

DAVID NICOLAS HERRERA PINEDO

MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus*  
*citriodora* E *Eucalyptus tereticornis*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de "Mestre em Ciências Florestais".

CURITIBA  
1989

MINISTERIO DA EDUCACAO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA  
SETOR DE CIENCIAS AGRARIAS  
COORDENACAO DO CURSO DE POS-GRADUACAO EM ENGENHARIA FLORESTAL

P A R E C E R

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado apresentada pelo candidato **DAVID NICOLÁS HERRERA PINEDO**, sob o título "**MICROPROPAGACAO DE Eucalyptus citriodora e eucalyptus tereticornis**" para obtenção do grau de Mestre em Ciências Florestais - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná. Área de concentração: **SILVICULTURA**, após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, são de parecer pela "**APROVACAO**" da Dissertação completando assim os requisitos necessários para receber o grau e o Diploma de Mestre em Ciências Florestais.

Observação:

O critério de aprovação da Dissertação e Defesa da mesma a partir de novembro de 1980 é apenas, **APROVADA** ou **NÃO APROVADA**.

Curitiba, 05 de maio de 1989

Profa. Dra. Maria Elisa Cortezzi Graça  
Primeira Examinadora

Prof. Dr. Franklin Galvão  
Segundo Examinador

Prof. Dr. Mario Takao Inoue  
Presidente da Banca



À minha mãe  
À memória do meu pai  
À meus irmãos  
À minha esposa  
À meus filhos,  
dedico o trabalho

## BIOGRAFIA DO AUTOR

DAVID NICOLAS HERRERA PINEDO, filho de Pablo Herrera Lobatón e Donata Pinedo de Herrera, nasceu em Quillacollo, Cochabamba, Bolívia, no dia 10 de setembro de 1956.

Em 1978, ingressou na Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP) e, em 1981, obteve o diploma de Engenheiro Florestal.

Foi contratado, em 1982, pelo "Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuários" da Bolívia, para trabalhar no projeto de pesquisas florestais no altiplano boliviano, em La Paz, Bolívia.

Em 1985, iniciou o Mestrado em Ciências Florestais, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

## AGRADECIMENTOS

Ao IDRC-International Development Research Centre do Governo do Canadá, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Florestas-EMBRAPA, por ter patrocinado a realização da pesquisa.

Ao Professor Dr. Antonio José de Araujo, pela orientação, apoio e confiança.

À Dra. Maria Elisa Cortezzi Graça, pela co-orientação, apoio e confiança.

Ao Professor Dr. Mario Takao Inoue, pela co-orientação.

Ao Pesquisador M.Sc. Edilson Batista de Oliveira, pela orientação nas análises estatísticas.

À Vera Lucia Beirrutti Eifler, pela idealização e confecção das fotos (FIGURAS 4, 7, 13 e 15) e também ao Dr. Jarbas Yukio Shimizu (FIGURAS 9, 10 e 11).

À Delia Mercedes Burgos Olivera, pelo trabalho datilográfico.

À Marta de Fátima Lima, pelo auxílio na impressão do texto.

Ao Pesquisador M.Sc. Antonio Aparecido Carpanezzi, então chefe do CNPF, por ter permitido a realização da pesquisa.

Ao Silvino Mendes, pelo apoio e ajuda.

Ao Colega e amigo Edmar Ramos de Siqueira, pelo apoio, ajuda e as valiosas informações no trabalho.

Ao Roberto Dávila Herrera e família, pelo incentivo, amizade e apoio.

À minha esposa Mercedes, pelo incentivo, apoio, compreensão e ajuda.

À minha mãe e irmãos, pelo incentivo e apoio.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do trabalho.

## SUMÁRIO

|         |   |      |
|---------|---|------|
|         | ABREVIACÕES.....                                      | vii  |
|         | LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....                            | viii |
|         | LISTA DE TABELAS .....                                | x    |
|         | RESUMO .....  | xii  |
|         | ABSTRACT .....  | xiii |
| 1       | INTRODUÇÃO .....                                      | 01   |
| 2       | REVISÃO DA LITERATURA .....                           | 05   |
| 2.1     | <i>Eucalyptus citriodora</i> .....                    | 05   |
| 2.2     | <i>Eucalyptus tereticornis</i> .....                  | 06   |
| 2.3     | SISTEMA DE GEMAS DOS <i>Eucalyptus</i> .....          | 07   |
| 2.4     | MELHORAMENTO GENÉTICO .....                           | 08   |
| 2.5     | PROPAGAÇÃO VEGETATIVA .....                           | 09   |
| 2.5.1   | Técnicas de Cultura "in vitro" .....                  | 09   |
| 2.5.1.1 | Tipos de Explantes e Estágio Fisiológico .....        | 10   |
| 2.5.1.2 | Meios de Cultura .....                                | 12   |
| 2.5.1.3 | Rendimento .....                                      | 14   |
| 3       | MATERIAIS E MÉTODOS .....                             | 15   |
| 3.1     | CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO .....                          | 15   |
| 3.2     | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTADÍSTICA ..... | 16   |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.3   | ORIGEM DOS EXPLANTES E PRÉ-DESINFESTAÇÃO ..... | 17 |
| 3.4   | DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES .....              | 17 |
| 3.5   | MEIOS DE CULTURA .....                         | 19 |
| 3.5.1 | Meio Básico .....                              | 19 |
| 3.5.2 | Meio para Indução das Brotações .....          | 20 |
| 3.5.3 | Meio para Multiplicação .....                  | 20 |
| 3.5.4 | Meio para Elongação .....                      | 21 |
| 3.5.5 | Meio para Enraizamento .....                   | 22 |
| 4     | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                   | 23 |
| 4.1   | DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES .....              | 23 |
| 4.1.1 | Explantes de <i>Eucalyptus citriodora</i> ..   | 23 |
| 4.1.2 | Explantes de <i>Eucalyptus tereticornis</i> .  | 25 |
| 4.2   | INDUÇÃO DE BROTAÇÕES .....                     | 27 |
| 4.2.1 | <i>Eucalyptus citriodora</i> .....             | 27 |
| 4.2.2 | <i>Eucalyptus tereticornis</i> .....           | 30 |
| 4.3   | MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES .....              | 32 |
| 4.3.1 | <i>Eucalyptus citriodora</i> .....             | 32 |
| 4.3.2 | <i>Eucalyptus tereticornis</i> .....           | 36 |
| 4.4   | ELONGAÇÃO DAS BROTAÇÕES .....                  | 43 |
| 4.5   | ENRAIZAMENTO .....                             | 49 |
| 4.5.1 | <i>Eucalyptus citriodora</i> .....             | 49 |
| 4.5.2 | <i>Eucalyptus tereticornis</i> .....           | 49 |
| 5     | CONCLUSÕES .....                               | 57 |
|       | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....               | 59 |

## ABREVIACÖES

- 1 AIA - Ácido indol-3-acético
- 2 AIB - Ácido indolbutírico
- 3 ANA - Ácido naftalenoacético
- 4 2,4-d - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- 5 BAP - N6-benzilaminopurina
- 6 CA - Carvão ativado
- 7 GA<sub>3</sub> - Ácido giberélico
- 8 M&S - Murashige & Skoog
- 9 p/v - Peso por volume
- 10 v/v - Volume por volume

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURA

- 1 ESQUEMA DA OBTENÇÃO DOS EXPLANTES E DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO..... 18
- 2 EFEITOS DE NIVEIS DE BAP E AIA, NA MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES DE *E. citriodora*, APÓS 30 DIAS DE CULTURA (GRÁFICO a) E 60 DIAS DE CULTURA (GRÁFICO b)..... 33
- 3 PROCESSO DE MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES DE *E. citriodora*..... 35
- 4 EFEITOS DE NIVEIS DE BAP E AIA, NA MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES DE *E. tereticornis*, APÓS 30 DIAS DE CULTURA (GRÁFICO a) E 60 DIAS DE CULTURA (GRÁFICO b)..... 38
- 5 EFEITOS DE NIVEIS DE BAP E ANA, NA MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES DE *E. tereticornis*, APÓS 30 DIAS DE CULTURA (GRÁFICO a) E 60 DIAS DE CULTURA (GRÁFICO b)..... 40

|    |   |    |
|----|---|----|
| 6  | PROCESSO DE MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES DE <i>E. tereticornis</i> .....   | 42 |
| 7  | EFEITOS DE NIVEIS DO ÁCIDO GIBERÉLICO E CARVÃO ATIVADO, NA ELONGAÇÃO DAS BROTAÇÕES DE <i>E. tereticornis</i> .....                                | 46 |
| 8  | ASPECTO DAS BROTAÇÕES ELONGADAS DE <i>E. tereticornis</i> , NA AUSÊNCIA DE CARVÃO ATIVADO E ÁCIDO GIBERÉLICO E NA PRESENÇA DO CARVÃO ATIVADO..... | 47 |
| 9  | EFEITOS DE NIVEIS DE CARVÃO ATIVADO E ÁCIDO GIBERÉLICO, NO ASPECTO DAS BROTAÇÕES ELONGADAS DE <i>E. tereticornis</i> .....                        | 48 |
| 10 | EFEITOS DE NIVEIS DE AIB E ANA, NO NÚMERO DE RAÍZES DE <i>E. citriodora</i> .....   | 52 |
| 11 | PROCESSO DE ENRAIZAMENTO DE <i>E. citriodora</i> .....  | 53 |
| 12 | EFEITOS DE NIVEIS DE AIB E ANA, NO NÚMERO DE RAÍZES DE <i>E. tereticornis</i> .....   | 55 |
| 13 | PROCESSO DE ENRAIZAMENTO DE <i>E. tereticornis</i> .....  | 56 |

## LISTA DE TABELAS

|   |  |    |
|---|--|----|
| 1 | EFEITO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EX-<br>POSIÇÃO, NA DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES DE <i>E.</i><br><i>citriodora</i> , APÓS 21 DIAS DE ISOLAMENTO.....   | 24 |
| 2 | EFEITO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EX-<br>POSIÇÃO, NA DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES DE <i>E.</i><br><i>tereticornis</i> , APÓS 21 DIAS DE ISOLAMENTO..... | 26 |
| 3 | EFEITOS DE NIVEIS DE BAP E AIA, NA INDUÇÃO DAS<br>BROTAÇÕES DE <i>E. citriodora</i> , APÓS 21 DIAS DE<br>CULTURA.....  | 29 |
| 4 | EFEITOS DE NIVEIS DE BAP E AIA, NA INDUÇÃO DAS<br>BROTAÇÕES DE <i>E. tereticornis</i> , APÓS 21 DIAS DE<br>CULTURA.....  | 31 |

|   |   |    |
|---|---|----|
| 5 | EFEITOS DE NIVEIS DE BAP E AIA NA ALTURA DAS BROTAÇÕES MULTIPLICADAS DE <i>E. citriodora</i> , APÓS 30 DIAS DE CULTURA (TABELA a) E 60 DIAS DE CULTURA (TABELA b).....    | 34 |
| 6 | EFEITOS DE NIVEIS DE BAP E AIA NA ALTURA DAS BROTAÇÕES MULTIPLICADAS DE <i>E. tereticornis</i> , APÓS 30 DIAS DE CULTURA (TABELA a) E 60 DIAS DE CULTURA (TABELA b).....  | 39 |
| 7 | EFEITOS DE NIVEIS DE BAP E ANA, NA ALTURA DAS BROTAÇÕES MULTIPLICADAS DE <i>E. tereticornis</i> , APÓS 30 DIAS DE CULTURA (TABELA a) E 60 DIAS DE CULTURA (TABELA b)..... | 41 |
| 8 | EFEITOS DE NIVEIS DE AIB E ANA, NO ENRAIZAMENTO DE <i>E. citriodora</i> , APÓS 7, 14 E 21 DIAS DE CULTURA.....  | 51 |
| 9 | EFEITOS DE NIVEIS DE AIB E ANA, NO ENRAIZAMENTO DE <i>E. tereticornis</i> , APÓS 7, 14 E 21 DIAS DE CULTURA.....  | 54 |

## RESUMO

Considerando a necessidade de se aperfeiçoar técnicas apropriadas de propagação vegetativa para multiplicação clonal, a pesquisa teve por objetivo, o desenvolvimento de uma metodologia de micropropagação, via segmentos nodais de plantas jovens de *E. citriodora* e *E. tereticornis*. As fases contempladas foram, desinfestação dos explantes, indução, multiplicação e alongação das brotações e ainda o enraizamento. Foi utilizado o meio básico de MURASHIGE & SKOOG, suplementado com sacarose a 2 % (p/v) e solidificado com agar a 0,8 % (p/v). Para a desinfestação dos explantes foram testadas diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) em diferentes períodos de exposição. Na indução e multiplicação utilizaram-se diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) e AIA (Ácido indol-3-acético) e, para a multiplicação de *E. tereticornis* incluíram-se diferentes concentrações de ANA (Ácido naftalenoacético). Utilizaram-se na alongação das brotações diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> (Ácido giberélico) e CA (Carvão ativado), no meio básico de M&S, suplementado com BAP a 0,1 mg/l e ANA a 0,1 mg/l. No enraizamento, foram usadas concentrações de ANA e AIB (Ácido indolbutírico) separadamente. A menor porcentagem de contaminação, foi obtida com o uso de 0,5 % de NaOCl por 10 minutos. Explantes de *E. citriodora* e *E. tereticornis* apresentaram uma maior indução e desenvolvimento, com o uso de BAP a 0,25 mg/l e AIA a 0,1 mg/l e BAP a 0,25 mg/l e AIA a 0,01 mg/l respectivamente. As maiores taxas de multiplicação de brotações para *E. citriodora* foram obtidas com BAP a 1,0 mg/l e AIA a 0,1 mg/l e, 0,5 mg/l de BAP para *E. tereticornis*. Para a alongação das brotações de *E. tereticornis*, a redução da concentração de BAP para 0,1 mg/l e ANA a 0,1 mg/l foi a melhor combinação. A alongação não foi necessário para o *E. citriodora*. O uso de AIB e ANA a 0,5 mg/l resultaram em um maior número de brotações para *E. citriodora* e *E. tereticornis* respectivamente. Neste estudo a micropropagação de plantas jovens, resultou em uma taxa média de multiplicação de 24,1 brotações/explante para *E. citriodora* e de 5,0 brotações/explante para *E. tereticornis*, com uma porcentagem de enraizamento de 86,7 % e 100 % respectivamente.

## ABSTRACT

An improved micropropagation procedure for massal clonal propagation of *Eucalyptus citriodora* and *Eucalyptus tereticornis* was obtained. Explants were surface sterilized with 0.5 or 1.0 % (v/v) sodium hypochlorite for various periods of exposure and aseptically transferred on MURASHIGE & SKOOG basal medium supplemented with 2 % (p/v) sucrose, 0.8 % (p/v) agar. In the growth induction and multiplication stages, various concentrations of BAP (benzylaminopurine) and IAA (indole-3-acetic acid) were used. For the multiplication stage of *E. tereticornis*, different concentrations of NAA (1-naphthalene acetic acid) were included. At elongation stage, combinations of different concentrations of GAg (gibberellic acid) and CA (activated charcoal) were added basal medium containing 0.1 mg/l BAP and NAA. Elongated shoots were rooted on media containing various concentrations of NAA and IBA (indole-3-butyric acid). Highest multiplication rates for *E. citriodora* were obtained with 1.0 mg/l BAP and 0.1 mg/l IAA whereas 0.5 mg/l was the best for *E. tereticornis*. Shoots of *E. tereticornis* elongated more on a media containing 0.1 mg/l of BAP and NAA. The elongation stage was not necessary for *E. citriodora*. The greatest number of rooted shoots occurred in medium containing 0.5 mg/l IBA and NAA for *E. citriodora* and *E. tereticornis*. In this work, multiplication rates of 24.1 and 5.0 shoots/explant and rooting of 86.7 and 100 % for *E. citriodora* and *E. tereticornis*, respectively were obtained.

