, p. 418–423, 1985.

GEORGE, E.F.; DEBERGH, P.C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G-J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 29-64.

GEORGE, E.F.; DE KLERK, G-J. The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. In: GEORGE E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G-J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 65-113.

GLOCKE, P.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. 6-Benzylamino purine stimulates *in vitro* shoot organogenesis in *Eucalyptus erythronema*, *E. stricklandii* and their interspecific hybrids. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 109, n. 4, p. 339-344, 2006.

GRAÇA, M.E.C. **Enraizamento *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii* utilizando altas concentrações de auxinas**. Colombo: EMBRAPA, CNPF, 1997. 3 p. (Pesquisa em Andamento, 48).

GRAÇA, M.E.C.; MENDES, S. Micropropagation of *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Annales des Sciences Forestières**, Les Ulis Cedex, v. 46, n. 2, p. 140-144, 1989.

GRAÇA, M.E.C.; KALIL, A.N.; MEDEIROS, A.C.S.; TAVARES, F.R. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 43, p. 107-112, 2001.

GRIBBLE, K.; CONROY, J.P.; HOLFORD, P.; MILHAM, P.J. *In vitro* uptake of mineral by *Gypsophila paniculata* and hybrid eucalypt, and relevance to media mineral formulation. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 50, n. 6, p. 713-723, 2002.

HALLORAN, S.M.; ADELBERG, J. A macronutrient optimization platform for micropropagation and acclimatization: using turmeric (*Curcuma longa* L.) as a model plant. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 47, n. 2, p. 257–273, 2011.

HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H.; SCHJOERRING, J.; MØLLER, I.S.; WHITE, P. Functions of macronutrients. In: MARSCHNER, P. (Ed.), **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2012. p. 135–189.

HIGASHI, E.N. **Diagnose da eficiência de nutrientes minerais em três híbridos de *Eucalyptus spp.* cultivados *in vitro***. 1996. 90 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.



HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N. **Omissão dos nutrientes minerais na produção de matéria seca, aspectos nutricionais e bioquímicos em *Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden) cultivados *in vitro***. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Ciências Florestais, Laboratório de Fisiologia das Árvores, 2006. 70 p.

ITURBE-ORMAETXE, I.; MORAN, J.F.; ARRESE-IGOR, C.; GOGORCENA, Y.; KLUCAS, R.V.; BECANA, M. Activated oxygen and antioxidant defences in iron-deficient pea plants. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 18, p. 421–429, 1995.

KENNEDY, B.F.; FILIPPIS, F.D. Physiology and oxidative response to NaCl of the salt tolerant *Grevillea ilicifolia* and salt sensitive *Grevillea arenaria*. **Journal of Plant Physiology**, Philadelphia, v. 155, n. 6, p. 746-754, 1999.

KLIEBENSTEIN, D.J.; MONDE, R.A.; LAST, R.L. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 2, p. 637–650, 1998.

KOTHARI, S.L.; AGARWAL, K; KUMAR, S. Inorganic nutrient manipulation for highly improved *in vitro* plant regeneration in finger millet—*Eleusine coracana* (L.) Gaertn. **In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 515–519, 2004.

KRONZUCKER, H.J.; COSKUN, D.; SCHULZE, L.M.; WONG, J.R.; BRITTO, D.T. Sodium as nutrient and toxicant. **Plant Soil**, The Hague, v. 369, n. 1/2, p. 1–23, 2013.

JOLLIFFE, I.T. **Principal component analysis**. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2002. 502 p.

LE ROUX, J.J.; VAN STADEN, J. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus*: a review. **Tree Physiology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 435-477, 1991.

LI, S.W.; XUE, L.; XU, S.; FENG, H.; AN, L. Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. **The Botanical Review**, Berlin, v. 75, n. 2, p. 230–247, 2009.

LLOYD, G.; MCCOWN, B.H. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagation Society**, Ashville, v. 30, p. 421-427, 1980.

MALYSZ, M.; CADORE, D.; TIBOLA, E.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CANSIAN, R.L.; MOSSI, J.A. Desinfestação e micropropagação de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Perspectiva**, Erechim, v. 35, n. 131, p. 69-77, 2011.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1995. 889 p.

MEZZETTI, B.; ROSATI, P.; CASALICCHIO, G. *Actinidia deliciosa* C.F. Liang *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 25, n. 2, p. 91-98, 1991.

MOLASSIOTIS, A.N.; DIMASSI, K.; THERIOS, I.; DIAMANTIDIS. Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* x *P. persica*) explants *in vitro*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 47, n. 1, p. 141-144, 2003.

MONCALEAN, P.; CAÑAL, M.J.; FEITO, I.; RODRIGUEZ A.; FERNANDEZ, B. Cytokinins and mineral nutrition in *Actinidia deliciosa* (Kiwi) shoots cultured *in vitro*. **Journal Plant Physiology**, Stuttgart, v. 155, n. 4/5, p. 606–612, 1999.

MONTEIRO, A.C.B.A.; HIGASHI, E.N.; GONÇALVES, A.N.; RODRIGUEZ, A.P.M. A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. F. *flaviacarpa* Deg.). **In Vitro Cell & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 36, n. 6, p. 527-531, 2000.

MORABITO, D.; MILLS, D.; PRAT, D.; DIZENGREMEL, P. Response of clones of *Eucalyptus microtheca* to NaCl *in vitro*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 201-210, 1994.

MORARD, P; HENRY, M. Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture medium. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v 21, n. 8, p. 1565–1576, 1998.

MORENO, R.J.L.; MORALES, A.V.; GRADAILLE, M.D.; GÓMEZ, L. Towards scaling-up the micropropagation of *Juglans major* (Torrey) Heller var. 209 x *J. regia* L., a hybrid walnut of commercial interest. In: IUFRO WORKING PARTY CONFERENCE ON “INTEGRATING VEGETATIVE PROPAGATION, BIOTECHNOLOGIES AND GENETIC IMPROVEMENT FOR TREE PRODUCTION AND SUSTAINABLE FOREST MANAGEMENT”, Brno, 2012. **Proceedings...** Disponível em: <<http://www.iufro20902.org/>>. Acesso em: 05 dez. 2012.

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

NAS, M.N.; READ, P.E. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 101, n. 1/2, p. 189–200, 2004.

NAVROSKI, M. C. **Multiplicação *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2011. 101 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

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**, Lavras, v. 19, n. 4, p. 545-550, 2013.

OLIVEIRA, Y.; GOMES ADAMUCHIO, L.; OLIVEIRA, C.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; GERHARDT, I.; BESPALHOK, J.C.F.; DIBAX, R.; QUOIRIN, M. Indirect organogenesis from leaf explants of *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii* and shoot multiplication. **BMC Proceedings**, London, v. 5, n. 7, p. 145, 2011.

- PINTO, G.; SILVA, S.; PARK, Y.-S.; NEVES, L.; ARAUJO, C.; SANTOS, C. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill: Basal medium and anti-browning agents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 95, n. 1, p. 79-88, 2008.
- PREECE, J.E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? **Plant Tissue Culture Biotechnology**, Rohovot, v. 1, n. 1, p. 26–37, 1995.
- R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 05 maio 2013.
- RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 38, n. 2, p. 116-124, 2002.
- RAPOSO ALMEIDA, J.C.; LACLAU, J.P.; DE MORAES GONÇALVES, J.L.; RANGER, J.; SAINT-ANDRÉ, L. A positive growth response to NaCl applications in *Eucalyptus* plantations established on K- deficient soils. **Forest ecology and management**, Amsterdam, v. 259, n. 9, p. 1786-1795, 2010.
- ROUSTAN, J.P.; LATCHE, A.; FALLOT, J. Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 8, n. 3, p.182–185, 1989.
- RÖMHELD, V. Diagnosis of deficiency and toxicity of nutrients. In: MARSCHNER, P. (Ed.). **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2012. p. 299–312.
- RUGINI, E. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 24, n. 2, p. 123-134, 1984.
- SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1974. 56 p.
- SHARMA, P.N.; KUMAR, P.; TEWARI, R.K. Early signs of oxidative stress in wheat plants subjected to zinc deficiency. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 27, p. 449–461, 2004.
- SHIBLI, R.A.; SHATNAWI, M.A.; SWAIDAT, I.Q. Growth, osmotic adjustment, and nutrient acquisition of bitter almond under induced sodium chloride salinity *in vitro*. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Oxfordshire, v. 34, n. 13/14, p. 1969-1979, 2003.
- SOUZA, G.M.; GONÇALVES, A.N. Otimização do meio de cultura para a bananeira (*Musa cavendishii* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 51-59, 1996.
- SOUZA, G.M.; CARDOSO, V.J.M.; GONÇALVES, A.N. Efeito da salinidade e subnutrição em plantas de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro*. **Naturalia**, Rio Claro, v. 27, p. 95-105, 2002.

SUBBARAO, G.V.; ITO, O.; BERRY, W.L.; WHEELER, R.M. Sodium: a functional plant nutrient. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v. 22, p. 391–416, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 4<sup>th</sup> ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2006. 705 p.

TEWARI, R.K.; KUMAR, P.; SHARMA, P.N. Signs of oxidative stress in the chlorotic leaves of iron starved plants. **Plant Science**, Limerick, v. 169, p. 1037–1045, 2005.



## 5 ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS GENÉTICOS PARA CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS *IN VITRO* DE *Eucalyptus dunnii*

### Resumo

O genótipo é provavelmente o fator de maior influência ao determinar os níveis de enraizamento adventício nos diversos sistemas de propagação empregados na silvicultura clonal. Uma das abordagens utilizadas para afrontar esta característica consiste de intensas triagens para indivíduos com boas taxas de enraizamento para usá-los como clones. Porém, este procedimento acarreta a perda de muitos genótipos com boas características silviculturais. A estimativa de parâmetros genéticos relacionados à capacidade de propagação vegetativa pode contribuir para o planejamento de estratégias de melhoramento de *E. dunnii* com o objetivo de melhorar estes caracteres e aumentar a capacidade de propagação da população. Para testar esta hipótese, foram estimados parâmetros genéticos para características morfofisiológicas *in vitro* em 20 famílias de polinização aberta de *E. dunnii* através do uso do software SELEGEN REML/BLUP. Os resultados obtidos indicaram que o enraizamento adventício (ER) e o comprimento de raízes (CR) apresentam baixas herdabilidades. Entretanto, herdabilidades de moderadas a elevadas foram determinadas para o comprimento das brotações (CB), número de raízes (NR), regeneração de gemas (RG), número de gemas por explante (NG) e regeneração de calos (RC), evidenciando elevado controle genético. Ao mesmo tempo, correlações genéticas positivas e de elevada magnitude para ER-NR e ER-CB indicam que a seleção de indivíduos por maior NR ou CB pode gerar uma melhora do ER em forma indireta, e estimativamente com maiores ganhos do que a seleção direta.

