



WESLEY PIRES FLAUSINO MÁXIMO

**PROPAGAÇÃO DE UM HÍBRIDO COMERCIAL
DE *Eucalyptus urograndis* EM BIORREATOR DE
IMERSÃO TEMPORÁRIA (BIT[®])**

LAVRAS – MG

2014

WESLEY PIRES FLAUSINO MÁXIMO

**PROPAGAÇÃO DE UM HÍBRIDO COMERCIAL DE *Eucalyptus*
urograndis EM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA (BIT®)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luciano Vilela Paiva

Coorientadores

Dra. Evânia Galvão Mendonça

Dr. Paulo Augusto de Almeida Santos

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Máximo, Wesley Pires Flausino.

Propagação de um híbrido comercial de *Eucalyptus urograndis*
em biorreator de imersão temporária (BIT[®]) / Wesley Pires Flausino
Máximo. – Lavras : UFLA, 2014.

83 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Eucalipto. 2. Citocininas. 3. Biorreator - Sistema
automatizado. 4. Nitrogênio. 5. Propagação *in vitro*. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.97342

Ao meu avô Sebastião (*in memorian*), por ser o meu maior exemplo de
humildade e carinho.

Aos meus pais e meu irmão, por serem minha base, estrutura e força.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser minha fonte de energia, proteção e amor.

Aos meus pais, Olair e Regina, que são a razão de tudo, principalmente, pelo apoio, carinho e amor incondicional em toda minha caminhada, e ao meu irmão, Walison, pelo companheirismo e momentos de cumplicidade.

A minha namorada, Débora, por todo companheirismo, amizade, carinho e apoio dado em todos os momentos, principalmente nos mais árduos. Muito obrigado.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade.

A Capes pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Luciano Vilela Paiva, pelo exemplo de profissionalismo, pelos conselhos e por todo apoio e confiança no meu trabalho.

Ao meu grande amigo Breno Régis Santos, por ter me introduzido na pesquisa científica, ter acreditado no meu potencial e apoiado minhas escolhas. Muito obrigado.

Ao meu coorientador e grande amigo Paulo, por toda ajuda, incentivo e estímulo. Sem você, parceiro, o resultado não seria o mesmo.

A minha coorientadora Evânia, pela amizade, pelo pulso firme e pelo combustível para a realização de todas as atividades. Obrigado pelo exemplo de disciplina e dedicação.

Ao meu amigo Guilherme, pela grande amizade que construímos, por todo apoio nos experimentos e por todas as brincadeiras e conversas.

A minha amiga Flávia, por ser como uma “mãe”, desde os tempos de graduação, ajudando-me sempre que precisei em tudo que fosse necessário.

Aos amigos do grupo eucalipto: Lara, Mateus, Natália, Ana Carla, Larissa, Zé Renato e Vanessa, por toda disposição em ajudar.

Aos amigos do LCBM e do programa em Biotecnologia Vegetal, pelo convívio e por todos os momentos compartilhados de alegrias e tristezas, de trabalhos e diversão. Vocês foram essenciais nessa conquista.

Aos meus companheiros de república Adolfo e Gabriel, por todas as conversas, risadas, incentivos e companheirismo. Obrigado, parceiros.

Aos meus amigos de Alfenas, da Unifal-MG e do BIOGEN, os quais fizeram parte direta e/ou indiretamente dessa conquista. Muito obrigado.

Aos amigos de graduação em Biotecnologia que sempre acreditaram que eu alcançaria meus objetivos e, mais do que isso, estiveram presentes em momentos importantes durante todo esse percurso.

A toda minha família que sempre acreditou no meu potencial e na minha capacidade, dando incentivo com orações, palavras de apoio e carinho. Essa conquista também é de vocês.

MUITO OBRIGADO!

*"Nós somos o que fazemos repetidas vezes.
Portanto, a excelência não é um ato, mas um hábito."*