## 1 INTRODUÇÃO

Entre as espécies florestais de rápido crescimento, os eucaliptos tem se destacado devido a multiplicidade de usos que apresentam, podendo ser empregados para fins de produção de matéria prima florestal, plantios de proteção, quebra-ventos e ornamentação. Proporcionam também madeiras de densidade baixa, media e alta, variando o seu uso desde a fabricação de caixas, móveis, carvão vegetal, papel até dormentes de estrada de ferro (MANGIERI & DIMITRI<sup>27</sup>). Por todas essas características e além de se desenvolverem em uma variedade de tipos de clima e solo, apresentam-se como uma das espécies florestais mais produtivas (BONGA & DURZAN<sup>6</sup>).

*Eucalyptus citriodora*, possui características importantes tanto pela madeira como pelo conteúdo de óleo na sua folhagem. Segundo STURION et. al.<sup>36</sup>, de doze espécies de eucaliptos estudadas, *E. citriodora*, apresentou madeira de maior densidade, sendo a mais adequada para a produção de energia e para usos que requerem resistência mecânica das peças. Além desses usos, sua madeira é também ótima para

serraria, postes, cabos para ferramentas, portas, embarcações e também, pela sua flexibilidade, pode ser utilizada em curvaturas. Ainda, as suas folhas possuem um óleo essencial, usado com fins medicinais, industriais e de perfumaria (MANGIERI & DIMITRI<sup>27</sup>).

No Brasil, *Eucalyptus citriodora* é muito conhecido, tendo sido plantado no norte de São Paulo e Triângulo Mineiro. Esta espécie está entre as primeiras introduzidas no Brasil por Navarro de Andrade e, por cruzar somente com *E. maculata* e *E. torelliana*, conservou sua pureza genética (GUIMARÃES et. al.<sup>18</sup>).

Uma outra espécie importante pelo seu uso e que começa a despontar como potencial para o Brasil, é o *Eucalyptus tereticornis*. Além de sua madeira ser útil para serraria, estruturas, construções e postes, é também usada para compensados, conglomerados, papel, lenha e carvão vegetal. Esta espécie florestal, vem revelando ser resistente a pragas e doenças e a deficiência hídrica (FERREIRA<sup>10</sup>).

No Brasil *Eucalyptus tereticornis* é bastante conhecido, embora sejam raros os plantios puros. Nos plantios realizados com sementes de origem de Rio Claro, é comum a presença de híbridos, principalmente com *E. grandis* e *E. urophylla*. As pesquisas realizadas com esta espécie indicam-na como adequada para a região do cerrado e da mata, em áreas com solos arenosos, quentes e úmidos no verão, e com seca de 4 a 5 meses no inverno (GUIMARÃES et. al.<sup>18</sup>).

A propagação dos *Eucalyptus* é realizada principalmente por sementes (BONGA & DURZAMÓ). Porém a maioria das espécies dos eucaliptos podem também ser propagadas vegetativamente (HARTNEY<sup>21</sup>). Segundo a FAO<sup>9</sup>, a propagação vegetativa de indivíduos, é promissora para a utilização direta e em grande escala dos ganhos obtidos por meio de programas de melhoramento genético.

Os principais métodos clássicos de propagação vegetativa usados com eucaliptos são: estaquia, enxertia e alporquia. A estaquia, apresenta o problema da dificuldade de enraizamento, principalmente a medida que aumenta a idade da planta, devido aparentemente a presença de substâncias inibidoras (PATON et. al.<sup>32</sup>). Ainda, segundo ANEJA & ATAL<sup>2</sup>, tentativas de multiplicar plantas de *Eucalyptus citriodora*, com alto conteúdo de óleo essencial, por meio da estaquia, não tiveram sucesso.

Por outro lado, a enxertia e a alporquia em *Eucalyptus*, são onerosas e só se aplicam para fins especiais, tais como estabelecimento de pomares de semente, jardim clonal e outros (CRESSWELL & FOSSARD<sup>8</sup>). Adicionalmente, ao baixo rendimento desses dois métodos de propagação vegetativa, a enxertia apresenta o problema de incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto (HARTNEY<sup>21</sup>).

Uma outra técnica alternativa de propagação vegetativa, é a micropropagação. Esta técnica é recomendada para a propagação de espécies que, quando propagadas pelos métodos convencionais, apresentam uma difícil ou demorada multiplicação ou para variedades de grande valor comercial (CHÉÉ<sup>7</sup>).

Ainda, esta técnica oferece as vantagens de requerer pouco espaço, propagar indivíduos livres de doenças e principalmente obter altas taxas de multiplicação (HARTNEY<sup>22</sup>). A micropropagação possibilitaria também, realizar programas de melhoramento genético em menor espaço de tempo (McKEAND & WEIR<sup>28</sup>) e a produção de plantas durante o ano todo, independente do clima, tempo, e com pequeno espaço físico (CHÉE<sup>7</sup>).

Até o presente momento, foram diversos os estudos realizados com micropropagação para as diferentes espécies de *Eucalyptus*. Especificamente para *Eucalyptus citriodora*, foram determinados meios para indução e multiplicação de brotações. Entretanto, não determinaram os meios para enraizamento (SITA<sup>34</sup>; GREWALL et. al.<sup>17</sup>). Por outro lado, GUPTA et. al.<sup>19</sup>, trabalhando com plantas adultas, conseguiram enraizar brotações só na quarta sub-cultura, e a porcentagem conseguida foi baixa (35% a 40%).

Considerando a necessidade de se aperfeiçoar técnicas de propagação vegetativa para multiplicação clonal, o presente trabalho teve por finalidade, a obtenção de uma metodologia de micropropagação de plantas jovens de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus tereticornis*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Eucalyptus citriodora*

*Eucalyptus citriodora* tem sua distribuição natural na parte oriental do estado de Queensland-Austrália, entre as latitudes 17° a 26° S. Existem duas áreas principais de ocorrência: entre Mackay e Maryborough (22° a 26° S), e na região próxima a Atherton (17° a 19° S). A primeira população se encontra a uma altitude de 75 a 300 metros, e a segunda de 600 a 800 metros (HILLIS & BROWN<sup>24</sup>). Esta espécie, ocorre também associada com populações de *Eucalyptus tereticornis*, *E. triantha*, *E. siderophloia*, *E. paniculata*, *E. pro-pinqua*, *E. maculata* e *Araucaria cunninghamii* (MANGIERI & DIMITRI<sup>27</sup>).

Quanto as exigências edafoclimáticas, esta espécie ocorre em regiões tropicais, com precipitação pluviométrica anual de 600 a 1000 mm. Os tipos de solo onde melhor se desenvolvem são argilo-arenosos, avermelhados, podzólicos e lateríticos, bem drenados e profundos, podendo também se

adaptar aos solos pobres (MANGIERI & DIMITRI<sup>27</sup>).

No Brasil é uma das espécies de maior plasticidade, encontrando-se plantações desde o Estado do Rio Grande do Sul até a região amazônica. Entretanto, devido a sua sensibilidade às geadas e sua elevada tolerância à condições de seca, são recomendados para quase a totalidade da região norte e central do Brasil, incluindo os Estados do Piauí, Ceará, quase a totalidade dos Estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, a totalidade do Estado de Minas Gerais e parte do Espírito Santo (GOLFARI & PINHEIRO NETO<sup>15</sup>).

## 2.2 *Eucalyptus tereticornis*

Árvore cônica de porte médio, sendo que às vezes pode-se encontrar indivíduos de grande tamanho (MANGIERI & DIMITRI<sup>27</sup>). Na Austrália, a altura das plantas desta espécie chega a 45 m ou mais, com tronco reto e copa bastante densa. A casca é lisa, branca ou pigmentada (FAO<sup>9</sup>). A sua distribuição natural ocorre entre as latitudes de 6° a 38° S, compreendendo os estados de Queensland, New Wale, Victoria, chegando até Papua-Nova Guiné (FERREIRA<sup>10</sup>).

Em relação às exigências edafoclimáticas, suporta uma variedade de tipos de solo, de preferência solos profundos, bem drenados, aluviais, limo e argilo-arenosos. As condições ótimas de precipitação pluviométrica anual se situam entre 800 mm e 1500 mm, com regimes de chuva predominante no ve-

rão, com uma estação seca moderada a bastante rigorosa. Apresenta-se mais tolerante à seca que *Eucalyptus grandis*, mas ligeiramente menos tolerante que o *E. camaldulensis* (FAO<sup>9</sup>).

Esta espécie é amplamente difundida no Brasil, sendo que no Estado de São Paulo se encontra extensamente cultivada e, ainda, é também indicada como potencialmente apta, para quase a totalidade da região norte e central do Brasil, incluindo os Estados de Piauí, Ceará, quase a totalidade dos Estados de Alagoas, Sergipe, Bahia, parte dos Estados de Pernambuco, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Paraná (GOLFARI & PINHEIRO NETO<sup>15</sup>).

### 2.3 SISTEMA DE GEMAS DOS *Eucalyptus*

Os eucaliptos, por não possuírem gemas latentes, apresentam um crescimento contínuo, sendo que, o ápice principal produz continuamente pares de folhas a intervalos regulares, constituindo um "broto de crescimento indefinido". Ainda, na axila de cada folha existe uma gema pedunculada, que por não possuir proteção de escamas é denominada de gema nua. As gemas nuas próximas ao ápice, desenvolvem-se simultaneamente a estas dando origem aos ramos de primeira ordem ou, caso o ápice principal é destruído, esta assume a função do ápice em questão de dias (FAO<sup>9</sup>).

Os eucaliptos possuem também sob as gemas nuas, pontos de tecido meristemático capaz de produzir novas gemas axilares. O desenvolvimento desse tecido meristemático é inibido devido à concentração hormonal produzida na gema nua ou na brotação superior, e quando uma ou outra é destruída essa inibição é removida, possibilitando o surgimento das gemas acessórias (FAO<sup>9</sup>).

#### 2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO

As variações intrínsecas das espécies do gênero *Eucalyptus*, podem ser tanto clinais como ecotípicas. A variação clinal é encontrada nas espécies de eucaliptos mais amplamente distribuídas, expressa-se tanto em caracteres morfológicos como nos fisiológicos. O estudo de tais modos de variação é essencial para resolver muitos problemas de nomenclatura e para determinar as melhores fontes de sementes (PRYOR<sup>33</sup>). As ecotípicas tem uma distribuição mais limitada, caracterizado pela ocorrência às vezes de procedências isoladas, adaptadas a condições ecológicas específicas (FAO<sup>9</sup>).

Segundo a FAO<sup>9</sup>, na atualidade os programas de melhoramento genético mais promissórios, são aqueles que utilizam os progressos conseguidos com a propagação vegetativa, para a produção massal de material geneticamente melhorado. As possíveis estratégias para o melhoramento genético de eucaliptos são: seleção de espécies e de procedências; seleção e ordenação dos pomares de sementes; seleção individual; teste

de progênie e clonal; estabelecimento de pomares de sementes; cruzamento controlado; produção massal por propagação vegetativa de material geneticamente melhorado.

## 2.5 PROPAGAÇÃO VEGETATIVA

A propagação vegetativa, é de muita importância quando a composição genética (genótipo) é amplamente heterozigota e suas características importantes se perdem ao ser propagadas por sementes (HARTMANN & KESTER<sup>20</sup>).

Além dos diferentes métodos clássicos de propagação vegetativa dos eucaliptos, tais como estaquia, enxertia e alporquia, existe outra técnica alternativa, que é a micropropagação (HARTNEY<sup>21</sup>).

### 2.5.1 Técnicas de Cultura "in vitro"

A micropropagação ou cultura "in vitro", é uma técnica pela qual pequenas partes de tecido ou órgão são removidos de uma planta doadora e cultivados assepticamente num meio de cultura (BONGA<sup>5</sup>). Ainda CHÉÉ<sup>7</sup>, definiu a micropropagação como um método rápido de propagação vegetativa, baseado na multiplicação assexuada de uma planta cultivada "in vitro".

Referente aos custos, de modo geral todos os métodos de propagação vegetativa são mais onerosos do que a propagação sexuada (CRESSWELL & FOSSARD<sup>8</sup>). Porém, a utilização de

técnicas de micropropagação em programas de melhoramento, levaram ao consenso de que compensam os custos necessários (BONGA<sup>5</sup>). Num estudo de produção massal de eucaliptos tolerantes à geada, determinou-se que o custo é aproximadamente o dobro do que por sementes, mas que é compensado pelo desempenho consequente da planta (FRANCLET & BOULAY<sup>14</sup>).

#### 2.5.1.1 Tipos de Explante e Estágio Fisiológico

Para as técnicas de cultura "in vitro", diversas partes da planta podem ser usadas como fontes de explantes, tais como lignotuber, hipocótilo e cotilédone, estames, segmentos nodais ou gemas terminais e axiais, caule e raiz (ANEJA & ATAL<sup>2</sup>; BARKER et. al.<sup>3</sup>; BENNETT & McCOMB<sup>4</sup>; FOSSARD & BOURNE<sup>12</sup>; FOSSARD et. al.<sup>13</sup>; FRANCLET & BOULAY<sup>14</sup>; GREWAL et. al.<sup>17</sup>; GUPTA et. al.<sup>19</sup>; HARTNEY & BARKER<sup>23</sup>; KITAHARA & CALDAS<sup>25</sup>; LEE & FOSSARD<sup>26</sup>; MEHRA-PALTA<sup>29</sup>; OKA et. al.<sup>31</sup>; SITA<sup>34</sup>).

BENNETT & McCOMB<sup>4</sup>, usando diferentes explantes de *Eucalyptus marginata*, verificaram que segmentos nodais apresentaram altas taxas de contaminação, em comparação com a cultura de filamentos de estames que não se contaminaram. Por outro lado, FOSSARD & BOURNE<sup>12</sup>, observaram que a contaminação de explantes provenientes de segmentos nodais foi em média 30%, enquanto que os da gema apical foi em torno de 6%.

Com relação ao estágio fisiológico, foi observado que influe na regeneração de plântulas. Estudos experimentais indicam que a micropropagação de plantas adultas é mais

difícil. Assim, BENNETT & McCOMB<sup>4</sup>, observaram que a porcentagem de enraizamento de explantes de plantas adultas de *Eucalyptus marginata* era mais baixo do que de plantas jovens.

Da mesma forma, CRESSWELL & FOSSARD<sup>8</sup>, usando segmentos nodais de plantas jovens de *Eucalyptus grandis*, obtiveram enraizamento mais facilmente do que com plantas adultas. Entretanto, com essa mesma espécie FOSSARD et. al.<sup>13</sup>, trabalhando com plantas que tinham mais do que 50 entrenós, conseguiram iniciação de enraizamento e desenvolvimento de plântulas a partir de explantes consideravelmente mais altos do que o 15º entrenó.

Ainda, GUPTA et. al.<sup>19</sup>, usando gemas terminais e axiais de plantas com 20 anos de idade de *Eucalyptus citriodora*, obtiveram de 30% a 40% de enraizamento das brotações na quarta sub-cultura, e 45% a 50% na quinta e subsequente sub-cultura.