Palavras-chave: Melhoramento genético florestal; Herdabilidade; Correlações genéticas; Seleção indireta; Propagação vegetativa

### Abstract

The genotype is possibly the factor that has most influence on adventitious rooting across the different clonal forestry propagation systems. One common approach to deal with this issue is to make screenings for more willing to root genotypes and to use them as clones; however, this procedure involves the risk of losing genotypes with good silvicultural traits in the process. Genetic parameters estimation can contribute to the development of *E. dunnii* breeding strategies to improve characters linked to the vegetative propagation ability. For that purpose, genetic parameters were estimated for *in vitro* morphophysiological traits in 20 open-pollinated families of *E. dunnii* using the SELEGEN REML/BLUP software. The results showed that adventitious roots (ER) and roots length (CR) have low heritability. However, the shoot length (SL), number of roots (NR), bud regeneration (RG), number of buds per explant (NG) and callus regeneration (CR) showed moderate to high heritability, implying a strong genetic control. At the same time, high positive genetic correlations were determined for ER-NR and ER-CB enabling the selection of individuals for higher NR or CB to indirectly improve the ER, with estimative higher gains when compared to direct selection.

Keywords: Tree breeding; Heritability; Genetic correlations; Indirect selection; Vegetative propagation

## 5.1 Introdução

O incremento dos ganhos genéticos por meio da clonagem constitui uma estratégia usual para o melhoramento genético de eucaliptos tropicais e subtropicais (RUAUD et al., 1999; WHITE; ADAMS; NEALE, 2007). A sua aplicação tem sido difícil para espécies temperadas, em decorrência dos elevados níveis de indivíduos recalcitrantes ao enraizamento (MAC RAE; COTTERILL, 1997). Para estas espécies, a aplicação da silvicultura clonal se torna complexa, requerendo intensas triagens de genótipos que combinem boas características silviculturais, tecnológicas e capacidade de propagação (WILSON, 1992). Neste processo, muitos genótipos são descartados nas espécies recalcitrantes devido à grande pressão de seleção por capacidade de enraizamento adventício, resultando na perda de variabilidade genética nas populações de melhoramento e de produção. Torna-se evidente que a elaboração de estratégias para melhoramento genético em espécies recalcitrantes ao enraizamento é necessária para garantir a disponibilidade de material de propagação de qualidade.

O genótipo constitui um fator condicionante na propagação *in vitro*, tanto para o crescimento como para a regeneração das células e tecidos (GAHAN; GEORGE, 2008). Na organogênese, as diferenças nas respostas entre progênies sugerem a existência de fatores genéticos que controlam este caráter, que estão associados aos processos de desenvolvimento *in vitro* (CHRISTIANSON; WARNICK, 1988), fato já comprovado em algumas espécies vegetais (REISCH; BINGHAM, 1980; KOORNNEEF; HANHART; MARTINELLI, 1987; WAN; SORENSEN; LIANG, 1988). Neste sentido, para *E. grandis*, foi evidenciado que existe variação genética entre e dentro das famílias quanto à capacidade de morfogênese de gemas (SOBROSA; CORDER 2003), característica que se encontra sob elevado controle genético (BRAVO et al., 2008).

No controle do enraizamento adventício, o amplo arranjo de processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos sugere um complexo controle genético (GEISS et al., 2010). Estudos em *Pinus taeda* (GREENWOOD; WEIR, 1994), *E. grandis*, *E. urophylla* (GRATTAPAGLIA; BERTOLUCCI; SEDEROFF, 1995), *E. tereticornis*, *E. globulus* (MARQUES et al., 1999) e *Quercus robur* (SCOTTI-SAINTEAGNE et al., 2005) indicam à competência para formar raízes adventícias como um caráter genético quantitativo. Neste sentido, Ruaud et al. (1999), estudando a habilidade de enraizamento *in vitro* em *E. globulus*, detectaram variações genéticas aditivas significativas, porém, sob baixo controle genético.

Segundo Falconer e Mackay (1996), o grau de controle genético de uma característica sob determinadas condições pode ser definido pela herdabilidade, definida por Lush (1940) como a proporção da variância fenotípica, causada por efeitos herdáveis. Mais

especificamente, Visscher, Hill e Wray (2008) a definem como a proporção da variância total em uma população, para uma variável avaliada em uma data ou idade particular, que é atribuída a uma variação nos valores genéticos aditivos ou totais, denominados herdabilidade no sentido restrito ( $h^2$ ) e herdabilidade no sentido amplo ( $H^2$ ), respectivamente. Valores próximos de zero para um caráter denotam que grande parte da variação fenotípica encontrada é causada pelo ambiente e que as diferenças genéticas pouco contribuem para as diferenças fenotípicas. Ao contrário, valores próximos de 1 (um) indicam um forte efeito do genótipo nas diferenças fenotípicas. A herdabilidade constitui um parâmetro chave na genética quantitativa aplicada ao melhoramento genético (PIEPHO; MÖHRING, 2007). Dentre outros aspectos, este parâmetro define as estratégias de melhoramento mais apropriadas para a espécie em questão (WHITE; ADAMS; NEALE, 2007).

Um dos métodos mais empregados no melhoramento genético florestal para estimar os componentes da variância é o REML (máxima verossimilhança restrita), este método apresenta maior eficiência da análise da variância em análises de dados de testes florestais, os quais, frequentemente, apresentam desbalanceamento (FARIAS NETO; RESENDE, 2001; WHITE; ADAMS; NEALE, 2007).

Tanto no melhoramento genético vegetal como no animal, muitas características de importância apresentam distribuição binomial, como é o caso da avaliação da resistência a pragas e doenças ou estresses térmicos ou hídricos. Estas características de limiar possuem uma continuidade subjacente, porém, com um limiar que impõe uma descontinuidade sobre a expressão fenotípica (RESENDE, 2002). Neste sentido, o método REML tem demonstrado ser muito robusto para a análise de dados que não cumpram com a hipótese de normalidade da escala subjacente (BANKS et al., 1985; WESTFALL, 1987). Esta característica permite o uso de dados individuais de variáveis binomiais (0/1), ao invés das médias transformadas das parcelas, fato que melhora as estimativas dos parâmetros genéticos para este tipo de variáveis (LOPES; HUBER; WHITE, 2000). Contudo, uma vez obtidas, estas herdabilidades precisam ser transformadas para a escala normal para fins comparativos (McGUIRK, 1989; TENESA; HALEY, 2013).

O grau de associação genética entre características pode ser expressa pelas correlações genéticas, decorrente de efeitos pleiotrópicos, nos quais um locus de um determinado gene influi na expressão de mais de uma característica (MODE; ROBINSON, 1959; FALCONER; MACKAY, 1996). A existência de correlações genéticas elevadas determina que a seleção de indivíduos/populações por um caráter afeta os outros caracteres (HAZEL, 1943; VENCOVSKY, 1992), evento chamado de seleção indireta. As correlações genéticas de dois



caracteres avaliados na escala binomial, ou um caráter avaliado na escala binomial e outro na escala normal, são equivalentes nas duas escalas, fazendo-se desnecessária qualquer correção (McGUIRK, 1989; MÄNTYSAARI; QUAASP; GRÖHN, 1991).

Para um caráter de distribuição normal, o diferencial de seleção ( $ds$ ) pode ser predito com base na proporção de indivíduos selecionados em relação à população original. Porém, para caracteres de limiar, o  $ds$  atingido será sempre menor ou igual que isto, uma vez que ele depende da incidência da característica em questão (McGUIRK, 1989). Uma alternativa para o melhoramento de caracteres de limiar de baixa herdabilidade envolve a seleção indireta destas características através da seleção de características com distribuição contínua que estejam geneticamente correlacionadas (McGUIRK, 1989; RESENDE, 2002).

O software Selegen REML/BLUP (REZENDE; OLIVEIRA, 1997), amplamente utilizado no melhoramento de plantas perenes, constitui uma ferramenta que permite a estimação dos componentes de variância por máxima verossimilhança restrita (REML) e a predição de valores genéticos pela melhor predição linear não viciada (BLUP), mesmo como a obtenção das correlações genéticas (RESENDE, 2002, 2007).

Com a finalidade de determinar o grau de controle genético de características relacionadas à capacidade de propagação, assim como a possibilidade de utilizá-las no melhoramento genético, foram estimadas as herdabilidades e as correlações genéticas para caracteres morfofisiológicos *in vitro* de segmentos de hipocótilos e de brotações de *E. dunnii* aos 30 e 60 dias de cultura, respectivamente.

### 5.1.1 Hipóteses

- As características morfofisiológicas *in vitro* para *E. dunnii* estão sob controle genético e são correlacionadas.
- A seleção indireta do enraizamento representa uma alternativa à seleção direta quando a incidência do caráter é elevada e há elevada correlação genética com caracteres avaliados de distribuição contínua.

### 5.1.2 Objetivos

- Determinar o controle genético e as correlações genéticas em características morfofisiológicas *in vitro* para 20 progênies de polinização aberta de *E. dunnii*.
- Determinar o ganho genético predito para a seleção direta e indireta do enraizamento adventício.

## 5.2 Material e métodos

### 5.2.1 Material vegetal

Foram utilizadas sementes de 20 progênes de polinização aberta, selecionadas em um pomar de sementes por mudas (PSM) do INTA, localizado em Del Valle, Buenos Aires, Argentina (35° 51'52''S; 60° 43'40''O), evitando indivíduos aparentados com base nos registros de *pedigree* (Tabela 5.1). As sementes foram desinfestadas e semeadas *in vitro* seguindo os procedimentos detalhados no item 2.2.4.

Para o experimento I (enraizamento), foram utilizadas brotações obtidas de plântulas germinadas *in vitro* de 45 dias de idade, obtidas através de corte com tesoura cirúrgica na base do primeiro entrenó, composta pelo ápice e um ou dois pares de folhas verdadeiras desenvolvidas (Figura 2.2 B). No experimento II (organogênese), foram utilizadas seções distais de hipocótilos de plântulas germinadas *in vitro* de 14 dias de idade (Figura 3.1). Em ambos os experimentos, foi obtido um explante de cada plântula, equivalente a um genótipo.