Aristóteles

RESUMO GERAL

As espécies do gênero *Eucalyptus* estão entre as árvores mais utilizadas em todo mundo, em razão da qualidade de suas madeiras e pelos produtos finais obtidos a partir de seu processamento, aplicáveis a diversos segmentos do mercado, principalmente de carvão vegetal, siderurgia, cavaco (bioenergia), papel e celulose. Entretanto, com o aumento da demanda por esses produtos, têm crescido as pesquisas envolvendo alternativas para aumentar os plantios de *Eucalyptus* spp., obtendo materiais de qualidade e em quantidade para serem ofertados aos mercados consumidores. Para atingir essa demanda, tornam-se necessárias pesquisas que envolvam a propagação em escala e que abordem o problema com uma visão mais holística, abrangendo o desafio de forma ampla e integrativa. Muitos estudos têm sido direcionados na tentativa de viabilizar economicamente a multiplicação em escala, em condições *in vitro*, sendo dada atenção especial aos sistemas de biorreatores. Esses equipamentos são mais automatizados e apresentam redução de custos em relação ao método convencional de micropropagação, principalmente relacionados com a utilização de agentes gelificantes e mão de obra especializada. Nesse contexto, objetivou-se estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* para um híbrido comercial de *Eucalyptus urograndis*, utilizando o sistema de biorreator de imersão temporária (BIT[®]). O trabalho focou em determinar a melhor proporção entre nitrato e amônio no fornecimento de nitrogênio, durante cultivo em meio semissólido e dentro do sistema de biorreator de imersão temporária; bem como identificar qual meio de cultura é mais adequado entre os meios MS modificado, WPM e JADS no cultivo em BIT[®]; determinar dentre as citocininas BAP, KIN e TDZ a mais eficiente em multiplicar brotações desse híbrido; e verificar qual o período de cultivo mais adequado para manter o material multiplicando no sistema. De acordo com os resultados, a relação 3:1 (NO₃⁻):(NH₄⁺) demonstrou ser a mais eficiente em fornecer nitrogênio para a cultura; o meio MS modificado possui a formulação mais adequada para o cultivo do híbrido escolhido; a citocinina BAP propiciou maior taxa de multiplicação do material vegetal; e o período de cultivo por 40 dias foi o tempo mais adequado para cultivar o híbrido comercial de *E. urograndis*.

Palavras-chave: Eucalipto. Citocininas. Biorreator - Sistema automatizado. Nitrogênio. Propagação *in vitro*.

GENERAL ABSTRACT

Eucalyptus species are among the forest trees most used worldwide due to its quality woods and the final products obtained from processing, feasible to various market segments. However, increasing demand for these products has been growing research number involving ways to increase quality and quantity of *Eucalyptus* plants to be offered to market. To achieve this demand, it is necessary researches involving the production in scale and address the problem with a more holistic view, covering broad and integrative manner that whole situation. Recently, much research has been focused on trying to economically multiply many species in large scale in in vitro conditions, with special attention given to the bioreactor systems. Such equipments are more automated systems and present low costs compared to conventional method of micropropagation mainly related with use of gelling agents and skilled labor. The aim of this work was to establish a protocol for *in vitro* propagation of a *Eucalyptus urograndis* commercial hybrid using a system from temporary immersion bioreactor (BIT[®]). The work were based on determining the best ratio nitrate and ammonium in nitrogen supply during cultivation in two different systems: semisolid culture medium and temporary immersion bioreactor; identify which culture medium is most suitable among the media WPM, modified MS and JADS in cultivation in BIT[®]; find out which cytokinin among BAP, KIN and TDZ is more efficient to multiply shoots; and establish which cultivation period is more appropriate to keep the plant material in BIT[®]. According to the results, the ratio 3:1 (NO₃⁻):(NH₄⁺) has been shown to be more effective in providing nitrogen to the culture; the modified MS medium has the most suitable formulation for this hybrid's cultivation; the BAP proved to be the best cytokinin to multiply *Eucalyptus urograndis* explants among each other assessed in BIT[®]; and the cultivation for 40 days was the most appropriate period to cultivate this commercial hybrid.

Key-words: Eucalipt. Cytokinin. Bioreactor - automated system. Nitrogen. In vitro propagation.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	10
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Gênero <i>Eucalyptus</i> , sua importância econômica e a cultura de tecidos.....	14
2.2 Formas de fornecimento de nitrogênio na cultura de tecidos vegetais.....	16
2.3 Biorreator de imersão temporária para cultivo <i>in vitro</i>	19
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	22
REFERÊNCIAS.....	24
SEGUNDA PARTE.....	29
Artigo 1 - RELAÇÕES DE NITRATO E AMÔNIO NO FORNECIMENTO DE NITROGÊNIO PARA MULTIPLICAÇÃO DE <i>Eucalyptus urograndis</i> EM DOIS SISTEMAS DE CULTIVO <i>in vitro</i>	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	32
1 INTRODUÇÃO.....	33
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
2.1 Estabelecimento do material vegetal.....	36
2.2 Cultivo em biorreator de imersão temporária (BIT®).....	36
2.3 Relações de N (NO ₃ ⁻):(NH ₄ ⁺) utilizando BIT® na multiplicação de <i>E. urograndis</i>	38
2.4 Relações de N(NO ₃ ⁻):(NH ₄ ⁺) utilizando meio semissólido na multiplicação de <i>E. urograndis</i>	39
2.5 Análises estatísticas.....	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
Artigo 2 - ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE MULTIPLICAÇÃO EM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA DE UM HÍBRIDO COMERCIAL DE <i>Eucalyptus urograndis</i>	55
RESUMO.....	56
ABSTRACT.....	57
1 INTRODUÇÃO.....	58
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1 Estabelecimento do material vegetal.....	61
2.2 Cultivo em biorreator de imersão temporária (BIT®).....	61
2.3 Meios de cultura MS modificado, WPM e JADS no cultivo em BIT®.....	63
2.4 Multiplicação em BIT® a partir da adição de diferentes citocininas.....	63
2.5 Período de cultivo das brotações de <i>E. urograndis</i> em BIT®.....	64