Adicionalmente ao estágio fisiológico, outro problema encontrado na micropropagação de plantas adultas é a contaminação. Trabalhando com quatro espécies de *Eucalyptus*, BARKER et. al.<sup>3</sup>, observaram que *E. ficifolia* e *E. polybractea* produziram brotações múltiplas a partir de segmentos nodais de plantas adultas, enquanto que *E. grandis* e *E. regnans* foram afetados pela contaminação.

### 2.5.1.2 Meios de Cultura

Os requerimentos dos constituintes dos meios para a cultura "in vitro" variam com a espécie e com o tipo de explante. Entretanto, existem diferentes meios de cultura de constituição definida, tais como de M&S (MURASHIGE & SKOOG<sup>30</sup>), WHITE<sup>37</sup> e outros, os quais serviram como meios básicos, principalmente com relação aos sais inorgânicos e vitaminas, para muitas espécies de *Eucalyptus*.

Assim, um primeiro trabalho bem sucedido foi com lignotuber de *Eucalyptus citriodora* (ANEJA & ATAL<sup>2</sup>). Entretanto, nesse trabalho não foram descritos com detalhes os meios usados. Em outro trabalho com essa mesma espécie, SITA<sup>34</sup>, conseguiu induzir organogênese no meio básico de M&S. Entretanto, devido à alta contaminação, apenas três brotações sobreviveram.

Por outro lado, a partir de explantes obtidos de hipocótilos de *Eucalyptus alba*, no meio de WHITE, contendo AIA (Ácido indol-3-acético) ou 2,4-d (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e água de coco, KITAHARA & CALDAS<sup>25</sup> obtiveram a formação de calo e subsequente enraizamento. As brotações só ocorreram após dois meses, num meio contendo água de coco e AIA.

Segundo FOSSARD<sup>11</sup>, a adição de água de coco no meio tem sido muito efetiva na indução em várias espécies em cultura de tecidos, mas devido a sua natureza química indefinida e por sua origem biológica, introduz a possibilidade de obter resultados difíceis de serem reproduzidos e por is-

so prefere-se substituí-la por substâncias químicas definidas.

Em outro trabalho OKA et. al.<sup>31</sup>, a partir de segmentos de hipocótilo de *Eucalyptus globulus*, obtiveram a regeneração de plântulas num meio com BAP (N6-benzilaminopurina) e ANA (Ácido naftalenoacético). Por outro lado, na tentativa de induzir a regeneração de órgãos, a partir de calos de tecido de caule e lignotuber de *E. bancroftii*, LEE & FOS-SARD<sup>26</sup>, utilizando várias concentrações de diferentes auxinas e citocininas, não obtiveram sucesso.

GREWAL et. al.<sup>17</sup>, usando brotações apicais de *Eucalyptus citriodora*, observaram que o ácido ascórbico favoreceu a iniciação das brotações e seu desenvolvimento. Detectaram também que, reduzindo as fontes de nitrogênio ( $\text{KNO}_3$  950 mg/l e  $\text{NH}_4 \text{NO}_3$  825 mg/l) e aumentando a concentração de cálcio ( $\text{Ca Cl}_2$  880 mg/l) do meio M&S, a taxa de multiplicação era maior do que com as concentrações normais. A adição de ácido ascórbico controla a produção de oxidação e produz efeitos auxiliares na iniciação e multiplicação de brotações. Entretanto, a causa da eficiência de baixos níveis de nitrogênio e altos níveis de cálcio não foi determinada.

Com relação ao CA (Carvão Ativado), quando usado num meio de cultura de *Eucalyptus citriodora*, favoreceu a alongação das brotações e tamanho das folhas. A altura variou de 5 a 8 cm e de 0,2 a 1,0 cm, com e sem uso de CA respectivamente. Entretanto, o número de brotações reduziu significativamente. A exsudação fenólica na cultura de tecidos é possivelmente uma das causas que inibe as brotações. A

adição de DA absorveria essas substâncias provocando efeitos satisfatórios para o desenvolvimento de brotações (AHUJA<sup>1</sup>).

Por outro lado, FOSSARD & BOURNE<sup>12</sup> detectaram que os meios com agar foram superiores aos meios líquidos, tanto para desenvolvimento das brotações como para as raízes, e que os meios sem citocinina eram melhores para o enraizamento.

### 2.5.1.3 Rendimento

Sob o ponto de vista de produção massal, a partir de uma gema simples de *Eucalyptus citriodora*, GUPTA et. al.<sup>19</sup> estimaram que em média 100.000 plantas/ano poderiam ser produzidas. A propagação clonal "in vitro" de plantas de diferentes idades e populações de *E. urophylla*, foi em média  $7,5 \times 10^{13}$  plantas/ano (GONÇALVES<sup>16</sup>). HARTNEY & BARKER<sup>23</sup>, obtiveram uma taxa de multiplicação de brotações, de no mínimo três vezes em três semanas, representando uma taxa de produção teórica aproximadamente de  $1,3 \times 10^8$  brotações/ano a partir de um único segmento nodal, para várias espécies de *Eucalyptus*.

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CONDIÇÕES DE INCUBAÇÃO

Os experimentos foram conduzidos sob condições controladas de temperatura e luz. A temperatura para todos os experimentos foi de  $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ .

Com relação à luminosidade, os experimentos de indução, multiplicação e alongação das brotações foram conduzidos sob intensidade luminosa de 1000 Lux, obtidas com lâmpadas fluorescentes "sylvania" (luz tipo branca-fria), no regime fotoperiódico de 16 horas, sendo que, o experimento de indução de brotações foi incubado inicialmente por 7 dias sem luz. Por outro lado, as condições de incubação do experimento de enraizamento, foi na escuridão total.

### 3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento utilizado para todos os experimentos, foi completamente casualizado.

Com relação à análise dos resultados, foram utilizados vários testes estatísticos para os diferentes experimentos. Os resultados de explantes sadios, brotações induzidas e presença de raízes, dos experimentos de desinfestação, indução e enraizamento respectivamente, por se distribuírem de acordo a distribuição binomial, o desvio padrão para cada experimento foi calculado pela fórmula da binomial e o teste estatístico utilizado foi do Qui-quadrado, com exceção dos resultados de enraizamento de *Eucalyptus tereticornis*, que por ter apresentado o cálculo da frequência esperada menor que 5, foi utilizado o teste exato de Fischer. O nível de probabilidade para os dois testes foi de 5 %.

Por outro lado, os resultados da taxa de multiplicação, incremento em altura e número de raízes, dos experimentos de multiplicação, alongação e enraizamento respectivamente, foram apresentados em gráficos ilustrativos, que possibilitaram observar o comportamento e a tendência, dos diferentes níveis de reguladores de crescimento. Ainda, nos gráficos foi apresentado o intervalo de confiança para cada média, ao nível de probabilidade de 5%.

### 3.3 ORIGEM DOS EXPLANTES E PRÉ-DESINFESTAÇÃO

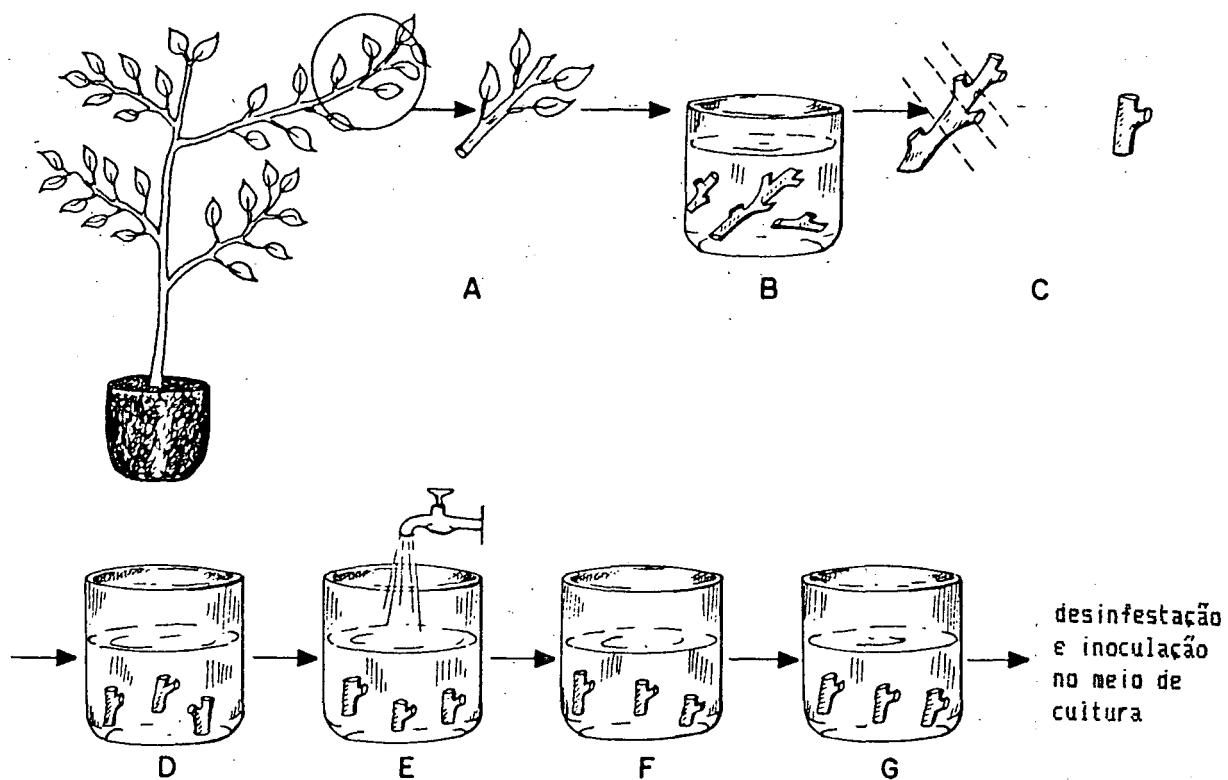
Foram utilizados, explantes oriundos de segmentos nodais de plantas jovens a partir de 1 ano até 2,5 anos de idade, de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus tereticornis*. As plantas jovens foram produzidas a partir de sementes e cultivadas em casa de vegetação do Centro Nacional de Pesquisas de Florestas.

Para a obtenção dos explantes foram removidos ramos apicais de varias plantas das duas espécies, posteriormente desfolhados e colocados num recipiente com água e transportados para o laboratório. No laboratório, foram removidos os segmentos nodais dos ramos desfolhados e colocados numa solução do detergente comercial "odd" a 1,5% (v/v) por 30 minutos e posteriormente lavados com água corrente. Logo após, foram mergulhados numa solução do fungicida comercial "benlate" (metil-1-(butilcarbamoil)-2-benzamidazol carbamato), na concentração de 500 mg/l por 5 minutos, em seguida lavados com água bidestilada (ESQUEMA DA FIGURA 1).

### 3.4 DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES

Os explantes após receber os pré-tratamentos com detergente comercial e fungicida, foram transportados para a câmara asséptica, onde foram submetidos aos seguintes tratamentos:

FIGURA 1. ESQUEMA DA OBTENÇÃO DOS EXPLANTES E DOS PRÉ-TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO.



- A - Ramo removido da planta
- B - Transporte em água p/ laboratório, ramo desfolhado
- C - Remoção dos segmentos nodais
- D - Pré-tratamento em detergente comercial
- E - Lavagem em água corrente
- F - Pré-tratamento em fungicida
- G - Lavagem em água bidestilada

- (1) hipoclorito de sódio (0,5 %) por 10 min;
- (2) hipoclorito de sódio (0,5 %) por 20 min;
- (3) hipoclorito de sódio (0,5 %) por 30 min;
- (4) hipoclorito de sódio (0,5 %) por 40 min;
- (5) hipoclorito de sódio (1,0 %) por 05 min;
- (6) hipoclorito de sódio (1,0 %) por 10 min;
- (7) testemunha (sem hipoclorito de sódio)

Todos os tratamentos com exceção da testemunha, incluíram o adsorvente TWEEN-20.

Após receber os tratamentos, os explantes foram lavados por três vezes em água bidestilada e esterilizada e, posteriormente inoculados verticalmente no meio de cultura.

A avaliação foi realizada aos 21 dias e as variáveis foram, contaminação, oxidação e explantes saudios. Cada tratamento foi repetido 60 vezes.

### 3.5 MEIOS DE CULTURA

#### 3.5.1 Meio Básico

Foi utilizado o meio básico de MURASHIGE & SKOOG<sup>34</sup>, suplementado com sacarose a 2 % (p/v) e solidificado com agar a 0,8 % (p/v). O pH foi ajustado em 5,8 antes da esterilização.

Os meios de cultura foram distribuídos em dois tipos de recipientes de vidro; para as fases de indução das brotações e enraizamento, foram utilizados recipientes de 3 cm de diâmetro por 8 cm de altura, com capacidade de 40 ml e, a

quantidade de meio distribuído por recipiente foi de 7 ml e 10 ml respectivamente. Para as fases de multiplicação e alongação das brotações, foram usados recipientes de 6 cm de diâmetro por 6,8 cm de altura, com capacidade de 120 ml e a quantidade de meio distribuído por recipiente, em ambas fases, foi de 25 ml. Os recipientes foram fechados com papel alumínio e logo após esterilizados em autoclave a 120° C por 10 minutos.

### 3.5.2 Meio para Indução das Brotações

Para a indução das brotações os tratamentos constituíram da combinação de diferentes concentrações de BAP (0,1 mg/l e 0,25 mg/l) e AIA (0,01 mg/l e 0,1 mg/l) além da testemunha.

A avaliação foi realizada aos 21 dias e as variáveis foram, brotações induzidas e desenvolvimento. Os critérios adotados para a avaliação do desenvolvimento das brotações foram de acordo com o número de pares de folhas lançadas. Adotaram-se quatro classes de desenvolvimento para avaliá-las: F F (brotações com folhas fechadas); 1 P F A (brotações com um par de folhas abertas); 2 P F A (brotações com dois pares de folhas abertas); +3 P F A (brotações com três ou mais pares de folhas abertas).

### 3.5.3 Meio para Multiplicação

Nesta fase, para as duas espécies, foram utilizados a combinação das diferentes concentrações de BAP (0,5 mg/l; 1,0 mg/l e 2,0 mg/l) e AIA (0,01 mg/l e 0,1 mg/l) e a teste-

munha. Porém, devido ao reduzido número de repetições restantes da espécie *Eucalyptus tereticornis*, não foi possível avaliá-la, razão pela qual foi realizado um outro experimento incluindo uma concentração menor de BAP (0,1 mg/l) e ausência de AIA, resultando na seguinte combinação: BAP (0,1 mg/l; 0,5 mg/l; 1,0 mg/l e 2,0 mg/l) e AIA (0; 0,01 mg/l e 0,1 mg/l) e a testemunha.

Por causa da baixa taxa de multiplicação das brotações de *Eucalyptus tereticornis*, no experimento anterior, foi realizado mais um experimento constituído de BAP (0,5 mg/l; 1,0 mg/l e 2,0 mg/l) e ANA (0; 0,01 mg/l e 0,1 mg/l) e a testemunha (BAP a 0,5 mg/l e AIA a 0,1 mg/l).

A avaliação dos experimentos foi realizada aos 30 e 60 dias e as variáveis foram, a taxa de multiplicação e a altura das brotações.

#### 3.5.4 Meio para Elongação

Esta fase não foi necessária para o *Eucalyptus citriodora* por apresentar suas brotações multiplicadas uma altura adequada ao enraizamento.