Tabela 5.1 – Progênie, origem e/ou procedência das matrizes do PSM fornecedoras das sementes

Progênie	Origem/procedência
01R10	Oliveros, Santa Fe, Argentina
05R12	Oliveros, Santa Fe, Argentina
17R10	South of Yabra SF, NSW, Austrália
18R10	South of Yabra SF, NSW, Austrália
22R05	Death Horse Track, East of Lagune, NSW, Austrália
23R02	Death Horse Track, East of Lagune, NSW, Austrália
25R09	Death Horse Track, East of Lagune, NSW, Austrália
27R16	Death Horse Track, East of Lagune, NSW, Austrália
28R16	Death Horse Track, East of Lagune, NSW, Austrália
32R04	Death Horse Track, East of Lagune, NSW, Austrália
36R02	Death Horse Track, East of Lagune, NSW, Austrália
37R06	Death Horse Track, East of Lagune, NSW, Austrália
46R07	Death Horse Track, East of Lagune, NSW, Austrália
56R03	Oaky Creek, NSW, Austrália
58R10	Oaky Creek, NSW, Austrália
59R04	Oaky Creek, NSW, Austrália
66R13	Boomi Creek, NSW, Austrália
67R07	Boomi Creek, NSW, Austrália
69R02	Boomi Creek, NSW, Austrália
73R13	Acacia Creek, NSW, Austrália

### 5.2.2 Meios de cultura e condições de crescimento

Para a germinação *in vitro* das sementes, foi empregado o meio basal EDM (Tabela 2.4, p.48) sem sacarose e sem reguladores de crescimento. Para o experimento I, foi utilizado

o meio basal EDMm (o,o-EDDHA/Fe<sup>3+</sup> como fonte de ferro) (Tabela 4.1), com adição de sacarose 20 g L<sup>-1</sup>, 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ácido  $\alpha$ -naftalenoacético (ANA) e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP). O meio permaneceu em estado líquido, com discos de espuma fenólica GREEN UP<sup>®</sup> de 5,5 cm de diâmetro e 1,5 cm de espessura como meio de suporte, acondicionados com duas lavagens com água deionizada (Figura 5.1 A, B e C). Para o experimento II, foi realizada a indução no meio basal EDM com a adição de sacarose 30 g L<sup>-1</sup>, ANA 0,5 mg L<sup>-1</sup> e BAP 0,5 mg L<sup>-1</sup> até os 30 dias, e transferido para o meio EDMm com adição de sacarose 20 g L<sup>-1</sup>, ANA 0,01 mg L<sup>-1</sup> e BAP 0,1 mg L<sup>-1</sup>, até os 50 dias. O pH de todos os meios foi ajustado para 5,8 utilizando KOH (1N) ou HCl (1N) e foram gelificados com ágar SIGMA<sup>®</sup> A7921, 5 g L<sup>-1</sup> para a germinação das sementes e 6 g L<sup>-1</sup> para o experimento II.

Foram utilizados frascos de vidro de 250 ml de capacidade, contendo 40 ml de meio e vedados com tampas plásticas. Em seguida, foram esterilizados em autoclave a temperatura de 121°C sob pressão de 1 kg cm<sup>-2</sup>, durante 20 minutos. Após a introdução do material vegetal no fluxo laminar, os frascos foram vedados com filme de PVC Resinite<sup>®</sup>.

Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento durante 30 dias, sob condições de temperatura de 25  $\pm$  2°C, com fotoperíodo de 16 horas e RFA de 23  $\mu$ mol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> fornecida por duas lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia.

### 5.2.3 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental usado foi o inteiramente ao acaso com dez repetições com cinco explantes (genótipos) por parcela para o experimento I e quatro repetições com nove explantes (genótipos) por parcela para o experimento II, sob o mesmo delineamento.

O experimento I foi avaliado aos 30 dias de cultivo e aferidas as variáveis, enraizamento (ER), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR), comprimento de brotações (CB), presença de calos na base da microestaca (CA), oxidação (OX) e peso de massa seca total (MST). Aos 50 dias, foram aferidas as variáveis regeneração de gemas (RG), número de gemas por explante (NG) e regeneração de calos (RC) do experimento II.

O material vegetal foi seco em estufa a 65°C até peso constante (48 h), a pesagem foi realizada em balança analítica eletromecânica OHAUS AS120<sup>TM</sup> e os comprimentos aferidos com paquímetro.

As 20 progênies de polinização aberta de *E. dunnii* foram consideradas como variáveis independentes (tratamentos) e as respostas foram avaliadas ao nível de unidade observacional (explante = genótipo) para a estimação da herdabilidade e das correlações genéticas.

Para obter as estimativas dos componentes das variâncias, das herdabilidades e das correlações genéticas, foram utilizados os modelos 80 (eq. 1) e 102 (eq. 2) do software Selegen REML/BLUP (RESENDE; OLIVEIRA, 1997), indicado para a avaliação de indivíduos em progênies de polinização aberta com delineamento inteiramente ao acaso e com várias observações por parcela (RESENDE, 2007).

$$y = Xu + Za + Wp + e \quad (1)$$

$y$  = vetor de dados;

$u$  = vetor de efeitos fixos da média geral;

$a$  = vetor dos efeitos genéticos aditivos individuais assumidos como aleatórios;

$p$  = vetor dos efeitos aleatórios de parcela;

$e$  = vetor de erros ou resíduos aleatórios;

$X$ ,  $Z$  e  $W$  = matrizes de incidência para os referidos efeitos.

Os coeficientes de correlação genética aditiva ( $r_{A(x,y)}$ ) foram estimados pelo Selegen REML/BLUP a partir da equação 2 (FALCONER; MACKAY, 1996).

$$r_{A(x,y)} = \text{COV}_{a(x,y)} / \sqrt{\sigma_{ax}^2 \sigma_{ay}^2} \quad (2)$$

$\text{COV}_{a(x,y)}$  = covariância genética aditiva entre os caracteres  $x$  e  $y$ ;

$\sigma_{ax}^2$  = variância genética aditiva para o caráter  $x$ ;

$\sigma_{ay}^2$  = variância genética aditiva para o caráter  $y$ .

Para poder comparar as herdabilidades dos caracteres binomiais com valores de referência que possuem distintos níveis de incidência, foi utilizada a equação 3 proposta por Dempster e Lerner (1950). Isto permite transformar as herdabilidades da escala binomial ( $h_{0/1}^2$ ) para a escala normal padrão ( $h_n^2$ ). Aplicável para herdabilidades menores ou iguais a 0,3 e para incidências entre 25% e 75% (VAN VLECK, 1972; LOPES; HUBER; WHITE, 2000).

$$h_n^2 = h_{0/1}^2 [p(1-p)]/z^2 \quad (3)$$

$h_n^2$  = herdabilidade individual na escala normal, no sentido restrito;

$h_{0/1}^2$  = herdabilidade individual na escala binomial, no sentido restrito;

$p$  = frequência do fenótipo;

$z$  = ordenada da curva normal padrão correspondente à probabilidade  $p$ .

Para a avaliação da qualidade experimental, foram calculados os valores de estatística F (de Snedecor) (eq. 4) e o coeficiente de variação relativa (eq. 5) e comparadas com tabelas de acurácia seletiva (RESENDE; DUARTE, 2007).

$$F = 1 + bCV_{gai}^2 / CV_e^2 \quad (4)$$

F = estatística F de Snedecor;

b = número de repetições;

$CV_{gai}$  (%) = coeficiente de variação genética aditiva individual;

$CV_e$  (%) = coeficiente de variação residual.

$$CVr = CV_{gai}^2 / CV_e^2 \quad (5)$$

CVr = coeficiente de variação relativa.

O ganho genético para a seleção por ER foi predito a partir da equação (6) (NAMKOONG; SNYDER; STONECYPHER, 1966).

$$\Delta G = i \sqrt{\sigma^2} h^2 \quad (6)$$

$i$  = intensidade de seleção ou diferencial de seleção padronizado =  $ds / \sigma_{FX}$ ;

$\sigma^2$  = variância fenotípica;

$h^2$  = herdabilidade do caráter;

$\sigma_{FX}$  = desvio padrão fenotípico do caráter a selecionar por via direta.

O ganho genético para a seleção indireta foi predito a partir da equação 7 (FALCONER; MACKAY, 1996).

$$\Delta G_Y = i_X r_A h_Y h_X \sigma_{FY} \quad (7)$$

$i_X$  = intensidade de seleção ou diferencial de seleção padronizado a selecionar por via direta =  $ds / \sigma_{FX}$ ;

$h_X$  = raiz quadrada da herdabilidade do caráter a selecionar por via direta;

$h_Y$  = raiz quadrada da herdabilidade do caráter a selecionar por via indireta;

$r_A$  = correlação genética entre os caracteres;

$\sigma_{FY}$  = desvio padrão fenotípico do caráter a selecionar por via indireta;

$\sigma_{FX}$  = desvio padrão fenotípico do caráter a selecionar por via direta.

### 5.3 Resultados e discussão

A variável ER apresentou uma média geral de 0,8 (80%) (Tabela 5.2) e herdabilidade ( $h^2_n$ ) de 0,322 (Tabela 5.3), demonstrando um moderado controle genético, semelhante às herdabilidades para características de crescimento de várias espécies florestais (WHITE; ADAMS; NEALE, 2007). Foi observada variabilidade entre e dentro de progênies, com valores desde 52% até 92% de enraizamento em média (Tabela 5.2),  $CV_{gp} = 10,63\%$  e  $CV_{gai} = 21,27\%$ , salientando o potencial para a seleção, principalmente dentro das progênies (Tabela 5.3).

Herdabilidades semelhantes (0,26 a 0,48) foram determinadas para o enraizamento de *Pinus taeda* e *E. nitens*, porém com o uso das médias das parcelas para as análises, fato que, geralmente, diminui a variância ambiental, inflacionando os valores de  $h^2$  (ANDERSON et al., 1999 apud BALTUNIS et al., 2005; TIBBITS et al., 1997). Para análises com dados

individuais, Ruaud et al. (1999) menciona  $h^2_a = 0,16$  para enraizamento adventício de microestacas de *E. globulus*, com taxas de enraizamento de 67% para os materiais juvenis. De forma similar, para *P. taeda*, foram reportadas baixas herdabilidades ( $h^2_n = 0,12$  a  $0,16$ ) e baixas porcentagens de enraizamento (46%) (BALTUNIS et al., 2005).

Os elevados níveis de enraizamento obtidos contrastam fortemente com o enraizamento do material adulto rejuvenescido pela cultura de tecidos, fato atribuído à juvenildade dos explantes utilizados e à natureza epigenética da capacidade de diferenciação celular (ABARCA; DIAZ SALA, 2009; VERDEIL, 2007), que, neste caso, os predispõe a uma elevada capacidade de enraizamento, como citado por Souza Junior e Wendling (2003) na miniestaquia de material juvenil de *E. dunnii*.

Das restantes características avaliadas no experimento I, o NR (1,97 raízes explante<sup>-1</sup>) e o CB (3,07 cm explante<sup>-1</sup>) merecem destaque (Figura 5.1 D, E e F), uma vez que estas variáveis apresentaram valores maiores para todos os parâmetros quando comparado com ER, sendo  $h^2_a = 0,504$ ,  $CV_{gp} = 27,30\%$  e  $CV_{gai} = 54,60\%$  para NR, e  $h^2_a = 0,545$ ,  $CV_{gp} = 41,49\%$  e  $CV_{gai} = 82,99\%$  para CB (Tabela 5.3).

Estes resultados são esperáveis, uma vez que os caracteres ligados à aptidão frequentemente apresentam  $h^2$  menores do que os caracteres morfológicos quantitativos (VISSCHER; HILL; WRAY, 2008). Além disso, estas características evidenciam um controle genético de moderado a elevado, assim como boas possibilidades para o melhoramento, em decorrência da grande variabilidade genética entre e dentro de progênies.

Para o CR (19,96 mm explante<sup>-1</sup>), mesmo que o  $CV_{gp} = 34,31\%$  e  $CV_{gai} = 68,63\%$  indiquem grande variabilidade genética, foi observada uma baixa  $h^2_a$  (0,127), decorrente do elevado  $CV_e$  (100,5%) (Tabela 5.3). A baixa herdabilidade estimada pode estar ligada à grande influência do ambiente no crescimento das raízes (MALAMY, 2005), evidenciado neste experimento pelos elevados desvios padrão do CR (Tabela 5.2) e atribuível ao diferente hábito de crescimento das raízes dentro ou fora da espuma fenólica, sendo mais alongadas e finas neste último (Figura 5.1 C).

As variáveis CA e OX apresentaram baixas incidências (4% e 20%, respectivamente), assim como baixas  $h^2_{OI}$ . A transformação para  $h^2_n$  não se mostra apropriada para estas variáveis, uma vez que sua incidência extremamente baixa provoca um viés na estimativa (VAN VLECK, 1972; LOPES; HUBER; WHITE, 2000).

A MST (3,47 mg explante<sup>-1</sup>) expressou baixa  $h^2_a = 0,218$ ,  $CV_{gai} = 36,32\%$  e  $CV_{gp} = 18,16\%$ , demonstrando a existência de um controle genético moderado a baixo e variabilidade genética passível de ser explorada para o seu melhoramento.

Tabela 5.2 – Médias, desvios padrão e totais para as variáveis, enraizamento (ER), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR), comprimento de brotações (CB), presença de calos (CA), oxidação (OX) e massa seca total (MST) aferidas aos 30 dias de cultivo *in vitro* para 19 progênie de *E. dunnii* (Experimento I). Regeneração de gemas (RG), número de gemas (NG) e regeneração de calos (RC) aos 50 dias de cultivo *in vitro* para 20 progênie de *E. dunnii* (Experimento II)

Progênie	Experimento I							Experimento II		
	ER <sup>1</sup> (0/1)	NR (número explante <sup>-1</sup> )	CR (mm explante <sup>-1</sup> )	CB (cm explante <sup>-1</sup> )	CA (0/1)	OX (0/1)	MST (mg explante <sup>-1</sup> )	RG (0/1)	NG (número explante <sup>-1</sup> )	RC (0/1)
01R10	0,92 ± 0,2	2,76 ± 1,4	10,55 ± 21,9	3,26 ± 1,8	0,10 ± 0,3	0,20 ± 0,4	3,36 ± 2,5	0,08 ± 0,28	0,17 ± 0,61	0,44 ± 0,50
05R12	0,70 ± 0,4	1,70 ± 1,2	21,38 ± 37,9	1,55 ± 1,6	0,00 ± 0,0	0,25 ± 0,4	2,81 ± 2,2	0,08 ± 0,28	0,19 ± 0,75	0,44 ± 0,50
17R10	0,70 ± 0,4	1,44 ± 1,2	17,34 ± 20,5	2,98 ± 3,0	0,06 ± 0,2	0,26 ± 0,4	2,68 ± 2,4	0,08 ± 0,28	0,11 ± 0,40	0,89 ± 0,32
18R10	0,88 ± 0,3	2,08 ± 1,2	38,92 ± 71,2	6,72 ± 6,8	0,04 ± 0,2	0,14 ± 0,3	5,20 ± 3,1	0,28 ± 0,45	1,00 ± 1,96	0,69 ± 0,47
22R05	0,78 ± 0,4	1,62 ± 1,1	19,36 ± 33,2	2,02 ± 1,8	0,00 ± 0,0	0,31 ± 0,4	2,96 ± 2,1	0,69 ± 0,47	2,75 ± 3,38	0,86 ± 0,35
23R02	0,90 ± 0,3	1,88 ± 0,9	37,08 ± 48,5	2,95 ± 2,1	0,03 ± 0,1	0,25 ± 0,4	3,29 ± 2,2	0,41 ± 0,50	2,22 ± 3,79	0,85 ± 0,36
25R09	0,67 ± 0,4	1,16 ± 1,0	23,22 ± 45,2	1,53 ± 1,4	0,00 ± 0,0	0,29 ± 0,4	2,93 ± 2,8	0,39 ± 0,49	1,11 ± 1,72	0,86 ± 0,35
27R16	0,88 ± 0,3	3,25 ± 1,9	8,40 ± 9,1	4,23 ± 3,3	0,10 ± 0,3	0,13 ± 0,3	3,86 ± 2,0	0,09 ± 0,29	0,24 ± 0,79	0,64 ± 0,49
28R16	0,80 ± 0,4	1,86 ± 1,3	20,89 ± 28,6	2,36 ± 2,3	0,00 ± 0,0	0,14 ± 0,3	3,60 ± 2,0	0,33 ± 0,48	0,81 ± 1,39	0,92 ± 0,28
32R04	0,72 ± 0,4	1,84 ± 1,6	9,66 ± 16,1	2,46 ± 2,6	0,06 ± 0,2	0,22 ± 0,4	2,84 ± 2,7	0,11 ± 0,32	0,61 ± 2,14	0,47 ± 0,51
36R02	0,78 ± 0,4	1,76 ± 1,2	34,84 ± 48,0	2,38 ± 2,7	0,00 ± 0,0	0,18 ± 0,3	2,87 ± 2,4	0,06 ± 0,23	0,14 ± 0,68	0,64 ± 0,49
37R06	0,86 ± 0,3	1,94 ± 0,9	18,68 ± 20,7	1,82 ± 1,3	0,00 ± 0,0	0,30 ± 0,4	3,71 ± 2,6	0,56 ± 0,50	1,03 ± 1,08	0,92 ± 0,28
46R07	0,88 ± 0,3	2,04 ± 1,4	11,20 ± 17,5	4,40 ± 2,8	0,12 ± 0,3	0,02 ± 0,1	3,82 ± 1,8	0,28 ± 0,45	0,67 ± 1,31	0,94 ± 0,23
56R03	0,52 ± 0,5	1,10 ± 1,1	17,58 ± 42,0	1,44 ± 1,8	0,00 ± 0,0	0,26 ± 0,4	2,48 ± 2,8	0,19 ± 0,40	0,42 ± 1,16	0,94 ± 0,23
58R10	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,53 ± 0,51
59R04	0,76 ± 0,4	1,24 ± 0,8	16,82 ± 37,8	2,36 ± 3,0	0,00 ± 0,0	0,24 ± 0,4	3,39 ± 2,7	0,64 ± 0,49	2,47 ± 2,98	0,94 ± 0,23
66R13	0,80 ± 0,4	2,44 ± 1,6	13,28 ± 24,0	3,70 ± 2,8	0,08 ± 0,2	0,16 ± 0,3	3,53 ± 2,0	0,33 ± 0,65	0,55 ± 1,09	0,88 ± 0,33
67R07	0,88 ± 0,3	2,64 ± 1,5	21,14 ± 43,2	3,46 ± 3,8	0,06 ± 0,2	0,12 ± 0,3	3,82 ± 2,4	0,07 ± 0,27	0,22 ± 0,97	1,00 ± 0,00
69R02	0,88 ± 0,3	2,58 ± 1,4	20,12 ± 33,3	3,80 ± 3,3	0,08 ± 0,2	0,24 ± 0,4	3,92 ± 2,3	0,28 ± 0,45	1,14 ± 2,93	0,58 ± 0,50
73R13	0,86 ± 0,3	2,23 ± 1,6	20,54 ± 36,6	5,09 ± 4,3	0,09 ± 0,2	0,17 ± 0,3	5,13 ± 3,3	0,25 ± 0,44	0,72 ± 1,47	0,89 ± 0,32
Total	0,80 ± 0,4	1,97 ± 1,4	19,96 ± 37,0	3,07 ± 3,3	0,04 ± 0,2	0,20 ± 0,4	3,47 ± 2,5	0,26 ± 0,45	0,82 ± 1,94	0,76 ± 0,43

Tabela 5.3 – Parâmetros genéticos para as variáveis, enraizamento (ER), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR), comprimento de brotações (CB), presença de calos (CA), oxidação (OX) e massa seca total (MST) aferidas aos 30 dias para 19 progênies de *E. dunnii* (Experimento I), Regeneração de gemas (RG), número de gemas (NG) e regeneração de calos (RC) aos 50 dias de cultivo *in vitro* para 20 progênies de *E. dunnii* (Experimento II)

Parâmetros	Experimento I							Experimento II		
	ER <sup>1</sup>	NR <sup>2</sup>	CR <sup>3</sup>	CB <sup>4</sup>	CA <sup>1</sup>	OX <sup>1</sup>	MST <sup>5</sup>	RG <sup>1</sup>	NG <sup>2</sup>	RC <sup>1</sup>
$\hat{\sigma}_{ga}^2$	0,029	1,154	193,8	6,568	0,004	0,009	1,602	0,142	2,147	0,126
$\hat{\sigma}_{fi}^2$	0,181	2,289	1525	12,05	0,044	0,178	7,332	0,215	4,133	0,195
$\hat{\sigma}_{ep}^2$	0,017	0,183	150,46	0,939	0,004	0,018	0,689	0,015	0,327	0,014
$\hat{\sigma}_e^2$	0,134	0,952	1181	4,543	0,036	0,150	5,040	0,057	1,657	0,055
$h_a^2$	-	0,504	0,127	0,545	-	-	0,218	-	0,519	-
$h_{01}^2$	0,158	-	-	-	0,087	0,055	-	0,662	-	0,644
$h_n^2$	0,322	-	-	-	..	..	-	..	-	..
$CV_{gai}(\%)$	21,27	54,60	68,63	82,99	142,2	48,00	36,32	146,5	178,3	46,42
$CV_{gp}(\%)$	10,63	27,30	34,31	41,49	71,10	24,00	18,16	73,26	89,17	23,21
$CV_e(\%)$	27,72	37,57	100,5	54,51	252,8	107,5	39,94	71,35	101,1	23,02
$CVr$	0,767	1,453	0,683	1,522	0,563	0,447	0,909	2,053	1,764	2,017
$F$	7,906	14,08	7,146	14,70	6,063	5,019	9,184	9,213	8,054	9,066

$\hat{\sigma}_{ga}^2$  = variância genética aditiva;  $\hat{\sigma}_{fi}^2$  = variância fenotípica individual;  $\hat{\sigma}_{ep}^2$  = variância ambiental entre parcelas;  $\hat{\sigma}_e^2$  = variância residual (ambiental + não aditiva);  $h_a^2$  = herdabilidade individual, no sentido restrito;  $h_{01}^2$  = herdabilidade individual na escala binomial, no sentido restrito;  $h_n^2$  = herdabilidade na escala normal transformada segundo equação proposta por Dempster e Lerner (1950) a partir da  $h_{01}^2$ ;  $CV_{gai}(\%)$  = coeficiente de variação genética aditiva individual;  $CV_{gp}(\%)$  = coeficiente de variação genética entre progênies;  $CV_e(\%)$  = coeficiente de variação residual;  $CVr$  = coeficiente de variação relativa;  $F$  = F de Snedecor. 1 = variáveis binomiais (0 = ausência, 1 = presença); 2 = número explante<sup>-1</sup>; 3 = mm explante<sup>-1</sup>; 4 = cm explante<sup>-1</sup>; 5 = mg explante<sup>-1</sup>; .. = não se aplica dado numérico