Para a elongação das brotações de *Eucalyptus tereticornis*, foi utilizado como meio básico o meio M&S, suplementado com BAP a 0,1 mg/l e ANA a 0,1 mg/l. O experimento resultou da combinação das diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> (Ácido Giberélico) (0; 0,1 mg/l e 1,0 mg/l) e CA (0; 0,5 % e 1,0 %) e a testemunha.

A avaliação foi realizada aos 30 dias e as variáveis foram, incremento em altura e aspecto. Devido à impossibilidade de se medir o aspecto, optou-se por avaliar na forma descritiva, considerando a coloração, oxidação na base, exsudação nas folhas (gotículas, tipo calo, presente na superfície das folhas, de constituição desconhecida, que causam a morte a partir do apice para base), morfologia, deterioração e morte.

#### 3.5.5 Meio para Enraizamento

Nesta fase foram testadas diferentes concentrações de AIB (Ácido indolbutírico) (0,5 mg/l; 1,0 mg/l e 2,0 mg/l) e ANA (0,5 mg/l e 1,0 mg/l), separadamente e a testemunha (sem regulador de crescimento). O ANA por ser uma auxina mais potente, não foi utilizada a concentração de 2,0 mg/l, como para AIB.

As avaliações foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias de cultura e as variáveis foram, presença e número de raízes.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES

#### 4.1.1. Explantes de *Eucalyptus citriodora*

Como pode-se observar na TABELA 1, todos os tratamentos utilizados para a desinfestação dos explantes, foram melhores no controle da contaminação em relação a testemunha, que apresentou 100 % de contaminação.

Embora os tratamentos 1, 5 e 6 não diferiram estatisticamente, o tratamento 1 foi o que apresentou maior porcentagem de explantes sadios.

Com relação à oxidação, o tratamento 1 apresentou a menor porcentagem de oxidação, seguido pelos tratamentos 5 e 6.

O período de exposição mostrou ser fundamental na oxidação dos explantes. Quanto maior foi o tempo de exposição dos explantes no hipoclorito de sódio, maior foi a porcentagem de oxidação. Como pode-se observar, embora os tra-

TABELA 1. EFEITO DO HIPDCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EXPOSIÇÃO, NA DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES DE *E. coli*-*fríodora*, APÓS 21 DIAS DE ISOLAMENTO.

| TRATAMENTOS | NaOCl (%)  | PER.: EXPO. (min) | CONT. (%) | OXID. (%) | EXPLANTES  |     |
|-------------|------------|-------------------|-----------|-----------|------------|-----|
|             |            |                   |           |           | SADIOS (%) | S   |
| 1.          | 0,5        | 10                | 1,7       | 21,7      | 76,7 a     | 5,4 |
| 2.          | 0,5        | 20                | 1,7       | 56,7      | 41,7 cd    | 6,3 |
| 3.          | 0,5        | 30                | 1,7       | 66,7      | 31,7 d     | 6,0 |
| 4.          | 0,5        | 40                | 1,7       | 45,0      | 53,3 bc    | 6,4 |
| 5.          | 1,0        | 5                 | 3,3       | 35,0      | 61,7 ab    | 6,3 |
| 6.          | 1,0        | 10                | 1,7       | 35,0      | 63,7 ab    | 6,2 |
| 7.          | testemunha |                   | 100,0     | 0         | 0          | 0   |

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste Qui-quadrado ( $P > 0,05$ ).

Per.: Expo. - Período de Exposição  
 Cont. - Contaminação  
 Oxid. - Oxidação  
 S - Desvio-padrão

tamentos 5 e 6, sejam constituídos de 1 % de hipoclorito de sódio, devido ao período de exposição dos explantes, apresentaram menor porcentagem de oxidação, que os tratamentos com 0,5 % de hipoclorito de sódio por 20, 30 e 40 minutos. Isso possivelmente é devido, a que exista uma maior penetração de hipoclorito de sódio nos tecidos dos explantes, a medida que aumenta o tempo de exposição, promovendo uma maior liberação de fenóis pela injúria nos tecidos, que causam a oxidação.

Pelos resultados obtidos, para a desinfestação dos explantes desta espécie, pode-se indicar uma baixa concentração de hipoclorito de sódio (0,5 %) por 10 minutos de exposição, como a melhor para a desinfestação dos explantes.

#### 4.1.2 Explantes de *Eucalyptus tereticornis*

Como pode-se observar na TABELA 2, todos os tratamentos utilizados para a desinfestação dos explantes, foram eficientes no controle da contaminação em relação a testemunha, que apresentou 98,3 % de contaminação.

Nos resultados de explantes sadios, todos os tratamentos com exceção da testemunha não apresentaram diferenças estatísticas.

Com relação a oxidação, todos os tratamentos com hipoclorito de sódio, apresentaram oxidação acima de 30 % e, como aconteceu com *Eucalyptus citriodora*, a oxidação foi o fator que influenciou na diminuição dos explantes sadios. Com

TABELA 2. EFEITO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO E PERÍODO DE EXPOSIÇÃO NA DESINFESTAÇÃO DOS EXPLANTES DE *E. teretiacornis*, APÓS 21 DIAS DE ISOLAMENTO.

| TRATAMENTOS | NaOCl<br>(%) | PER%.<br>EXPO.<br>(min) | CONT.<br>(%) | OXID.<br>(%) | EXPLANTES     |     |
|-------------|--------------|-------------------------|--------------|--------------|---------------|-----|
|             |              |                         |              |              | SADIOS<br>(%) | S   |
| 1.          | 0,5          | 10                      | 5,0          | 33,3         | 61,7 a        | 6,3 |
| 2.          | 0,5          | 20                      | 0            | 35,0         | 65,0 a        | 6,2 |
| 3.          | 0,5          | 30                      | 1,7          | 46,7         | 51,7 a        | 6,4 |
| 4.          | 0,5          | 40                      | 0            | 35,0         | 65,0 a        | 6,2 |
| 5.          | 1,0          | 05                      | 0            | 38,0         | 61,7 a        | 6,3 |
| 6.          | 1,0          | 10                      | 5,0          | 30,0         | 65,0 a        | 6,2 |
| 7.          | testemunha   |                         | 98,3         | 0            | 1,7 b         | 1,7 |

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste Qui-quadrado ( $P > 0,05$ ).

PER%. EXPO. - Período de Exposição  
 CONT. - Contaminação  
 OXID. - Oxidação  
 S - Desvio-padrão

esta espécie, não ocorreu a mesma tendência definida, do aumento da oxidação a medida que aumenta o tempo de exposição. Embora, os tratamentos com 0,5 % de hipoclorito de sódio tenham apresentado um aumento na porcentagem de oxidação, quando o período de exposição foi aumentado até 30 minutos, mas aos 40 minutos ao contrário de continuar aumentando, houve uma diminuição da oxidação. Por outro lado, nos tratamentos constituídos de 1 % de hipoclorito de sódio, ocorreu também uma diminuição da oxidação, quando aumentou o período de exposição de 5 para 10 minutos.

## 4.2 INDUÇÃO DAS BROTAÇÕES

### 4.2.1 *Eucalyptus citriodora*

Todos os tratamentos, inclusive a testemunha, conseguiram induzir as brotações e não diferem estatisticamente (TABELA 3).

Com relação ao desenvolvimento, os tratamentos 1 e 4 são os que apresentaram porcentagens acima de 50 % de brotações com dois a mais pares de folhas abertas.

O estado de desenvolvimento das brotações é importante para poder prosseguir com a fase posterior, que é a multiplicação das brotações. Quando foram utilizadas brotações pouco desenvolvidas, principalmente brotações com um par de folhas abertas ou brotações sem folhas abertas, para a fase de multiplicação, essas brotações não se adaptaram aos meios dessa fase, já que não conseguiram nem multiplicar-se e fi-

caram com baixo número de repetições, na avaliação aos 30 dias, que impossibilitou sua análise estatística. Isso devido possivelmente, à necessidade de que as brotações induzidas atinjam primeiramente um desenvolvimento adequado, nos meios com baixas concentrações de BAP, que permita a habituação das brotações aos meios de multiplicação (meios constituídos de concentrações maiores de BAP). Caso contrário, as concentrações mais altas de BAP possivelmente sejam tóxicas para esse tipo de brotações pouco desenvolvidas.

Considerando a porcentagem de brotações induzidas, conjuntamente com seu desenvolvimento, para esta espécie foi mais recomendado o tratamento com BAP a 0,25 mg/l e AIA a 0,1 mg/l.

TABELA 3. EFEITOS DE NÍVEIS DE BAP E AIA, NA INDUÇÃO DAS BROTAÇÕES DE *E. citriodora*, APÓS 21 DIAS DE CULTURA.

|    | TRATAMENTOS   |      | Nº<br>REP. | BROT.IND.<br>(%) | DESENVOLVIMENTO |              |              |               |
|----|---------------|------|------------|------------------|-----------------|--------------|--------------|---------------|
|    | BAP<br>-mg/l- | AIA  |            |                  | F F<br>(%)      | 1 PFA<br>(%) | 2 PFA<br>(%) | +3 PFA<br>(%) |
| 1. | 0,1           | 0,01 | 52         | 71,1 a           | 35,1            | 13,5         | 29,7         | 21,6          |
| 2. | 0,1           | 0,1  | 48         | 72,9 a           | 31,4            | 25,7         | 28,6         | 14,3          |
| 3. | 0,25          | 0,01 | 50         | 74,0 a           | 37,8            | 45,9         | 8,1          | 8,1           |
| 4. | 0,25          | 0,1  | 47         | 74,5 a           | 14,3            | 28,5         | 25,6         | 31,4          |
| 5. | testemunha    |      | 48         | 68,8 a           | 33,4            | 45,4         | 21,2         | 0             |

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste do Qui-quadrado (P > 0,05)

Nº REP. - Número de Repetições

BROT.IND. - Brotações Induzidas

F F - Brotações com Folhas Fechadas

1 PFA - Brotações com um Par de Folhas Abertas

2 PFA - Brotações com dois Pares de Folhas Abertas

+3 PFA - Brotações com três ou mais Pares de Folhas Abertas

#### 4.2.2 *Eucalyptus tereticornis*

O tratamento 3, embora não seja diferente estatisticamente dos tratamentos 1, 4 e 5, é o tratamento que apresentou maior porcentagem de brotações induzidas e o único diferente estatisticamente do tratamento 2, que apresentou a menor porcentagem de brotações induzidas (TABELA 4).

Com relação ao desenvolvimento das brotações, a testemunha foi a que apresentou o menor desenvolvimento das brotações. Por outro lado, os tratamentos 1, 2 e 3 foram os que conseguiram as maiores porcentagens de brotações com dois ou mais pares de folhas abertas.

Para esta espécie, é também importante o estado de desenvolvimento das brotações, nesta fase do processo. Quando foram utilizadas, na fase de multiplicação, brotações com um par de folhas abertas ou sem folhas abertas, essas brotações não se adaptaram aos meios dessa fase, ocorrendo uma redução do número de repetições por morte das brotações, impossibilitando sua análise estatística.

A hipótese levantada para o *Eucalyptus citriodora*, de que as brotações pouco desenvolvidas, quando sub-cultivadas aos meios de multiplicação que contêm maiores concentrações de BAP, sejam tóxicos para essas brotações, é também válida para esta espécie.

TABELA 4. EFEITOS DE NÍVEIS DE BAP E AIA, NA INDUÇÃO DAS BROTAÇÕES DE *E. tereticornis*, APÓS 21 DIAS DE CULTURA.

|    | TRATAMENTOS   |      | Nº<br>REP. | BROT.IND.<br>(%) | DESENVOLVIMENTO |              |              |               |
|----|---------------|------|------------|------------------|-----------------|--------------|--------------|---------------|
|    | BAP<br>-mg/l- | AIA  |            |                  | F F<br>(%)      | 1 PFA<br>(%) | 2 PFA<br>(%) | +3 PFA<br>(%) |
| 1. | 0,1           | 0,01 | 49         | 85,7 ab          | 2,4             | 7,2          | 30,9         | 59,5          |
| 2. | 0,1           | 0,1  | 57         | 78,9 b           | 2,2             | 6,7          | 17,7         | 73,2          |
| 3. | 0,25          | 0,01 | 53         | 92,4 a           | 2,0             | 8,1          | 32,6         | 57,1          |
| 4. | 0,25          | 0,1  | 59         | 88,1 ab          | 11,5            | 17,3         | 21,5         | 50,0          |
| 5. | testemunha    |      | 59         | 84,7 ab          | 36,0            | 38,0         | 18,0         | 8,0           |

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste do Qui-quadrado (P > 0,05).

Nº REP. - Número de Repetições

BROT.IND. - Brotações Induzidas

F F - Brotações com Folhas Fechadas

1 PFA - Brotações com um Par de Folhas Abertas

2 PFA - Brotações com dois Pares de Folhas Abertas

+3 PFA - Brotações com três ou mais Pares de Folhas Abertas

### 4.3 MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES

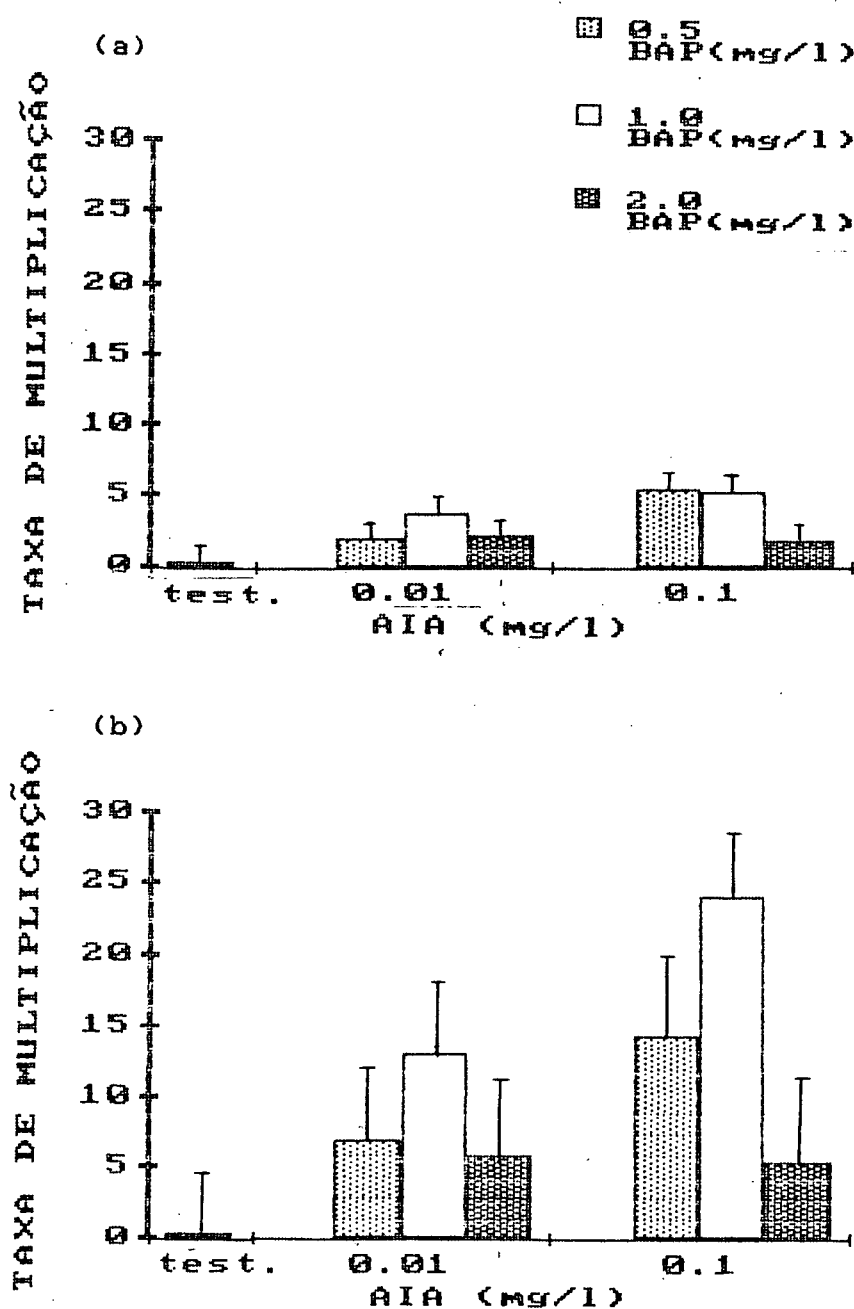
#### 4.3.1 *Eucalyptus citriodora*

Como pode-se observar nos gráficos das FIGURAS 2a e 2b, aos 30 e 60 dias de cultura respectivamente, existe uma tendência de melhor multiplicação nas concentrações de BAP a 1,0 mg/l e AIA a 0,1 mg/l. Por outro lado, quando foi aumentada a concentração de BAP para 2,0 mg/l, nas diferentes concentrações de AIA, houve uma diminuição da taxa de multiplicação das brotações. Isso possivelmente devido a que o BAP nessa e em concentrações mais altas seja tóxico para esta espécie, provocando uma baixa taxa de multiplicação.