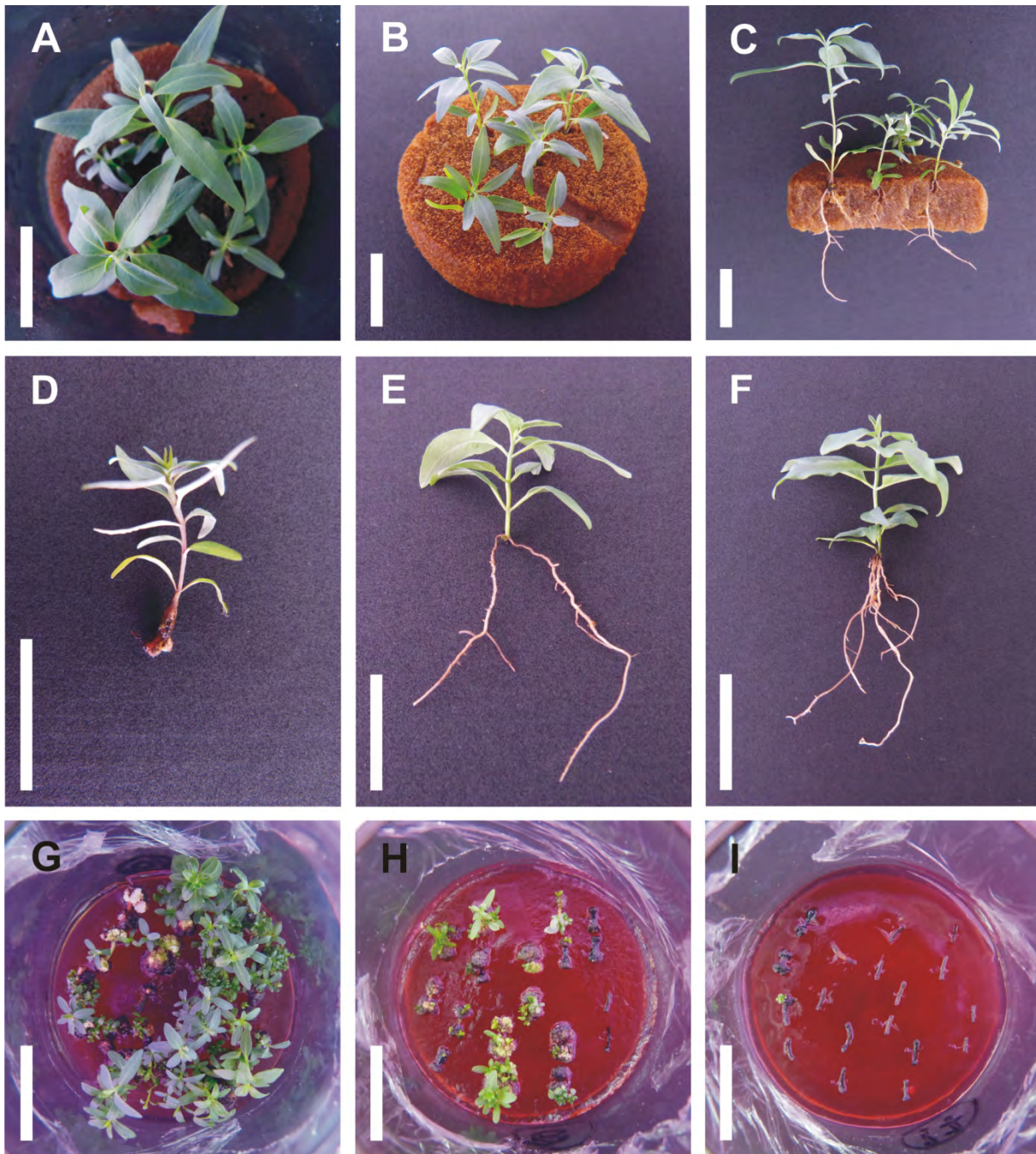


Figura 5.1 – Explantes de *E. dunnii* aos 30 dias de cultura. A) Vista superior dos explantes dentro do frasco; B) vista de grupo de explantes no momento da avaliação; C) vista lateral dos explantes com as raízes expostas; D) explante com calo na base e sem raízes adventícias; E) explante com raízes adventícias e sem calo na base e; F) explante enraizado com numerosas raízes adventícias e calo na base. Explantes aos 60 dias de cultura em meio EDMm, evidenciando distintos graus de resposta organogênica; G) progênie 22R05; H) progênie 37R06 e I) progênie 05R12. Barras = 2 cm

No experimento II, todas as variáveis avaliadas apresentaram elevadas herdabilidades, sendo  $h^2_{0/1} = 0,662$  para RG,  $h^2_a = 0,519$  para NG e  $h^2_{0/1} = 0,644$  para RC. Ao mesmo tempo foram observados elevados níveis de variabilidade genética individual e entre progênies, principalmente para RG e NG (Figura 5.1 G, H e I; Tabela 5.2). De acordo com as

observações feitas por Van Vleck (1972) e Lopes, Huber e White (2000), as  $h^2_n$  para RG e RC não foram calculadas em decorrência das elevadas  $h^2_{oI}$  obtidas para ambos os parâmetros.

Semelhantes a estes resultados, moderadas a elevadas  $h^2$  na regeneração de gemas e calos foram determinadas para *Lycopersicum esculentum* x *L. peruvianum* (KOORNNEEF; HANHART; MARTINELLI, 1987), *Medicago sativa* (KIELLY; BOWLEY, 1997); *Helianthus annuus* (NESTARES et al., 2002) e *E. grandis* (BRAVO et al., 2008). Considerando que a capacidade de regeneração *in vitro* é atribuída a poucos genes (REISCH; BINGHAM, 1980; KOORNNEEF; HANHART; MARTINELLI, 1987; WAN; SORENSEN; LIANG, 1988) e que as herdabilidades estimadas foram de moderadas a elevadas, o melhoramento por seleção recorrente para essas características se apresenta como uma estratégia viável, que poderia proporcionar ganhos substanciais em poucas gerações (BINGHAM et al., 1975; KIELLY; BOWLEY, 1997).

Um dos parâmetros mais importantes para a avaliação genotípica é a acurácia seletiva (HENDERSON, 1984), a qual depende basicamente da proporção entre a variação residual média e a variação genotípica (RESENDE, 2002). Baseando-se nestas informações e no número de repetições, dois parâmetros podem ser calculados, a  $CV_r$  e a estatística  $F$  (de Snedecor), e os resultados comparados com as tabelas de acurácia (RESENDE, 2002).

Considerando nove repetições para o experimento I (por causa de parcelas perdidas), a  $CV_r = 1,453$  da variável NR se traduz em uma acurácia de entre 97 e 98%, coincidente com a estatística  $F$  (14,08), considerada como muito alta. De forma similar, o CB apresenta valores semelhantes para  $CV_r$  e  $F$  (Tabela 5.3), demonstrando as acurácias muito altas. Já para ER, a acurácia foi menor, contudo, em níveis aceitáveis. Para o experimento II foram determinadas acurácias entre o 95 e 97%, baseado nos valores de  $CV_r$  e  $F$ . Segundo Steel e Torrie (1980), valores de  $F$  superiores a 5,26 devem ser obtidos para uma inferência estatística segura, valores atingidos para todas as variáveis avaliadas nestes experimentos.

Tabela 5.4 – Correlações genéticas aditivas ( $r_A$ ) para as variáveis: enraizamento (ER), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR), comprimento de brotações (CB), presença de calos (CA), oxidação (OX) e peso de massa seca (MST), aos 30 dias de cultivo *in vitro* para 19 progênies de *E. dunnii*

Variáveis	ER	NR	CR	CB	CA	OX	MST
ER	1						
NR	0,756	1					
CR	0,103	-0,241	1				
CB	0,618	0,570	0,177	1			
CA	0,527	0,725	-0,474	0,639	1		
OX	-0,446	-0,505	0,119	-0,610	-0,583	1	
MST	0,671	0,516	0,228	0,858	0,389	-0,455	1

Dentre as variáveis de maior  $h^2$  do experimento I, foram encontradas correlações genéticas elevadas e favoráveis entre as variáveis ER e NR (0,756), mesmo entre ER e CB (0,618) e ER e MST (0,671). O CB apresentou uma correlação elevada e favorável com a MST (Tabela 5.4), resposta atribuível à contribuição da massa das brotações para com a MST. Mesmo com herdabilidade baixa, a presença de calos na base dos explantes (CA) apresentou correlações elevadas com o NR (0,725) e CB (0,639), e moderadas com ER (0,527) e CR (-0,611). Ressalta-se que estes calos não foram em detrimento do enraizamento, sendo muito comum encontrar explantes com raízes adventícias e calo na base (Figura 5.1 F).

Uma alternativa para o melhoramento de caracteres de limiar de baixa herdabilidade envolve a seleção indireta (McGUIRK, 1989; RESENDE, 2002) que, neste caso, poderia ser aplicada às variáveis NR e CB para melhorar indiretamente a capacidade de enraizamento adventício de *E. dunnii*. A variável MS, mesmo tendo elevada correlação genética, não seria apropriada como caráter para seleção indireta por causa da sua menor herdabilidade, maior complexidade na avaliação do que o NR e CB e, principalmente, porque o seu aferimento implicaria a destruição do explante.

Simulações realizadas com os dados obtidos na análise com o Selegen REML/BLUP permitiram observar o efeito da seleção individual por NR no ganho genético predito do ER da população selecionada (Tabela 5.5). Foi possível observar como os ganhos pela seleção indireta superam amplamente os ganhos preditos para a seleção direta do ER ( $\Delta G = 3,16\%$ ) com o máximo diferencial de seleção possível ( $ds = 100\% - 80\% = 20\%$ ), evidenciando o já mencionado efeito limitante que exerce a incidência da variável (Figura 5.2). De forma similar, poderiam ser selecionados indivíduos/progênes pelo CB para, indiretamente, melhorar o ER, porém, menores ganhos preditos seriam obtidos para as mesmas intensidades de seleção, em decorrência da menor correlação entre esta variável e o ER.

Uma outra possibilidade consiste na modificação das condições ambientais para obter incidências menores e assim incrementar o  $ds$  (McGUIRK, 1989; RESENDE, 2002). Neste caso, a estratégia poderia consistir em trabalhar com material de menor juvenildade, como minicepas a partir de mudas de sementes e clonagem via miniestaquia. Desta forma, Lemos et al. (1998) determinaram elevadas herdabilidades ( $h^2 = 0,54$ ) para porcentagens de enraizamento de 20% em média, resultados que sugerem que, neste caso, elevados ganhos podem ser atingidos através da seleção direta do enraizamento.

Tabela 5.5 – Diferencial de seleção ( $ds$ ) para NR, intensidade de seleção para NR, indivíduos selecionados da população avaliada e ganho predito para ER através da seleção indireta

Intensidade de seleção para NR	$ds$ para NR	Indivíduos selecionados		Ganho predito para ER (%)
		n	(%)	
0	0	895	100,00	0,00
0,2	0,33	667	74,53	1,98
0,4	0,63	446	49,83	3,78
0,6	0,93	283	31,62	5,58
0,8	1,23	169	18,88	7,38
1,0	1,53	97	10,84	9,18
1,2	1,83	55	6,15	10,98
1,4	2,13	32	3,58	12,78
1,6	2,43	18	2,01	14,58
1,8	2,73	10	1,12	16,38
2,0	3,03	4	0,45	18,18
2,2	3,33	1	0,11	19,98

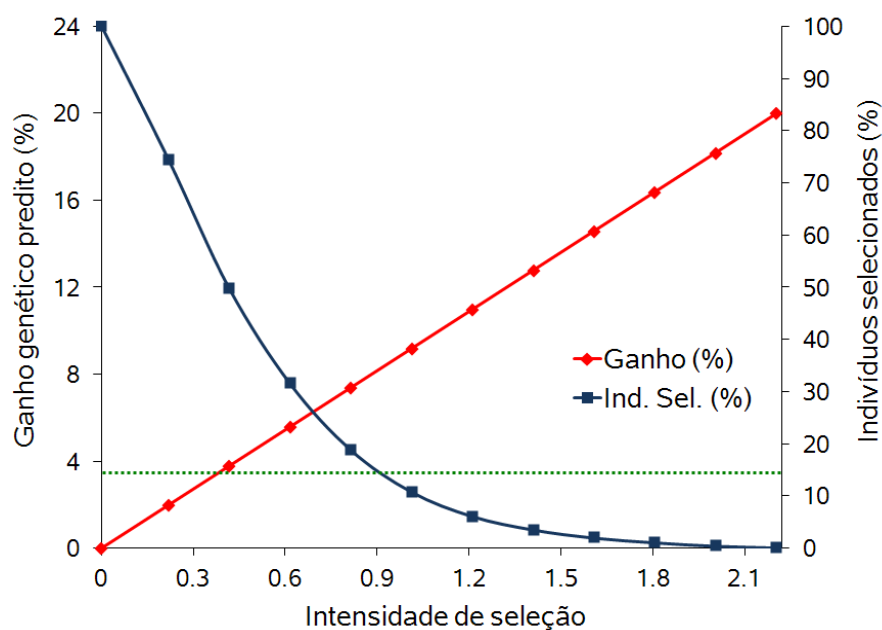


Figura 5.2 - Indivíduos selecionados da população avaliada (%) e ganho predito para ER (%) através da seleção indireta em função de distintas intensidades de seleção. A linha verde pontilhada denota o ganho máximo predito possível de ser obtido pela seleção direta do ER

Os testes de progênies clonais, nas quais os indivíduos de cada progênie são clonados, permitem incrementar os ganhos genéticos através da redução da variância ambiental pelos efeitos de micrositio e pela possibilidade de caracterizar, ao mesmo tempo, a variância genética aditiva e não aditiva (MULLIN; PARK, 1992; SHELBOURNE; 1992; ROSVALL; LINDGREN; MULLIN, 1998; WHITE; ADAMS; NEALE, 2007).

Nos programas de melhoramento florestal de espécies recalcitrantes ao enraizamento, este tipo de delineamento experimental poderia contribuir na geração de informação sobre a

capacidade de enraizamento no momento da clonagem das mudas, necessária para a seleção de indivíduos/progênes que combinem bom crescimento e boa capacidade de propagação. Ao mesmo tempo, esta estratégia permitiria, a longo prazo, demonstrar se estas características apresentam correlações juvenil-adulto, questão que determinaria a possibilidade de implementar a seleção já na etapa de produção de mudas, diminuindo assim a quantidade de indivíduos/progênes a serem testados no campo para as características de crescimento.

#### 5.4 Conclusões

- Existe moderada a elevada variação genética entre e dentro das progênes para os caracteres avaliados.
- Os caracteres ER e CR apresentam moderadas a baixas herdabilidades.
- Os caracteres NR, CB, RG, NG e RC apresentam elevadas herdabilidades.
- Existem correlações genéticas elevadas e positivas entre ER e as características NR, CB e MST.
- A seleção *in vitro* de genótipos de *E. dunnii* com maior capacidade de enraizamento pode se basear em avaliações não destrutivas dos caracteres NR e CB.
- A seleção indireta do ER, através da seleção de indivíduos com maior número de raízes, permite maiores ganhos genéticos para o enraizamento adventício do que a seleção direta, nesta população de *E. dunnii*.

#### Referências

- ABARCA, D.; DÍAZ-SALA, C. Reprogramming adult cells during organ regeneration in forest species. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 4, n. 8, p. 793-795, 2009.
- BALTUNIS, B.S.; HUBER, D.A.; WHITE, T.L.; GOLDFARB, B.; STELZER, H.E. Genetic effects of rooting loblolly pine stem cuttings from a partial diallel mating design. **Canadian Journal of Forestry Research**, Ottawa, v. 35, n. 5, p. 1098– 1108, 2005.
- BANKS, B.D.; MAO, I.L.; WALTER, J.P. Robustness of the restricted maximum likelihood estimator derived under normality as applied to data with skewed distributions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 7, p. 1785–1792, 1985.
- BINGHAM, E.T.; HURLEY, L.V.; KAATZ, D.W.; SAUNDERS, J.W. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. **Crop Science**, Madison, v. 15, n. 5, p. 719-721, 1975.
- BRAVO, V.C.D.; GONÇALVES, A.N.; DIAS, C.T.S.; VENCOVSKY, R. Controle genético da regeneração *in vitro* em progênes de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2181-2185, 2008.

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Organogenesis *in vitro* as a developmental process. **Hortscience**, Alexandria, v. 23, n. 3, p. 515-519, 1988.

DEMPSTER, E.R.; LERNER, I.M. Heritability of threshold characters. **Genetics**, Bethesda, v. 35, n. 2, p. 212-236, 1950.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4<sup>th</sup> ed. New Harlow: Longman, 1996. 464 p.

FARIAS NETO, J.T.; RESENDE, M.D.V. de. Aplicação da metodologia de modelos mistos (REML/BLUP) na estimação de componentes de variância e predição de valores genéticos em pupunheira (*Bactris gasipaes* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 320-324, 2001.

GAHAN, P.B.; GEORGE, E.F. Adventitious regeneration. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; DE KLERK, G-J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 355-402.

GEISS, G.; GUTIERREZ, L.; BELLINI, C. Adventitious root formation: new insights and perspectives. In: BEECKMAN, T. (Ed.). **Root development**. Oxford: Blackwell, 2010. p. 127-156.

GRATTAPAGLIA, D.; BERTOLUCCI, F.L.; SEDEROFF, R.R. Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, n. 7/8, p. 933-947, 1995.

GREENWOOD, M.S.; WEIR, R.J. Genetic variation in rooting ability of loblolly pine cuttings: effects of auxin and family on rooting by hypocotyl cuttings. **Tree Physiology**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 41-45, 1994.

HAZEL, L.N. The genetic basis for constructing selection indexes. **Genetics**, Bethesda, v. 28, n. 6, p. 476-490, 1943.

HENDERSON, C.R. **Applications of linear models in animal breeding**. Guelph: University of Guelph, 1984. 462 p.

KIELLY, G.A.; BOWLEY, S.R. Quantitative genetic analysis of *in vitro* callus proliferation in alfalfa. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 77, n. 2, p. 225-229, 1997.

KOPPERS COMPANY INC. (United States). CARLSON, J.; KIFER, E.; WOJTYNA, V.; COLTON, J. **Phenol Formaldehyde Resoles for Making Phenolic Foam, United States Patent (expired). Patent Number: 4539338**, 1985.

KOORNNEEF M.; HANHART C.J.; MARTINELLI, L. A genetic analysis of cell culture traits in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 74, n. 5, p. 633-641, 1987.

LEMOES, L.; CARVALHO, J.; SOUSA, R.; BORRALHO, N. M. G. Importance of additive and specific combining ability effects for rooting ability of stem cuttings in *Eucalyptus globulus*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 46, n. 5 p. 307-308, 1998.

LOPES, U.V.; HUBER, D.A.; WHITE, T.L. Comparison of methods for prediction of genetic gain from mass selection on binary threshold traits. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 49, n. 1, p. 50–56, 2000.

LUSH, J.L. Intra-sire correlations or regressions of offspring on dam as a method of estimating heritability of characteristics. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 33, n. 1, p. 293–301, 1940.

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

MALAMY, J.E. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. **Plant Cell & Environment**, Chichester, v. 28, n. 1, p. 67–77, 2005.

MÄNTYSAARI, E.A.; QUAASP, R.L.; GRÖHN, Y.T. Simulation study on covariance component estimation for two binary traits in an underlying continuous scale. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 2, p. 580–591, 1991.

MARCÓ, M.E.; WHITE, T.L. Genetic parameters estimates and genetic gains for *Eucalyptus grandis* and *E. dunnii* in Argentina. **Forest Genetics**, Zvolen, v. 9, n. 3, p. 205–215, 2002.

MARQUES, C.M.; VASQUEZ-KOOL, J.; CAROCHA, V.J.; FERREIRA, J.G.; O'MALLEY, D.M.; LIU, B.H.; SEDEROFF, R. Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, n. 6, p. 936–946, 1999.

McGUIRK, B.J. The estimation of genetic parameters for all-or-none and categorical traits. In: HILL, W.G.; MACKAY, T.F.C. (Ed.). **Evolution and animal breeding**: reviews on molecular and quantitative approaches in honour of Alan Robertson. Wallingford: CAB International, 1989. p. 175–180.

MODE, C.J.; ROBINSON, H.F. Pleiotropism and the genetic variance and covariance. **Biometrics**, Washington, v. 15, n. 4, p. 518–537, 1959.

MULLIN, T.J.; PARK, Y.S. Estimating genetic gains from alternative breeding strategies for clonal forestry. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 22, n. 1, p. 14–23, 1992.

NAMKOONG, G.; SNYDER, E.B.; STONECYPHER, R.W. Heritability and gain concept for evaluating breeding systems such as seedling orchards. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 15, n. 3, p. 76–84. 1966.

NESTARES, G.; ZORZOLI, R.; MROGINSKI, L.; PICARDI, L. Heritability of *in vitro* plant regeneration capacity in sunflower. **Plant Breeding**, Berlin, v. 121, n. 4, p. 366–368, 2002.

PIEPHO, H.P.; MÖHRING, J. Computing heritability and selection response from unbalanced plant breeding trials. **Genetics**, Bethesda, v. 177, n. 3, p. 1881–1888, 2007.

REISCH, B.; BINGHAM, E.T. The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa. **Plant Science Letters**, Dordrecht, v. 20, n. 1, p. 71-77, 1980.