Com relação à altura das brotações, todos os tratamentos, com exceção da testemunha, aos 30 dias de cultura, apresentaram em torno de 35 % a 40 % das brotações com altura superior a 1 cm (TABELA 5a). Aos 60 dias de cultura, os tratamentos com as menores concentrações de BAP (0,5 mg/l e 1,0 mg/l), apresentaram em torno de 37 % a 70 % das brotações com altura superior a 1 cm (TABELA 5b). Ainda na FIGURA 3, observa-se as brotações multiplicadas e a altura conseguida com essas brotações. A altura foi adequada para subcultivar as brotações no meio de enraizamento, não sendo, portanto necessária a fase de alongação.

Em comparação com os resultados obtidos por outros trabalhos, SITA<sup>34</sup>, obteve uma multiplicação de 100 brotações/explante em 4 meses, enquanto que neste trabalho pela taxa de multiplicação obtida, é possível obter 580,81 brotações/explante nesse mesmo período de tempo. Por outro lado,

FIGURA 2. EFEITOS DE NÍVEIS DE BAP E AIA, NA MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES DE *E. citriodora*, APÓS 30 DIAS DE CULTURA (GRÁFICO a) E 60 DIAS DE CULTURA (GRÁFICO b).



As linhas verticais representam o intervalo de confiança a 5 % de probabilidade

TABELA 5. EFEITOS DE NÍVEIS DE BAP E AIA NA ALTURA DAS BROTAÇÕES MULTIPLICADAS DE *E. citriodora*, APÓS 30 DIAS DE CULTURA (TABELA a) E 60 DIAS DE CULTURA (TABELA b).

(a)

|    | TRATAMENTOS   |      | Nº<br>REP. | ALTURA DAS BROTAÇÕES (%) |      |      |
|----|---------------|------|------------|--------------------------|------|------|
|    | BAP<br>-mg/l- | AIA  |            | 1                        | 2    | 3    |
| 1. | 0,5           | 0,01 | 20         | 65,8                     | 21,9 | 12,2 |
| 2. | 0,5           | 0,1  | 17         | 60,6                     | 30,8 | 8,5  |
| 3. | 1,0           | 0,01 | 18         | 61,2                     | 34,3 | 4,5  |
| 4. | 1,0           | 0,1  | 19         | 66,7                     | 24,2 | 9,1  |
| 5. | 2,0           | 0,01 | 15         | 66,7                     | 30,2 | 3,0  |
| 6. | 2,0           | 0,1  | 18         | 65,6                     | 31,2 | 3,1  |
| 7. | testemunha    |      | 17         | 100,0                    | 0    | 0    |

(b)

|    | TRATAMENTOS  |      | Nº<br>REP. | ALTURA DAS BROTAÇÕES (%) |      |      |
|----|--------------|------|------------|--------------------------|------|------|
|    | BAP<br>-mg/l | AIA  |            | 1                        | 2    | 3    |
| 1. | 0,5          | 0,01 | 12         | 47,0                     | 47,0 | 6,0  |
| 2. | 0,5          | 0,1  | 10         | 29,9                     | 53,5 | 16,7 |
| 3. | 1,0          | 0,01 | 12         | 59,2                     | 35,0 | 5,7  |
| 4. | 1,0          | 0,1  | 15         | 62,4                     | 34,5 | 3,1  |
| 5. | 2,0          | 0,01 | 11         | 69,2                     | 26,1 | 4,6  |
| 6. | 2,0          | 0,1  | 9          | 73,5                     | 26,5 | 0    |
| 7. | testemunha   |      | 17         | 100,0                    | 0    | 0    |

Nº REP. - Número de Repetições

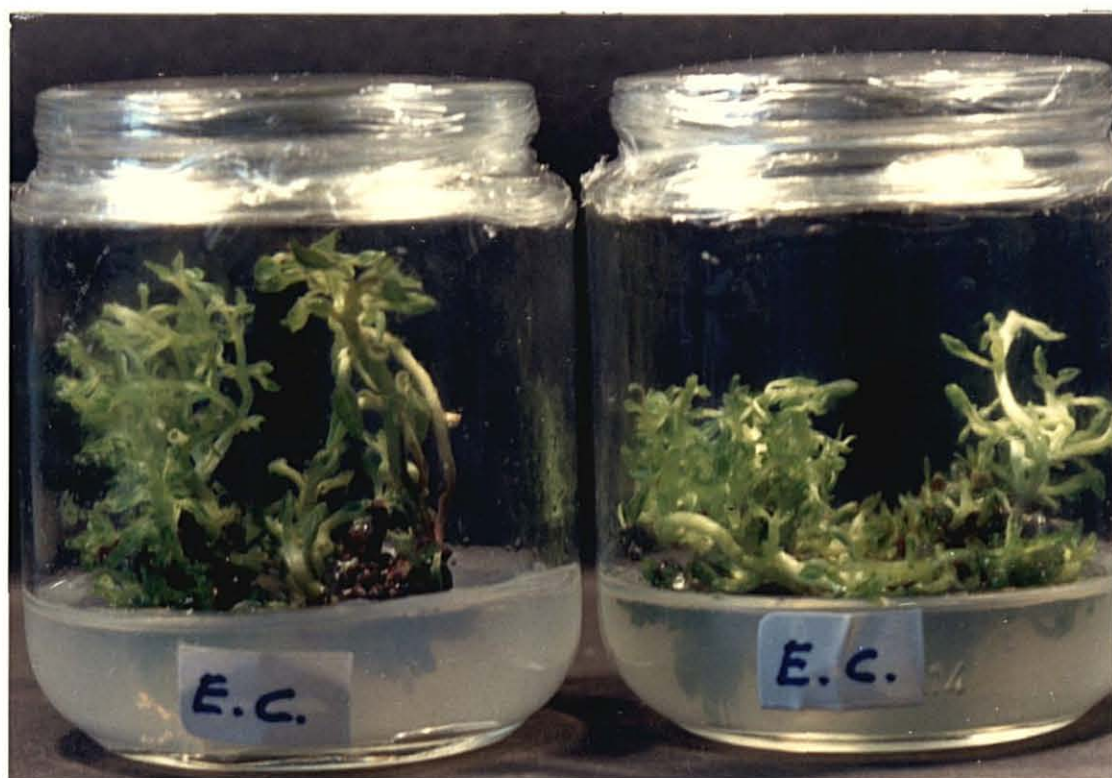
Critérios:

1 = < 1 cm

2 = 1 cm - 2 cm

3 = > 2

FIGURA 3. PROCESSO DE MULTIPLICAÇÃO DAS BROTACÇÕES DE *E. citriodora*.



GREWAL et. al.<sup>17</sup> obtiveram 150 brotações/explante, mas não relataram o tempo de cultivo.

#### 4.3.2 *Eucalyptus tereticornis*

Para esta espécie, foram realizados estudos, na tentativa de aumentar a taxa de multiplicação das brotações.

No primeiro experimento, após 60 dias de cultura, a maior taxa de multiplicação, foi em média 2,62 brotações/explante. Nesse experimento observou-se, que aos 30 dias de cultura, não existia uma tendência definida das melhores concentrações de reguladores de crescimento (FIGURA 4a). Já aos 60 dias de cultura, as melhores taxas de multiplicação, foram obtidas nas concentrações de BAP a 0,5 mg/l nas diferentes combinações com AIA (FIGURA 4b).

Pelas TABELAS 6a e 6b, observou-se que, tanto aos 30 como aos 60 dias de cultura respectivamente, todos os tratamentos apresentaram uma alta porcentagem de brotações com altura inferior a 1 cm. Devido ao pouco crescimento em altura das brotações, não é recomendado a utilização dessas brotações, para enraizamento, pelo que seria necessário, inocular as brotações primeiramente em um meio de cultura para alongação e posteriormente transferi-las para enraizamento.

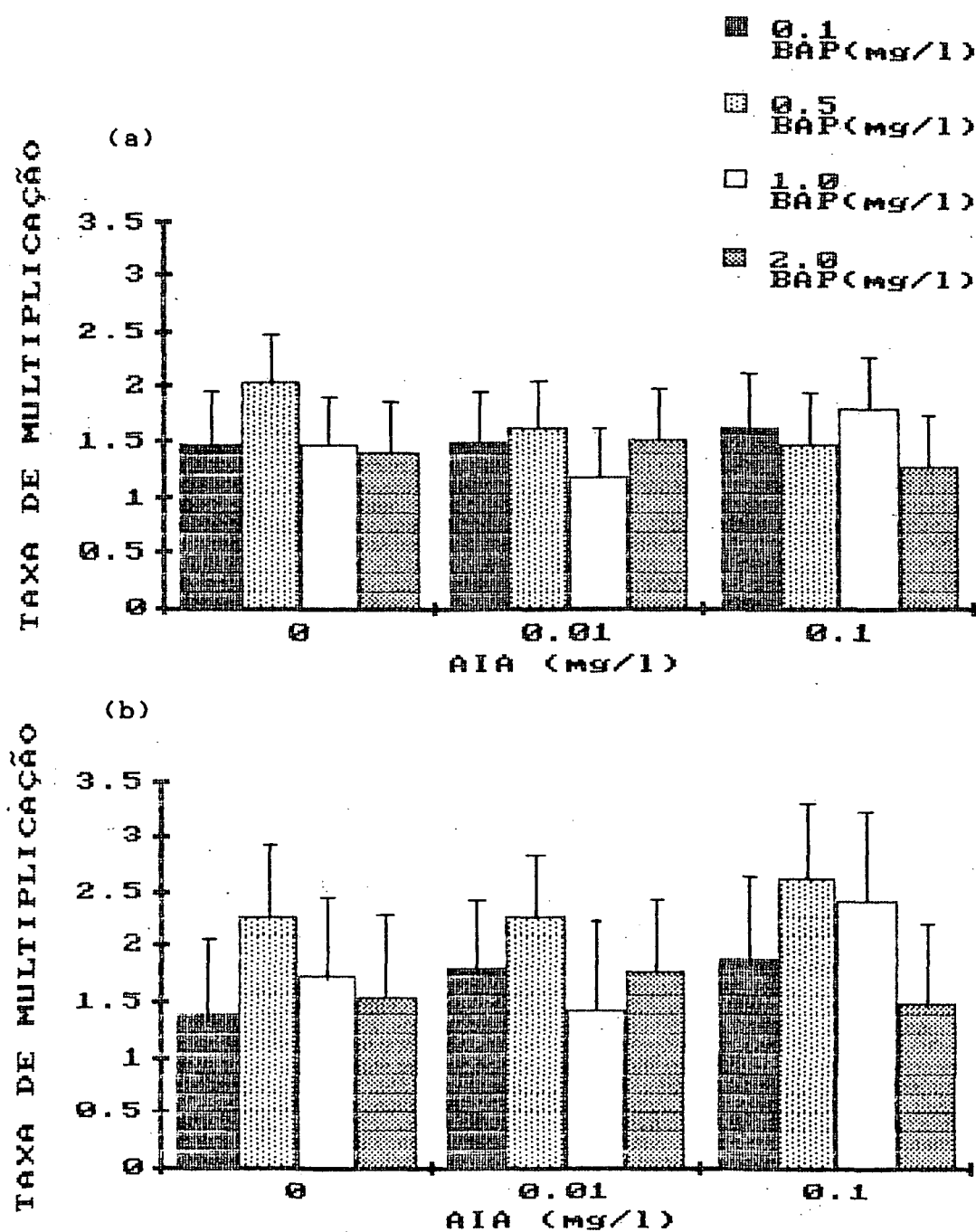
Por outro lado, no segundo experimento, pelos gráficos das FIGURAS 5a e 5b, observou-se que ocorreu o mesmo que no primeiro experimento, as maiores taxas de multiplicação foram obtidas nas concentrações de BAP a 0,5 mg/l, nas diferentes combinações com ANA. Esse fato de BAP a 0,5 mg/l, ser

o fator mais importante que influi na obtenção das maiores taxas de multiplicação, foi confirmado pela testemunha, que na sua composição continha BAP a 0,5 mg/l, a qual também, apresentou um taxa de multiplicação entre as maiores obtidas.

Como testemunha do segundo experimento, foi utilizado, o tratamento que apresentou a maior taxa de multiplicação no primeiro experimento. A média da taxa de multiplicação desse tratamento no primeiro experimento foi de 2,62 brotações/explante e, quando foi utilizado como testemunha no segundo experimento, a média da taxa de multiplicação aumentou para 5,0 brotações/explante. Esse aumento da taxa de multiplicação, da testemunha é inexplicável, já que as condições de incubação e os constituintes dos meios de cultura foram os mesmos.

Pela análise das TABELAS 7a e 7b, observou-se que tanto aos 30 como aos 60 dias de cultura respectivamente, as brotações apresentaram pouco crescimento em altura. Ainda, pelas FIGURAS 3 e 6, observou-se que a altura das brotações multiplicadas de *Eucalyptus tereticornis* foi inferior ao do *Eucalyptus citriodora*, por essa razão, é recomendável que as brotações multiplicadas de *Eucalyptus tereticornis*, primeiramente sejam sub-cultivadas para um meio de elongação, para posteriormente induzir o enraizamento

FIGURA 4. EFEITOS DE NÍVEIS DE BAP E AIA, NA MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES DE *E. tereticornis*, APÓS 30 DIAS DE CULTURA (GRÁFICO a) E 60 DIAS DE CULTURA (GRÁFICO b).



As linhas verticais representam o intervalo de confiança a 5% de probabilidade

TABELA 6. EFEITOS DE NÍVEIS DE BAP E AIA NA ALTURA DAS BROTAÇÕES MULTIPLICADAS DE *E. tereticornis*, APÓS 30 DIAS DE CULTURA (TABELA a) E 60 DIAS DE CULTURA (TABELA b).