RESENDE, M.D.V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Colombo: EMBRAPA Florestas; Brasília: Informação Tecnológica, 2002. 975 p.  
\_\_\_\_\_. **Selegen-Reml/Blup: sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos**. Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 360 p.

RESENDE, M.D.V.; DUARTE, J.B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 3, p. 182-194, 2007.

RESENDE, M.D.V.; OLIVEIRA, E.B. de. Sistema Selegen: seleção genética computadorizada para o melhoramento de species perenes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 9, p. 931-939, 1997.

ROSVALL, O.; LINDGREN, D.; MULLIN, T.J. Sustainability robustness and efficiency of a multigeneration breeding strategy based on within-family clonal selection. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 47, n. 5/6, p. 307-321, 1998.

RUAUD, J.N.; LAWRENCE, N.; PEPPER, S.; POTTS, B.M.; BORRALHO, N.M.G. Genetic variation of *in vitro* rooting ability with time in *Eucalyptus globulus*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 48, n. 1, p. 4-7, 1999.

SCOTTI-SAINTAGNE, C.; BERTOCCHI, E.; BARRENECHE, T.; KREMER, A.; PLOMION, C. Quantitative trait loci mapping for vegetative propagation in pedunculate oak. **Annals of Forest Science**, Les Ulis, v. 62, n. 4, p. 369-374, 2005.

SHELBOURNE, C.J.A. Genetic gains from different kinds of breeding population and seed or plant production population. **South African Forestry Journal**, Pretoria, v. 160, n. 1, p. 49-65, 1992.

SOBROSA, R.C.; CORDER, M.P.M. Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas adventícias em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden *in vitro*. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 58-68, 2003.

SOUZA JUNIOR, L.; WENDLING, I. Propagação vegetativa de *Eucalyptus dunnii* via miniestaquia de material juvenil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, v. 46, n. 1, p. 21-30, 2003.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Mc Graw-Hill, 1980. 633 p.

TENESA, A.; HALEY, C.S. The heritability of human disease: estimation, uses and abuses. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 14, n. 2, p. 139-149, 2013.

TIBBITS, W.N.; WHITE, T.L.; HODGE; JOYCE, K.R. Genetic control of rooting of stem cuttings in *Eucalyptus nitens*. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 45, n. 1, p. 203-210, 1997.



VAN VLECK, L.D. Estimation of heritability of threshold characters. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 55, n. 2, p. 218-225, 1972.

VERDEIL, J.L.; ALEMANNI, L.; NIEMENAK, N.; TRANBARGER, T.J. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? **Trends in Plant Science**, London, v. 12, n. 6, p. 245-52, 2007.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 486 p.

VISSCHER, P.M.; HILL, W.G.; WRAY, N.R. Heritability in the genomics era: concepts and misconceptions. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 9, n. 4, p. 255–266, 2008.

WAN, Y.; SORENSEN, E. L.; LIANG, G. H. Genetic control of *in vitro* regeneration in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Euphytica**, Dordrecht, v. 39, n. 1, p. 3-9, 1988.

WESTFALL, P.H. A comparison of variance component estimates for arbitrary underlying distributions. **Journal of the American Statistical Association**, Alexandria, v. 82, n. 399, p. 866–874, 1987.

WHITE, T.L.; ADAMS, W.T.; NEALE, D.B. **Forest genetics**. Wallingford: CABI Publ., 2007. 704 p.

WILSON, P.J. The development of new clones of *Eucalyptus globulus* and *E. globulus* hybrids by stem cuttings propagation. In: DAVIES, T.D.; HAISSIG, B.E.; SHANKLA, N. (Ed.). **Mass production technology for genetically improved fast growing forest tree species**. Nangis: Association Forêt Cellulose, 1992. p. 379–386. (AFOCEL-IUFRO Symposium, 1),.

## 6 CONCLUSÃO GERAL

A clonagem de *E. dunnii* representa um dos grandes desafios para garantir a disponibilidade de material de propagação melhorado de eucaliptos tolerantes às geadas. Isto gera uma demanda permanente por novas tecnologias que permitam incrementar a eficiência dos atuais processos de propagação para esta e outras espécies de eucaliptos que se adaptem a essa restrição ambiental.

Neste trabalho, foi possível obter um novo meio basal para a propagação *in vitro* de *E. dunnii*, com base nos teores nutricionais de brotações de cepas desta espécie. O meio basal obtido demonstrou ser adequado para a indução da organogênese de gemas e raízes adventícias em segmentos de hipocótilos, quando a fonte de Fe compôs-se de 9 mg L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 12,1 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O (meio basal EDM).

De forma similar, uma versão modificada deste meio (meio basal EDMm) favoreceu a multiplicação *in vitro* em gemas axilares de material juvenil e adulto de *E. dunnii*. Esta resposta é atribuível à modificação da fonte de Fe que, nutriente que neste meio basal, foi fornecido pelo quelato EDDHA/Fe (286 mg L<sup>-1</sup> de Basafer<sup>®</sup> Plus).

As brotações desenvolvidas no meio basal EDMm não apresentaram sintomas evidentes de clorose, oxidação, formação excessiva de calos ou hiperhidria, eventos normalmente observados em meios basais sub-ótimos. A restrição nutricional de Fe permitiu confirmar que a clorose nas folhas é atribuível à deficiência deste nutriente. Por outro lado, a restrição nos níveis padrão de N provocaram a oxidação e queda das folhas nas brotações dominantes, provavelmente pela ciclagem interna deste nutriente para as brotações mais jovens. Além disso, as brotações produzidas neste meio basal apresentaram maiores taxas de enraizamento, na maioria dos clones, associadas a um maior acúmulo de Cu, Fe, Zn e Mn nos tecidos.

A aplicação desta metodologia para o desenvolvimento dos meios basais poderia resultar vantajosa para outras espécies de eucaliptos, assim como para outras espécies vegetais, nas quais os meios basais tradicionais não tenham sido eficazes.

Finalmente, as estimativas das herdabilidades e dos ganhos genéticos para as características relacionadas ao enraizamento e a regeneração de gemas adventícias indicam que as mesmas estão sob moderado a elevado controle genético, conseqüentemente, poderiam ser melhoradas substancialmente através da seleção dos indivíduos/progênes superiores.

No conjunto, estes resultados contribuem para com o estado da arte na propagação vegetativa de *E. dunnii*, indicando as bases para futuras pesquisas na área, na procura da melhora contínua dos processos de propagação *in vitro* desta espécie.



## **ANEXOS**



Anexo A - Especiação iônica da solução inicial obtida no GEOCHEM-EZ

<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	<b>Zn<sup>2+</sup></b>	<b>MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>
100,00 % livre	77,40 % livre	7,88 % livre	98,09 % livre
<b>NH<sub>3</sub></b>	16,15 % complexado com Ca	0,23 % complexado com SO <sub>4</sub> <sup>4-</sup>	1,91 % complexado com H
0,05 % livre	0,05 % complexado com Na	0,65 % complexado com PO <sub>4</sub> <sup>4-</sup>	<b>Ni<sup>2+</sup></b>
99,95 % complexado com H	0,04 % complexado com Fe	90,96 % complexado com EDTA	0,11 % livre
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	2,30 % complexado com K	0,22 % complexado com NO <sub>3</sub>	99,88 % complexado com EDTA
7,98 % complexado com Ca	3,60 % complexado com Mg	0,06 % complexado com OH	<b>EDTA</b>
0,39 % complexado com Fe	0,46 % complexado com Mn	<b>Na<sup>+</sup></b>	0,36 % complexado com Ca
1,43 % complexado com Mg	<b>B(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	99,84 % livre	4,59 % complexado com Co
90,20 % complexado com H	0,05 % livre	0,01 % complexado com Cl	4,55 % complexado com Fe
<b>K<sup>+</sup></b>	99,95 % complexado com H	0,14 % complexado com SO <sub>4</sub>	50,21 % complexado com Zn
99,77 % livre	<b>Cu<sup>2+</sup></b>	<b>Co<sup>2+</sup></b>	16,04 % complexado com Mn
0,23 % complexado com SO <sub>4</sub>	0,04 % livre	7,91 % livre	24,13 % complexado com Cu
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	99,95 % complexado com EDTA	0,29 % complexado com SO <sub>4</sub>	0,13 % complexado com Ni
94,17 % livre	<b>Fe<sup>2+</sup></b>	0,36 % complexado com PO <sub>4</sub>	
2,79 % complexado com SO <sub>4</sub>	62,48 % livre	91,27 % complexado com EDTA	
3,03 % complexado com PO <sub>4</sub>	1,47 % complexado com SO <sub>4</sub>	0,02 % complexado com B(OH) <sub>4</sub>	
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	30,40 % complexado com PO <sub>4</sub>	0,14 % complexado com NO <sub>3</sub>	
95,76 % livre	4,55 % complexado com EDTA	<b>Cl<sup>-</sup></b>	
2,25 % complexado com SO <sub>4</sub>	1,09 % complexado com NO <sub>3</sub>	99,78 % livre	
1,97 % complexado com PO <sub>4</sub>	<b>Mn<sup>2+</sup></b>	0,02 % complexado com Ca	
0,01 % complexado com NO <sub>3</sub>	94,43 % livre	0,02 % complexado com Na	
	0,04 % complexado com Cl	0,10 % complexado com K	
	2,80 % complexado com SO <sub>4</sub>	0,05 % complexado com Mg	
	2,74 % complexado com EDTA	0,02 % complexado com Mn	