(a)

|     | TRATAMENTOS   |      | Nº<br>REP. | ALTURA DAS BROTAÇÕES (%) |      |     |
|-----|---------------|------|------------|--------------------------|------|-----|
|     | BAP<br>-mg/l- | AIA  |            | 1                        | 2    | 3   |
| 1.  | 0,1           | 0    | 15         | 90,9                     | 9,1  | 0   |
| 2.  | 0,1           | 0,01 | 16         | 83,3                     | 16,7 | 0   |
| 3.  | 0,1           | 0,1  | 14         | 82,6                     | 13,0 | 4,3 |
| 4.  | 0,5           | 0    | 18         | 75,7                     | 24,3 | 0   |
| 5.  | 0,5           | 0,01 | 19         | 74,2                     | 22,6 | 3,2 |
| 6.  | 0,5           | 0,1  | 15         | 77,3                     | 22,7 | 0   |
| 7.  | 1,0           | 0    | 17         | 84,0                     | 16,0 | 0   |
| 8.  | 1,0           | 0,01 | 16         | 78,9                     | 21,1 | 0   |
| 9.  | 1,0           | 0,1  | 15         | 77,8                     | 18,5 | 3,7 |
| 10. | 2,0           | 0    | 15         | 85,7                     | 14,3 | 0   |
| 11. | 2,0           | 0,01 | 15         | 91,3                     | 4,3  | 4,3 |
| 12. | 2,0           | 0,1  | 14         | 88,9                     | 5,6  | 5,6 |

(b)

|     | TRATAMENTOS   |      | Nº<br>REP. | ALTURA DAS BROTAÇÕES (%) |      |     |
|-----|---------------|------|------------|--------------------------|------|-----|
|     | BAP<br>-mg/l- | AIA  |            | 1                        | 2    | 3   |
| 1.  | 0,1           | 0    | 13         | 94,4                     | 5,6  | 0   |
| 2.  | 0,1           | 0,01 | 15         | 96,3                     | 3,7  | 0   |
| 3.  | 0,1           | 0,1  | 11         | 85,7                     | 14,3 | 0   |
| 4.  | 0,5           | 0    | 14         | 68,8                     | 31,2 | 0   |
| 5.  | 0,5           | 0,01 | 18         | 68,3                     | 29,3 | 2,4 |
| 6.  | 0,5           | 0,1  | 13         | 82,4                     | 17,6 | 0   |
| 7.  | 1,0           | 0    | 12         | 85,7                     | 14,3 | 0   |
| 8.  | 1,0           | 0,01 | 9          | 92,3                     | 7,7  | 0   |
| 9.  | 1,0           | 0,1  | 9          | 77,3                     | 18,2 | 4,5 |
| 10. | 2,0           | 0    | 11         | 94,1                     | 5,9  | 0   |
| 11. | 2,0           | 0,01 | 14         | 92,0                     | 8,0  | 0   |
| 12. | 2,0           | 0,1  | 12         | 94,4                     | 5,6  | 0   |

Nº REP. - Número de Repetições

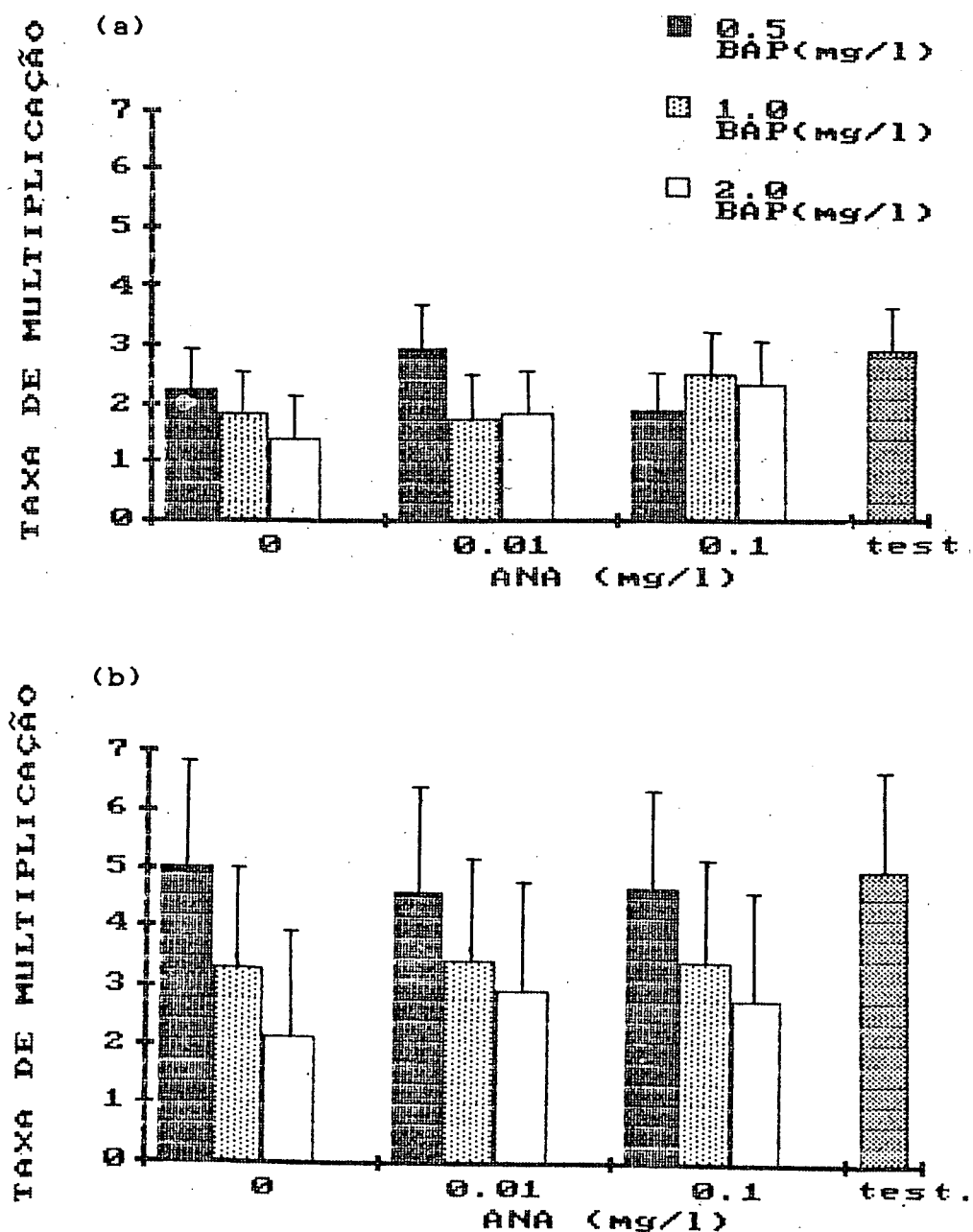
Criterios:

1 = &lt; 1 cm

2 = 1 cm - 2 cm

3 = &gt; 2 cm

FIGURA 5. EFEITOS DE NÍVEIS DE BAP E ANA, NA MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES DE *E. tereticornis*, APÓS 30 DIAS DE CULTURA (GRÁFICO a) E 60 DIAS DE CULTURA (GRÁFICO b).



As linhas verticais representam o intervalo de confiança a 5 % de probabilidade

TABELA 7. EFEITOS DE NÍVEIS DE BAP E ANA NA ALTURA DAS BROTAÇÕES MULTIPLICADAS DE *E. tereticornis*, APÓS 30 DIAS DE CULTURA (TABELA a) E 60 DIAS DE CULTURA (TABELA b).

(a)

|     | TRATAMENTOS   |      | Nº<br>REP. | ALTURA DAS BROTAÇÕES (%) |      |     |
|-----|---------------|------|------------|--------------------------|------|-----|
|     | BAP<br>-mg/l- | ANA  |            | 1                        | 2    | 3   |
| 1.  | 0,5           | 0    | 26         | 79,3                     | 20,7 | 0   |
| 2.  | 0,5           | 0,01 | 21         | 79,0                     | 19,4 | 1,6 |
| 3.  | 0,5           | 0,1  | 27         | 80,4                     | 19,6 | 0   |
| 4.  | 1,0           | 0    | 25         | 76,1                     | 21,7 | 2,2 |
| 5.  | 1,0           | 0,01 | 23         | 72,5                     | 22,5 | 5,0 |
| 6.  | 1,0           | 0,1  | 26         | 83,1                     | 15,4 | 1,5 |
| 7.  | 2,0           | 0    | 22         | 74,2                     | 22,6 | 3,2 |
| 8.  | 2,0           | 0,01 | 25         | 71,7                     | 28,3 | 0   |
| 9.  | 2,0           | 0,1  | 22         | 74,5                     | 25,5 | 0   |
| 10. | testemunha    |      | 25         | 82,2                     | 11,0 | 6,8 |

(b)

|     | TRATAMENTOS   |      | Nº<br>REP. | ALTURA DAS BROTAÇÕES (%) |      |     |
|-----|---------------|------|------------|--------------------------|------|-----|
|     | BAP<br>-mg/l- | ANA  |            | 1                        | 2    | 3   |
| 1.  | 0,5           | 0    | 19         | 83,3                     | 16,6 | 0   |
| 2.  | 0,5           | 0,01 | 19         | 80,6                     | 15,9 | 3,4 |
| 3.  | 0,5           | 0,1  | 22         | 76,9                     | 22,1 | 1,0 |
| 4.  | 1,0           | 0    | 21         | 81,4                     | 17,1 | 1,4 |
| 5.  | 1,0           | 0,01 | 20         | 73,9                     | 23,2 | 2,9 |
| 6.  | 1,0           | 0,1  | 20         | 75,4                     | 20,3 | 1,4 |
| 7.  | 2,0           | 0    | 19         | 75,6                     | 22,0 | 2,4 |
| 8.  | 2,0           | 0,01 | 18         | 77,4                     | 22,6 | 0   |
| 9.  | 2,0           | 0,1  | 17         | 75,0                     | 25,0 | 0   |
| 10. | testemunha    |      | 21         | 83,0                     | 12,3 | 4,7 |

Nº REP. - Número de Repetições

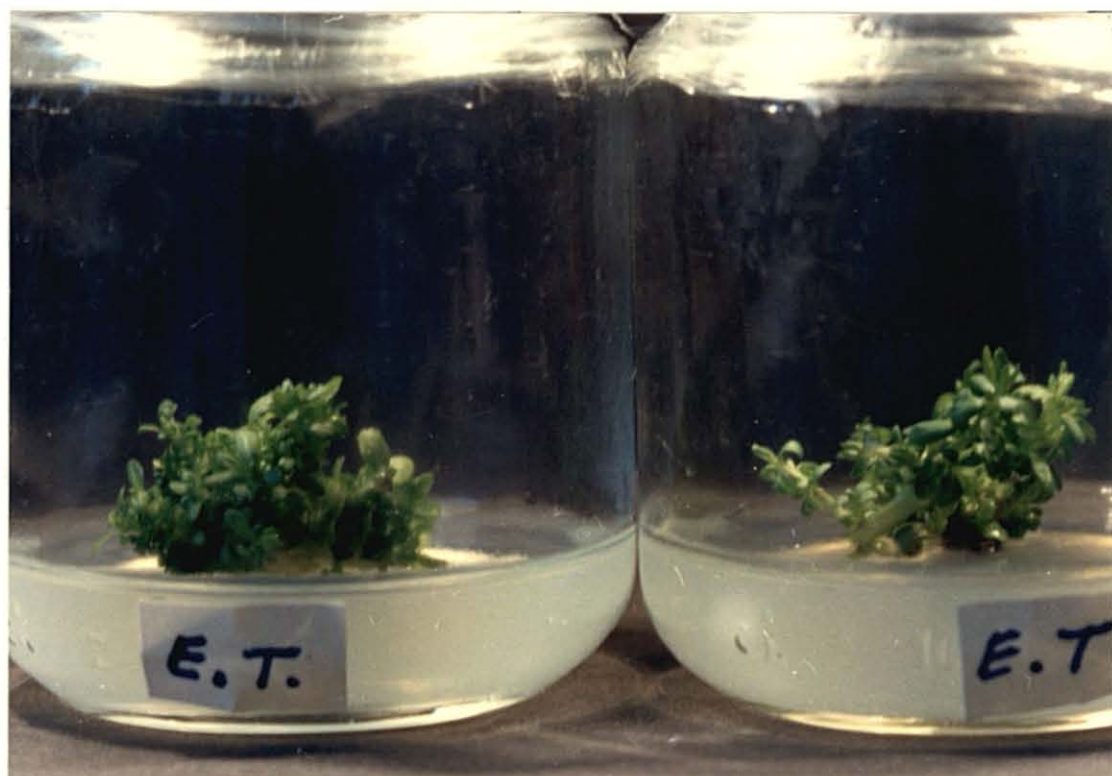
Critérios:

1 = &lt; 1 cm

2 = 1 cm - 2 cm

3 = &gt; 2 cm

FIGURA 6. PROCESSO DE MULTIPLICAÇÃO DAS BROTAÇÕES DE *E. tetricornis*.



#### 4.4 ELONGAÇÃO DAS BROTAÇÕES

Este experimento foi realizado com brotações de *Eucalyptus tereticornis*, provenientes da fase de multiplicação.

A combinação das maiores concentrações de GA<sub>3</sub> e CA, resultaram nos menores incrementos no crescimento em altura das brotações. Por outro lado, quando foram testados GA<sub>3</sub> e CA individualmente, o incremento em altura foi maior do que quando combinados, e ainda, entre os tratamentos em que foram testados GA<sub>3</sub> e CA individualmente, o GA<sub>3</sub> a 0,1 mg/l, apresentou o maior incremento em altura (FIGURA 7).

Por outro lado, nas FIGURAS 8, e 9, pode-se observar o aspecto das brotações, que foram avaliados em forma descritiva:

(1) A testemunha, que não continha na sua composição nem GA<sub>3</sub> nem CA, apresentou suas brotações com bom aspecto; com coloração verde a verde claro, havendo a presença de exsudação nas folhas em 50 % das repetições.

(2) Nos tratamentos que foram testados CA a 0,5 % e 1,0 %, observou-se em 75 % das repetições, uma deterioração e morte em algumas das várias brotações inoculadas por cada repetição. Foi também observado, em 35 % a 45 % das repetições, a presença de exsudação nas folhas.

(3) Os tratamentos com GA<sub>3</sub>, apresentaram suas brotações alongadas, mas com aspecto de estioladas e com coloração verde bastante claro. Foi também observado, princípio e morte total das brotações em todas as repetições, acentuando-se

mais, na concentração de 1,0 mg/l do GA<sub>3</sub>. Ainda, observou-se oxidação na base das brotações e exsudação nas folhas.

(4) Quando maior foram as concentrações da combinação do GA<sub>3</sub> e CA, maior foi a porcentagem de repetições com brotações deterioradas e mortas. Nas concentrações do GA<sub>3</sub> a 0,1 mg/l e CA a 0,5 %, foi observado em 86 % das repetições, brotações deterioradas e mortas e quando as concentrações do GA<sub>3</sub> e CA foram aumentadas para 1,0 mg/l e 1,0 % respectivamente, observou-se em 100 % das repetições, brotações deterioradas e mortas. Por outro lado, também foi observado a presença de oxidação na base das brotações e exsudação nas folhas.