## Anexo B - Especiação iônica da solução final (fração mineral do meio basal EDM) obtida no GEOCHEM-EZ

<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	<b>Mn<sup>2+</sup></b>	<b>Cl<sup>-</sup></b>
99,99 % livre	77,37 % livre	96,24 % livre	99,77 % livre
	15,85 % complexado com Ca	0,04 % complexado com Cl	0,02 % complexado com Ca
<b>NH<sub>3</sub></b>	0,06 % complexado com Na	3,70 % complexado com SO <sub>4</sub>	0,02 % complexado com Na
0,05 % livre	0,07 % complexado com Fe	0,01 % complexado com EDTA	0,10 % complexado com K
99,94 % complexado com H	2,31 % complexado com K		0,06 % complexado com Mg
	3,78 % complexado com Mg	<b>Zn<sup>2+</sup></b>	0,02 % complexado com Mn
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	0,05 % complexado com Zn	82,36 % livre	
7,90 % complexado com Ca	0,48 % complexado com Mn	0,02 % complexado com Cl	<b>MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>
0,63 % complexado com Fe	0,02 % complexado com Cu	3,17 % complexado com SO <sub>4</sub>	98,08 % livre
1,49 % complexado com Mg		8,02 % complexado com PO <sub>4</sub>	1,92 % complexado com H
0,06 % complexado com Zn	<b>B(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	3,53 % complexado com EDTA	
0,03 % complexado com Cu	0,05 % livre	2,26 % complexado com NO <sub>3</sub>	<b>Ni<sup>2+</sup></b>
0,13 % precipitado sólido com Cu	99,95 % complexado com H <sup>+</sup>	0,64 % complexado com OH <sup>-</sup>	22,06 % livre
89,76 % complexado com H			0,85 % complexado com SO <sub>4</sub>
	<b>Cu<sup>2+</sup></b>	<b>Na<sup>+</sup></b>	1,11 % complexado com PO <sub>4</sub>
<b>K<sup>+</sup></b>	9,30 % livre	99,80 % livre	75,18 % complexado com EDTA
99,70 % livre	0,45 % complexado com SO <sub>4</sub>	0,02 % complexado com Cl	0,17 % complexado com B(OH) <sub>4</sub>
0,30 % complexado com SO <sub>4</sub>	1,25 % complexado com PO <sub>4</sub>	0,19 % complexado com SO <sub>4</sub>	0,60 % complexado com NO <sub>3</sub>
	8,67 % precipitado sólido com PO <sub>4</sub>		0,04 % complexado com NH <sub>3</sub>
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	79,58 % complexado com EDTA	<b>Co<sup>2+</sup></b>	
92,89 % livre	0,32 % complexado com NO <sub>3</sub>	85,75 % livre	<b>EDTA</b>
3,58 % complexado com SO <sub>4</sub>	0,31 % complexado com NH <sub>3</sub>	4,15 % complexado com SO <sub>4</sub>	0,14 % complexado com Co
3,53 % complexado com PO <sub>4</sub>	0,10 % complexado com OH <sup>-</sup>	4,65 % complexado com PO <sub>4</sub>	0,02 % complexado com Fe
		3,67 % complexado com EDTA	1,51 % complexado com Zn
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	<b>Fe<sup>2+</sup></b>	0,26 % complexado com B(OH) <sub>4</sub>	0,04 % complexado com Mn
94,81 % livre	61,53 % livre	1,48 % complexado com NO <sub>3</sub>	98,05 % complexado com Cu
2,90 % complexado com SO <sub>4</sub>	1,88 % complexado com SO <sub>4</sub>	0,03 % complexado com NH <sub>3</sub>	0,24 % complexado com Ni
2,27 % complexado com PO <sub>4</sub>	35,50 % complexado com PO <sub>4</sub>		
0,01 % complexado com NO <sub>3</sub>	0,02 % complexado com EDTA		
	1,06 % complexado com NO <sub>3</sub>		

Anexo C - Especificação iônica da fração mineral do meio basal EDM sem Na<sub>2</sub>EDTA e Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>7</sub>H<sub>2</sub>O, adicionado com 0,256 mmol L<sup>-1</sup> de o,o-EDDHA/Fe<sup>3+</sup>, denominado EDMm, obtida no GEOCHEM-EZ

<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	<b>Zn<sup>2+</sup></b>	<b>MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>
100,00 % livre	77,42 % livre	85,49 % livre	98,08 % livre
	0,04 % complexado com Na	0,10 % complexado com EDDHA	1,92 % complexado com H
<b>NH<sub>3</sub></b>	2,31 % complexado com K	0,02 % complexado com Cl	
0,05 % livre	15,89 % complexado com Ca	3,18 % complexado com SO <sub>4</sub>	<b>Ni<sup>2+</sup></b>
99,95 % complexado com H	0,05 % complexado com Zn	8,20 % complexado com PO <sub>4</sub>	76,24 % livre
	0,48 % complexado com Mn	2,34 % complexado com NO <sub>3</sub>	14,37 % complexado com EDDHA
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	3,79 % complexado com Mg	0,66 % complexado com OH	0,13 % complexado com NH <sub>3</sub>
7,80 % complexado com Ca			2,83 % complexado com SO <sub>4</sub>
0,06 % complexado com Zn	<b>B(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	<b>Na<sup>+</sup></b>	3,77 % complexado com PO <sub>4</sub>
1,47 % complexado com Mg	0,05 % livre	99,80 % livre	2,08 % complexado com NO <sub>3</sub>
88,45 % complexado com H	99,95 % complexado com H <sup>+</sup>	0,02 % complexado com Cl	0,57 % complexado com B(OH) <sub>4</sub>
2,21 % precipitado sólido com Fe		0,18 % complexado com SO <sub>4</sub>	
	<b>Cu<sup>2+</sup></b>	<b>Cl<sup>-</sup></b>	<b>EDDHA</b>
<b>K<sup>+</sup></b>	1,26 % livre	99,78 % livre	84,16 % complexado com Fe
99,71 % livre	98,41 % complexado com EDDHA	0,02 % complexado com Na	15,40 % complexado com Cu
0,29 % complexado com SO <sub>4</sub>	0,04 % complexado com NH <sub>3</sub>	0,10 % complexado com K	0,09 % complexado com Co
	0,06 % complexado com SO <sub>4</sub>	0,02 % complexado com Ca	0,35 % complexado com Mn
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	0,17 % complexado com PO <sub>4</sub>	0,02 % complexado com Mn	
93,05 % livre	0,04 % complexado com NO <sub>3</sub>	0,06 % complexado com Mg	
3,46 % complexado com SO <sub>4</sub>	0,01 % complexado com OH		
3,49 % complexado com PO <sub>4</sub>		<b>Co<sup>2+</sup></b>	
	<b>Fe<sup>3+</sup></b>	73,62 % livre	
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	84,16 % complexado com EDDHA	17,48 % complexado com EDDHA	
94,94 % livre	15,84 % in solid form with PO <sub>4</sub>	0,02 % complexado com NH <sub>3</sub>	
0,01 % complexado com NO <sub>3</sub>		3,44 % complexado com SO <sub>4</sub>	
2,80 % complexado com SO <sub>4</sub>	<b>Mn<sup>2+</sup></b>	3,93 % complexado com PO <sub>4</sub>	
2,24 % complexado com PO <sub>4</sub>	95,67 % livre	1,27 % complexado com NO <sub>3</sub>	
	0,73 % complexado com EDDHA	0,22 % complexado com B(OH) <sub>4</sub>	
	0,04 % complexado com Cl		
	3,56 % complexado com SO <sub>4</sub>		



Anexo D - Concentrações totais, livres e disponíveis para N total, íons de macro e micronutrientes, EDTA e o,o-EDDHA ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) nas soluções modeladas no GEOCHEM-EZ correspondentes a cada meio basal com pH fixo em 5,8. Neste caso o meio basal EDM sem  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  e  $\text{Fe}(\text{SO}_4)_7\text{H}_2\text{O}$ , adicionado com  $0,256 \text{ mmol L}^{-1}$  de o,o-EDDHA/ $\text{Fe}^{3+}$  (EDMm)

Metal/Ligando	Total ( $\text{mmol L}^{-1}$ )				Livre ( $\text{mmol L}^{-1}$ )				Disponível ( $\text{mmol L}^{-1}$ )			
	MS	JADS	WPM	EDMm	MS	JADS	WPM	EDMm	MS	JADS	WPM	EDMm
N total	60,00	26,00	14,70	26,91	39,41	22,00	9,71	20,723	60,00	26,00	14,70	26,91
$\text{NO}_3^-$	39,40	22,00	9,70	20,72	39,40	22,00	9,71	20,72	39,40	22,00	9,70	20,72
$\text{NH}_4^+$	20,60	4,00	5,00	6,19	0,01	0,002	0,003	0,003	20,60	4,00	5,00	6,19
$\text{PO}_4^{3-}$	1,25	3,00	1,25	1,84	$6,23 \times 10^{-8}$	$1,18 \times 10^{-7}$	$4,85 \times 10^{-8}$	$6,34 \times 10^{-8}$	1,16	2,62	1,16	1,62
$\text{K}^+$	20,00	11,00	12,60	7,18	19,93	10,90	12,31	7,16	19,93	10,90	12,31	7,16
$\text{Ca}^{2+}$	3,00	5,00	3,00	4,11	2,78	4,26	2,26	3,82	2,78	4,26	2,26	3,82
$\text{Mg}^{2+}$	1,50	3,00	1,50	1,21	1,42	2,66	1,19	1,15	1,42	2,66	1,19	1,15
$\text{SO}_4^{2-}$	1,70	3,32	7,40	0,89	1,39	2,47	6,10	0,69	1,39	2,47	6,10	0,69
$\text{B}(\text{OH})_4^-$	0,10	0,05	0,10	0,05	$4,91 \times 10^{-5}$	$2,40 \times 10^{-5}$	$4,74 \times 10^{-5}$	$2,26 \times 10^{-5}$	0,10	0,05	0,10	0,05
$\text{Cu}^{2+}$	0,0001	0,005	0,001	0,04	$2,55 \times 10^{-9}$	$3,58 \times 10^{-8}$	$2,65 \times 10^{-8}$	0,0005	$2,55 \times 10^{-9}$	$3,58 \times 10^{-8}$	$2,65 \times 10^{-8}$	0,0005
$\text{Fe}^{2+}$ *	0,10	0,20	0,10	0,26	0,04	0,03	0,04	$1,20 \times 10^{-12}$	0,0379	0,026	0,035	$1,20 \times 10^{-12}$
$\text{Mn}^{2+}$	0,07	0,10	0,10	0,12	0,04	0,03	0,06	0,116	0,04	0,03	0,06	0,116
$\text{Zn}^{2+}$	0,03	0,015	0,03	0,014	$1,52 \times 10^{-4}$	$2,14 \times 10^{-5}$	$1,57 \times 10^{-4}$	0,012	$1,52 \times 10^{-4}$	$2,14 \times 10^{-5}$	$1,57 \times 10^{-4}$	0,01
$\text{Na}^+$	0,20	0,40	0,20	0,21	0,20	0,40	0,20	0,21	0,20	0,40	0,2	0,21
$\text{Co}^{2+}$	0,0001	0,001	-	0,001	$5,06 \times 10^{-7}$	$1,43 \times 10^{-6}$	-	0,0009	$5,06 \times 10^{-7}$	$1,43 \times 10^{-6}$	-	0,0009
I	0,005	-	-	-	0,01	-	-	-	0,005	-	-	-
Cl	5,98	0,002	1,30	0,21	5,96	0,002	1,30	0,21	5,96	0,002	1,3	0,21
$\text{MoO}_4^{2-}$	0,001	0,0006	0,001	0,0006	0,001	0,0006	0,001	0,0006	0,001	0,0006	0,001	0,0006
$\text{Ni}^{2+}$	-	-	-	0,0001	-	-	-	$8,02 \times 10^{-5}$	-	-	-	$8,75 \times 10^{-5}$
o,o-EDDHA	-	-	-	0,256	-	-	-	$2,85 \times 10^{-21}$	-	-	-	-
EDTA	0,10	0,20	0,10	-	$3,25 \times 10^{-12}$	$8,01 \times 10^{-12}$	$1,89 \times 10^{-12}$	-	-	-	-	-
Totais	94,04	52,29	42,38	43,29								
$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	1,91	5,50	1,94	3,35								

\* = os valores de  $\text{Fe}^{2+}$  na solução do meio EDMm correspondem a  $\text{Fe}^{3+}$