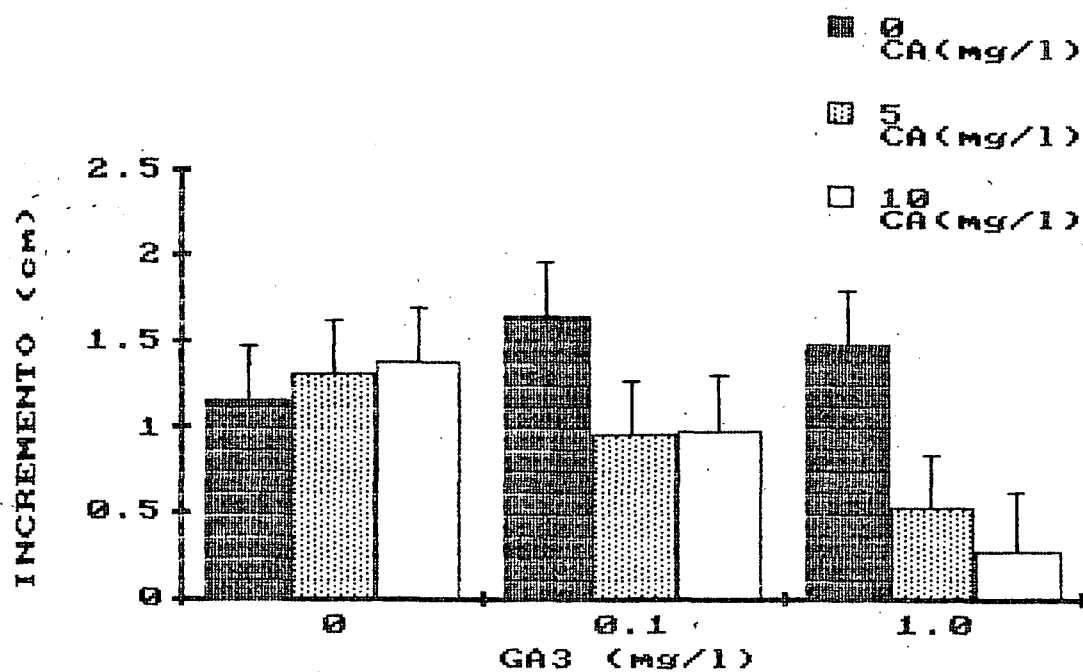
O baixo incremento em altura e o aumento da deterioração e morte das brotações, quando foram inoculadas nos meios constituídos, da combinação das maiores concentrações de GA<sub>3</sub> e CA utilizadas, foi devido possivelmente a que essas substâncias nessas concentrações e em mais altas sejam tóxicas para as brotações.

A altura e vigor das brotações é importante para poder sub-cultivar essas brotações para um meio de enraizamento. Embora as brotações de *Eucalyptus tereticornis*, tenham conseguido alongar, quando inoculadas em meio com GA<sub>3</sub> a 0,1 mg/l, não é recomendável o uso dessa substância, devido ao aspecto que apresentaram as brotações.

Por outro lado, considerando principalmente o aspecto das brotações, a testemunha apesar de não ter apresentado o melhor incremento em altura, foi a que apresentou suas brotações com melhor aspecto em relação aos outros, consideran-

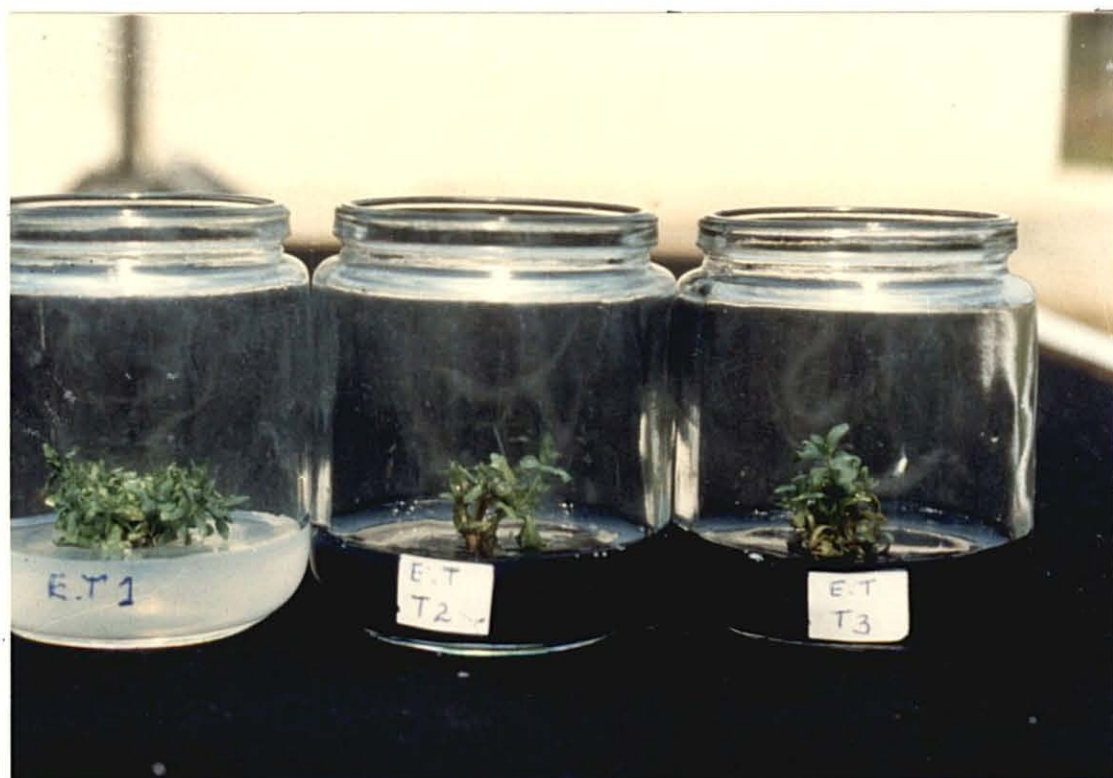
do-se o meio mais adequado para elongação.

FIGURA 7. EFEITOS DE NÍVEIS DO ÁCIDO GIBERÉLICO E CARVÃO ATIVADO, NA ELONGAÇÃO DAS BROTAÇÕES DE *E. teretis*.



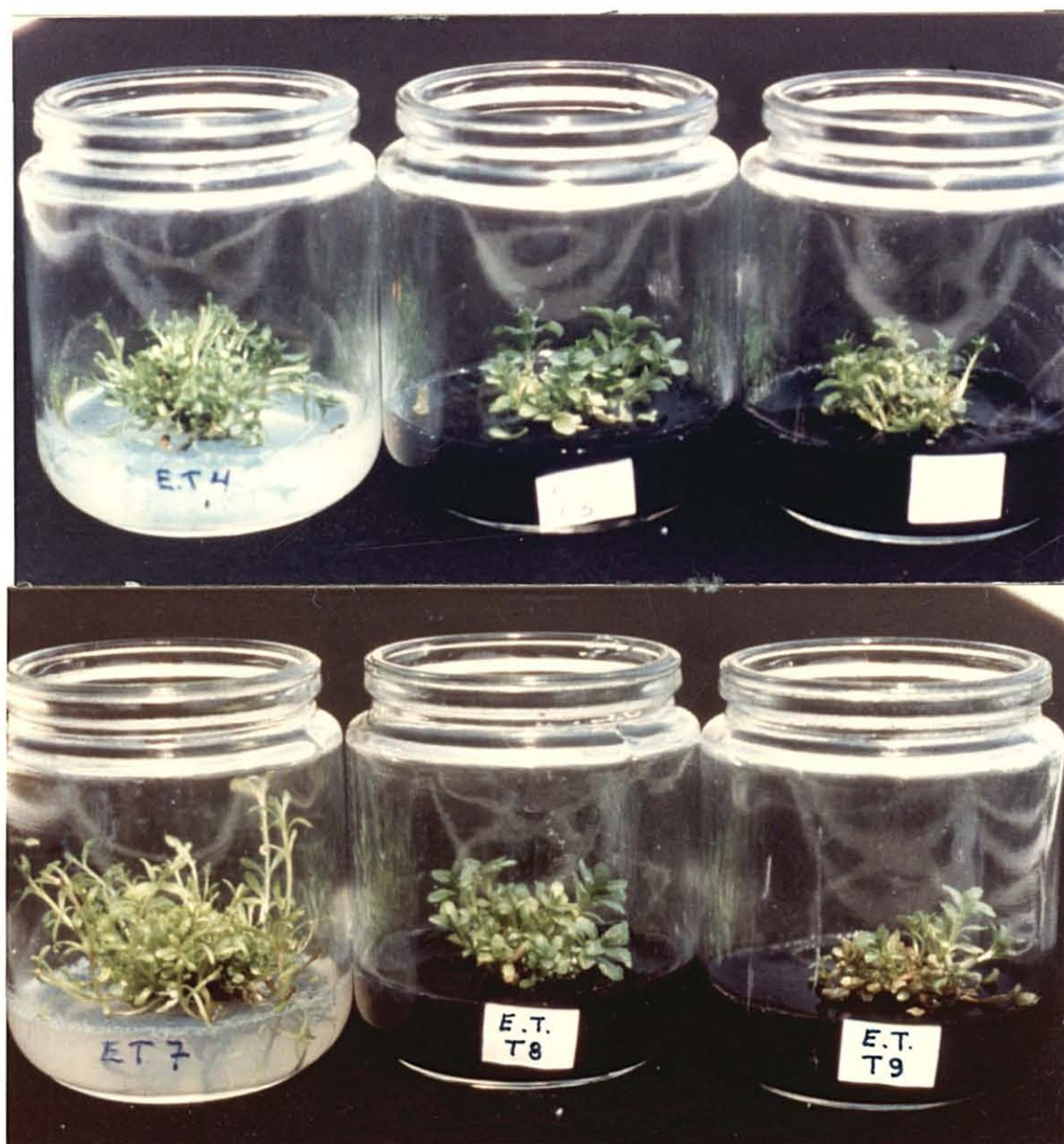
As linhas verticais representam o intervalo de confiança a 5 % de probabilidade

FIGURA 8. ASPECTO DAS BROTAÇÕES ELONGADAS DE *E. tereticornis*, NA AUSÊNCIA DO CARVÃO ATIVADO E ÁCIDO GIBERÉLICO E NA PRESENÇA DO CARVÃO ATIVADO.



T<sub>1</sub> - Ausência de CA e GA<sub>3</sub>  
T<sub>2</sub> - CA 0,5 %  
T<sub>3</sub> - CA 1,0 %

FIGURA 9. EFEITOS DE NÍVEIS DE CARVÃO ATIVADO E ÁCIDO GIBERÉLICO, NO ASPECTO DAS BROTAÇÕES DE *E. tereticornis*.



- T<sub>4</sub> - GA<sub>3</sub> 0,1 mg/l  
 T<sub>5</sub> - GA<sub>3</sub> 0,1 mg/l e CA 0,5 %  
 T<sub>6</sub> - GA<sub>3</sub> 0,1 mg/l e CA 1,0 %  
 T<sub>7</sub> - GA<sub>3</sub> 1,0 mg/l  
 T<sub>8</sub> - GA<sub>3</sub> 1,0 mg/l e CA 0,5 %  
 T<sub>9</sub> - GA<sub>3</sub> 1,0 mg/l e CA 1,0 %

## 4.5 ENRAIZAMENTO

### 4.5.1 *Eucalyptus citriodora*

Pelos resultados da TABELA 8, observou-se na terceira avaliação que, embora os tratamentos com AIB a 0,5 mg/l e 1,0 mg/l e ANA a 0,5 mg/l, não diferem estatisticamente, o tratamento de AIB a 0,5 mg/l foi que apresentou a maior porcentagem de enraizamento.

Com relação ao número de raízes, o tratamento com 0,5 mg/l de AIB foi também que apresentou o maior número de raízes (FIGURAS 10 e 11).

Pelos resultados observados, esta espécie, não enraíza na ausência de reguladores de crescimento.

O enraizamento desta espécie ocorreu com uma baixa concentração de auxinas (0,5 mg/l de AIB), que aos 7 dias de cultura apresentou 70 % de enraizamento, ocorrendo um aumento considerável aos 14 dias de cultura para 86,7 % de brotações enraizadas e não ocorrendo nenhum aumento na porcentagem de enraizamento aos 21 dias de cultura.

### 4.5.2 *Eucalyptus tereticornis*

A concentração de 0,5 mg/l de ANA foi a que apresentou 100 % de enraizamento, seguido pelo tratamento de ANA a 1,0 mg/l, com 93,3 % de enraizamento, sem que houvesse diferença estatística entre esses dois tratamentos (TABELA 9).

Com relação ao número de raízes, o tratamento com 1,0 mg/l de AIB foi que apresentou o maior número de raízes (FIGURA 12).

Esta espécie, conseguiu enraizar na ausência de reguladores de crescimento. Porém, além de apresentar a menor média de raízes por brotações, as raízes foram em geral muito pequenas e finas em relação aos outros tratamentos (FIGURA 13). Similarmente ao *Eucalyptus citriodora*, para esta espécie, uma baixa concentração de auxinas (0,5 mg/l de ANA), foi suficiente para o enraizamento, que a partir da segunda avaliação (14 dias de cultura), foi possível observar a presença de raízes em 83,3 % das brotações, atingindo 100 % de enraizamento aos 21 dias de cultura.

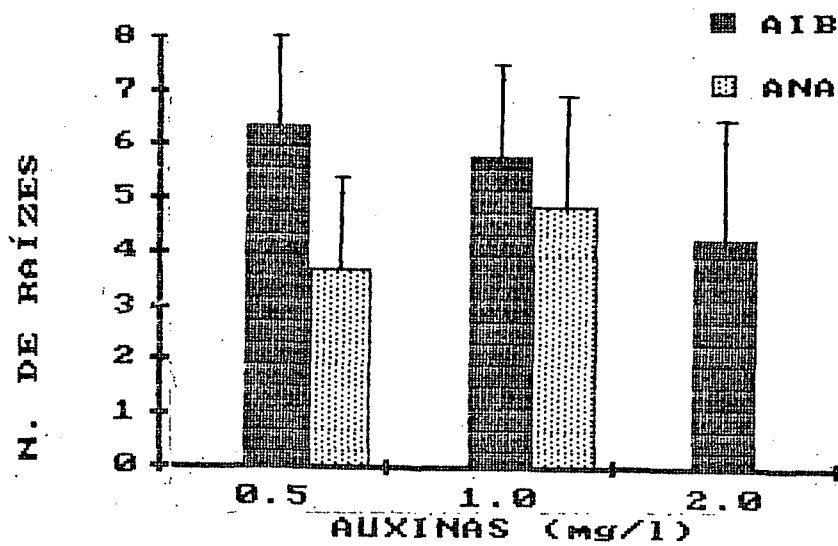
TABELA 8. EFEITOS DE NÍVEIS DE AIB E ANA, NO ENRAIZAMENTO DE *E. citriodora*, APÓS 7, 14 E 21 DIAS DE CULTURA.

|    | TRATAMENTOS |     | 1ª AVALIAÇÃO |     | 2ª AVALIAÇÃO |     | 3ª AVALIAÇÃO |     |
|----|-------------|-----|--------------|-----|--------------|-----|--------------|-----|
|    | (mg/l)      |     | (%)          | S   | (%)          | S   | (%)          | S   |
| 1. | AIB         | 0,5 | 70,0 a       | 8,4 | 86,7 a       | 6,2 | 86,7 a       | 6,2 |
| 2. | AIB         | 1,0 | 46,7 ab      | 9,1 | 73,3 ab      | 8,1 | 80,0 ab      | 7,3 |
| 3. | AIB         | 2,0 | 26,7 c       | 8,1 | 50,0 c       | 9,1 | 50,0 c       | 9,1 |
| 4. | ANA         | 0,5 | 70,0 a       | 8,4 | 76,7 a       | 7,7 | 80,0 ab      | 7,3 |
| 5. | ANA         | 1,0 | 36,7 bc      | 8,8 | 53,3 bc      | 9,1 | 56,7 bc      | 9,0 |
| 6. | testemunha  |     | 0            | 0   | 0            | 0   | 0            | 0   |

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste do Qui-quadrado (P > 0,05)

S - Desvio-padrão

FIGURA 10. EFEITOS DE NÍVEIS DE AIB E ANA, NO NÚMERO DE RAÍZES DE *E. citriodora*.



As linhas verticais representam o intervalo de confiança a 5 % de probabilidade

FIGURA 11. PROCESSO DE ENRAIZAMENTO DE *E. citriodora*.

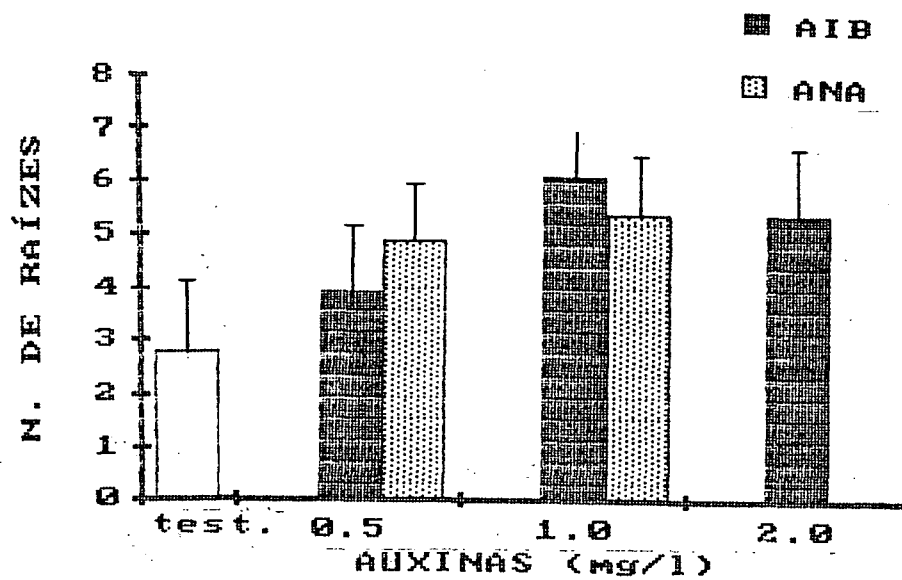


TABELA 9. EFEITOS DE NÍVEIS DE AIB E ANA, NO ENRAIZAMENTO DE *E. tereticornis*, APÓS 7, 14 E 21 DIAS DE CULTURA.

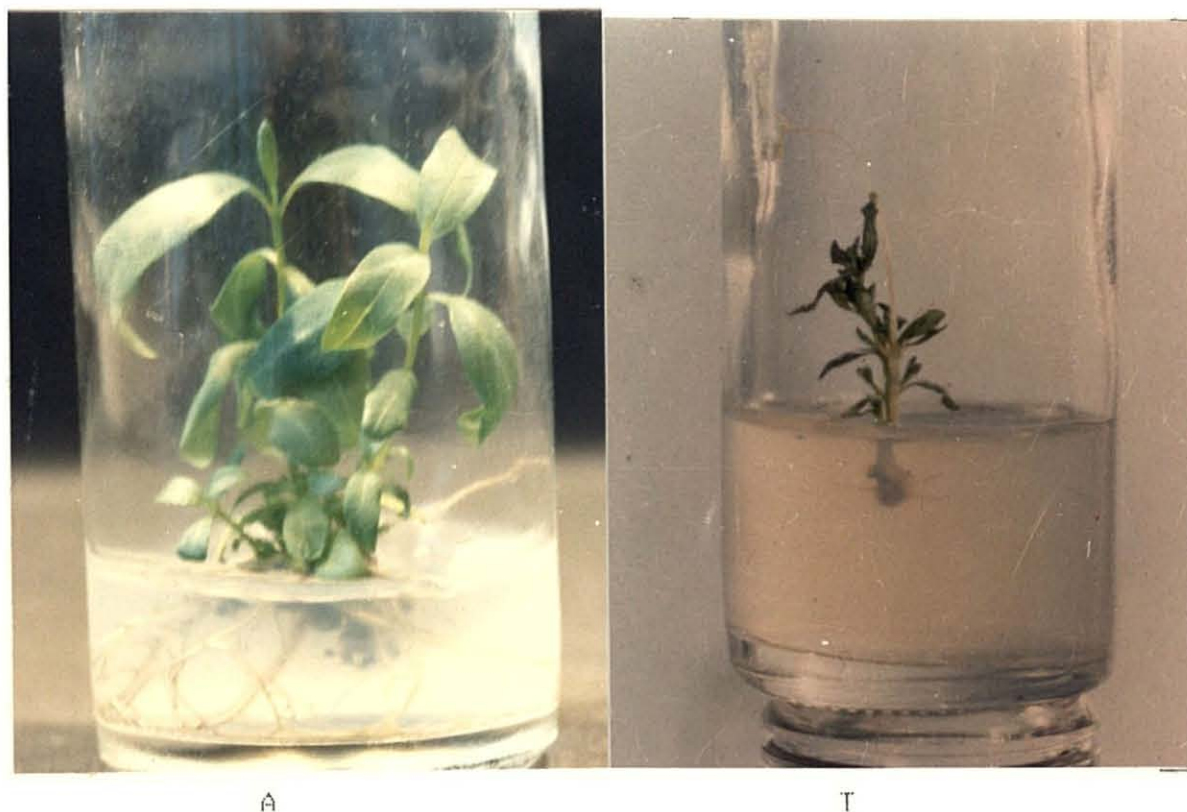
|    | TRATAMENTOS |     | 1ª AVALIAÇÃO |     | 2ª AVALIAÇÃO |     | 3ª AVALIAÇÃO |     |
|----|-------------|-----|--------------|-----|--------------|-----|--------------|-----|
|    | (mg/l)      |     | (%)          | S   | (%)          | S   | (%)          | S   |
| 1. | AIB         | 0,5 | 0            | 0   | 56,7 c       | 9,0 | 80,0 bc      | 7,3 |
| 2. | AIB         | 1,0 | 0            | 0   | 46,7 c       | 9,1 | 83,3 bc      | 6,8 |
| 3. | AIB         | 2,0 | 0            | 0   | 50,0 c       | 9,1 | 73,3 c       | 8,1 |
| 4. | ANA         | 0,5 | 0            | 0   | 83,3 ab      | 6,8 | 100,0 a      | 0   |
| 5. | ANA         | 1,0 | 3,3          | 3,3 | 86,7 a       | 6,2 | 93,3 ab      | 4,6 |
| 6. | testemunha  |     | 0            | 0   | 63,3 bc      | 8,8 | 66,7 c       | 8,6 |

Valores seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste exato de Fisher ( $P > 0,05$ )

S - Desvio-padrão

FIGURA 12. EFEITOS DE NÍVEIS DE AIB E ANA, NO NÚMERO DE RAÍZES DE *E. tereticornis*.

As linhas verticais representam o intervalo de confiança a 5 % de probabilidade

FIGURA 13. PROCESSO DE ENRAIZAMENTO DE *E. tereticornis*.

A

T

A - Meio com Auxinas

T - Testemunha (meio sem auxinas)

#### 4 CONCLUSÕES

1. Foi conseguida a propagação "in vitro" de plantas jovens de *E. citriodora* e *E. tereticornis*, por meio de segmentos nodais, com uma taxa média de multiplicação de 24,1 brotações/explante e 5,0 brotações/explante aos 60 dias, e com uma porcentagem de enraizamento de 86,7 % e 100 % respectivamente.

2. O melhor tratamento para a desinfestação dos explantes de *E. citriodora* e *E. tereticornis*, foi o hipoclorito de sódio a 0,5 % por 10 minutos.

3. As concentrações de BAP a 0,25 mg/l e AIA a 0,1 mg/l, foram as melhores na indução e desenvolvimento das brotações de *E. citriodora*. Para *E. tereticornis*, o meio mais indicado para a indução e desenvolvimento das brotações, foi com BAP a 0,25 mg/l e AIA a 0,01 mg/l.

4. Na multiplicação de *E. citriodora*, BAP a 1,0 mg/l e AIA a 0,1 mg/l, foram as melhores concentrações. Para *E. tereticornis*, o BAP a 0,5 mg/l, foi o regulador de crescimento mais importante, na multiplicação das brotações.

5. A passagem das brotações de *E. tereticornis*, do meio de multiplicação para um meio de concentração reduzida de BAP (0,1 mg/l) e ANA (0,1 mg/l), foi a técnica mais indicada para a elongação dessas brotações; apresentando um melhor aspecto em relação aos tratamentos constituídos de carvão ativado e ácido giberélico.

6. O *E. citriodora*, não precisou da fase de elongação, porque suas brotações apresentaram uma altura adequada ao enraizamento, quando multiplicadas.

7. A concentração de 0,5 mg/l de AIB, foi o melhor no enraizamento de *E. citriodora*. Para *E. tereticornis*, o maior número de plântulas foi obtido com ANA na concentração de 0,5 mg/l.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHUJA, A. In vitro shoot differentiation in *Eucalyptus citriodora* Hook: Effect of activated charcoal. Indian Journal of Forestry, 8 (4): 340-1, 1985.
2. ANEJA, S. & ATAL, C.K. Plantlet formation in tissue culture from lignotubers of *Eucalyptus citriodora* Hook. Current Science, 38 (3): 69, 1969.
3. BARKER, P.K.; FOSSARD, R.A.de & BOURNE, R.A. Progress toward clonal propagation of *Eucalyptus* species by tissue culture techniques. Combined proceedings. International Plant Propagators Society, 27: 546-56, 1977.
4. BENNETT, I.J. & McCOMB, J.A. Propagation of Jarrah (*Eucalyptus marginata*) by organ and tissue culture. Australian Forest Research, 12: 121-7, 1982.
5. BONGA, J.M. Applications of tissue culture in forestry. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Culture. Springer-Verlag. New York, 1977. 803p.
6. BONGA, J.M. & DURZAN, D.J. Tissue culture in forestry. Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, 1985. 420p.
7. CHÉE, R. Micropropagation: Can nurserymen afford to ignore it? Am. Nurserymen, Chicago, 159(8):89-103, 1984.
8. CRESSWELL, R.J. & FOSSARD, R.A.de Organ culture of *Eucalyptus grandis*. Australian Forestry, 37(1): 55-69, 1974.

9. FAO, Roma, Itália. El eucalipto en la repoblación forestal. Roma, 1981. 723p. (Colección FAO: Montes, 11).
10. FERREIRA, M. Escolha de espécies de eucalipto. Piracicaba, IPEF, 1979, 29p. (IPEF. Circular Técnica, 47).
11. FOSSARD, R.A.de Tissue culture of *Eucalyptus*. Australian Forestry, 37 (1): 43-54, 1974.
12. FOSSARD, R.A.de & BOURNE, R.A. Vegetative propagation of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell by nodal culture in vitro. Combined Proceedings. International Plant Propagators Society, 26: 373-8, 1976.
13. FOSSARD, R.A.de ; NITSCH, C.; CRESSWELL, R.J. & LEE, E. C.M. Tissue and organ culture of *Eucalyptus*. New Zealand Journal of Forestry Science, 4(2): 267-78, 1974.
14. FRANCKET, A. & BOULAY, M. Micropropagation of frost resistant eucalypt clones. Australian Forest Research. 13: 83-9, 1982
15. GOLFARI, L. & PINHEIRO NETO, F.A. Escolha de espécies de eucalipto potencialmente aptas para diferentes regiões de Brasil. Brasil Florestal, (3): 17-38, 1970.
16. GONÇALVES, A.N. Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla*; S.T. Blake "in vitro". Piracicaba, ESALQ, 1982. 97p. Tese Doutorado.
17. GREWAL, S.; AHUJA, A. & ATAL, C.K. In vitro proliferation of shoot apices of *Eucalyptus citriodora* Hook. Indian Journal Experimental biology, 18: 775-77, 1980.

18. GUIMARÃES, D.P. et. al. Avaliação silvicultural, dendrométrica e tecnológica de espécies de *Eucalyptus*. Planaltina, EMBRAPA - CPAC, 1983. 73p (EMBRAP - CPAC. Boletim de Pesquisa, 20).
19. GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F. & JAGANNATHAN, V. Tissue culture of forest trees-clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook, by tissue culture. Plants Science Letters, 20: 195-201, 1981.
20. HARTMANN, H.T. & KESTER, D.E. Propagación de plantas; principios y prácticas. México, continental, 1985. 814p.
21. HARTNEY, V.J. Vegetative propagation of the eucalypts. Australian Forest Research, 10: 191-211, 1980.
22. HARTNEY, V.J. Tissue culture of *Eucalyptus*. Combined Proceedings. International Plant Propagators Society, 32: 98-109, 1982.
23. HARTNEY, V.J. & BARKER, P.K. Vegetative Propagation of *Eucalyptus* by tissue culture. In: SIMPOSIO IUFRO EM MELHORAMENTO GENÉTICO E PRODUTIVIDADE DE ESPÉCIES FLORESTAIS DE RÁPIDO CRESCIMENTO, Águas de São Pedro-SP, 1980, Anais ...São Paulo Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1983. 786-7p.
24. HILLIS, W.E. & BROWN, A.G. Eucalyptus for Wood Production. Australian, CSIRO, 1978. 434p.
25. KITAHARA, H. & CALDAS, L.S. Shoot and root formation in hypocotyl callus culture of *Eucalyptus*. Forest Science, 21 (7): 242-3, 1975.

26. LEE, E.C.M. & FOSSARD, R.A. de The effects of various auxins and cytokinins on the "in vitro" culture of stem and lignotuber, tissue of *Eucalyptus bancroftii* Maiden. New Phytologist, 73: 707-17, 1974.
27. MANGIERI, H.R. & DIMITRI, M.J. Los eucaliptos en la silvicultura, Buenos Aires, ACME, 1971 226p.
28. McKEAND, S.E. & WEIR, R.J. Tissue culture and forest productivity. Journal of Forestry, 82(4):212-18, 1984.
29. MEHRA-PALTA, A. Clonal propagation of *Eucalyptus* by tissue culture. Plants Science Letters, 26(1):1-11, 1982.
30. MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15:473-97, 1962.
31. OKA, S.; YEUNG, E.C. & THORPE, T.A. Shoot formation in *Eucalyptus globulus* hypocotyl explants. New Zealand Journal of Forestry Science, 12 (3):501-9, 1982.
32. PATON, D.M.; WILLING, R.R.; NICHOLLS, W. & PRYOR, L.D. Rooting of stem cuttings of *Eucalyptus*: A rooting inhibitor in adult tissue. Australian Journal of Botany, 18:175-83, 1970.
33. PRYOR, L.D. Inheritance, selection and breeding in *Eucalyptus*. In: CONFERÊNCIA MUNDIAL DO EUCALIPTO, 2. São Paulo, 1961. Relatório e documentos. Vi 297-304p.
34. SITA, G.L. Morphogenesis and plant regeneration from cotyledonary culture of *Eucalyptus*. Plants Science Letters, 14:63-8, 1979.

35. SITA, G.L. & VAIDYANATHAN, C.S. Rapid multiplication of *Eucalyptus* by multiple shoot production. *Current Science*, 48 (8):350-2, 1979.
36. STURION, J.A.; PEREIRA, J.C.D.; ALBINO, J.C. & MORITA, M. Variação de densidade básica da madeira de doze espécies de *Eucalyptus*, plantadas em Uberaba, MG. Curitiba, EMBRAPA-CNPF, 1987. 28-38p. (EMBRAPA-CNPF. Boletim de Pesquisa Florestal, 14).
37. WHITE, P.R. A handbook of plant tissue culture. Lancaster the Jaques Cottell Press, 1943.