2.6	Análise anatômica	65
2.7	Análises estatísticas	66
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	80

PRIMEIRA PARTE

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

A importância do setor florestal para a sociedade brasileira em termos econômicos, sociais e ambientais pode ser analisada a partir da verificação de seus principais indicadores: a área de florestas plantadas, o valor bruto da produção, a geração de impostos, o valor das exportações e os empregos gerados e mantidos pelo setor em geral (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2013).

O eucalipto é a principal espécie desse setor, o qual apresenta grande relevância para os mercados brasileiro e mundial. É uma árvore de crescimento rápido e sua madeira é a principal matéria-prima para a produção de papel e celulose na Austrália, Sudoeste Europeu, Brasil, África do Sul e em diversos outros países (PRINSEN et al., 2012).

As divisas das indústrias brasileiras, utilizando o eucalipto como matéria-prima para a produção de papel, celulose e outros derivados, representam cerca de 5,7% do Produto Interno Bruto (PIB), o que gerou, em 2013, US\$ 7,1 bilhões em exportações, além de empregar mais de 2 milhões de pessoas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL - BRACELPA, 2014).

No Brasil, a maior concentração de plantios de *Eucalyptus* se encontra na região Sudeste (53,0%) em função da localização das principais unidades industriais dos segmentos de papel e celulose, painéis de madeira industrializada, siderurgia a carvão vegetal e madeira mecanicamente processada (ABRAF, 2013).

Dessa região, o estado de Minas Gerais é o que detém a maior área plantada com as espécies desse gênero, com cerca de 1.438.971 ha de um total de 2.702.380 ha, tendo sua utilização voltada principalmente para a produção de carvão vegetal. Suas características intrínsecas como rápido crescimento e

densidade de madeira considerável, com incremento médio anual (IMA) de 40,7 m³/ha.ano em 2012, garantem um carvão facilmente renovável e de boa qualidade (ABRAF, 2013). As espécies mais utilizadas no Brasil para esses fins são *E. grandis*, *E. saligna*, *E. camaldulensis* e *E. urophylla*, assim como seus híbridos (SANTOS et al., 2010).

As espécies desse gênero, naturais da Austrália, são adaptadas a uma variedade de climas e as áreas de ocorrência natural variam desde regiões sub-áridas até úmidas, contendo tanto espécies que possuem ampla distribuição geográfica quanto espécies particulares de regiões específicas (HÉROULT et al., 2013).

Certas condições adversas, entretanto, são fatores que restringem o crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo as de eucalipto, tais como os estresses abióticos e bióticos advindos do déficit hídrico, altas temperaturas, resfriamento e salinidade, bem como de pragas e doenças, respectivamente (LOPES et al., 2011), afetando diretamente a produtividade.

Dessa forma, passa a ser imprescindível que os programas de melhoramento da espécie sejam contínuos para oferecer genótipos mais adaptados às novas demandas. As principais empresas do setor possuem programas de melhoramento próprios e, periodicamente, lançam novos clones no mercado. A chegada de um material superior, mais adaptado às condições adversas, exige o suporte de um sistema paralelo que possibilite sua propagação em escala comercial, num período curto de tempo para suprir a demanda por madeira e outros produtos advindos da silvicultura clonal dessa espécie.

Aliada ao sistema convencional de produção de mudas de eucalipto, que se baseia no enraizamento de miniestacas, a biotecnologia pode ser utilizada para aumentar a eficiência do processo, seja com intuito de produzir matrizes rejuvenescidas para o sistema convencional ou como uma nova alternativa ao mercado para oferta de mudas produzidas integralmente nas condições *in vitro*.

Mas, para isso, há necessidade de otimização de procedimentos que viabilizem economicamente o processo, de modo que o valor da muda produzida *in vitro* seja competitivo com o valor da muda produzida pelo sistema convencional. Isso já é realidade para outras espécies, tais como banana, morango, batata e determinadas espécies ornamentais.

Dentre as ferramentas biotecnológicas, a cultura de tecidos vegetais, por meio da técnica de micropropagação, é uma opção viável para atender às necessidades de multiplicação em larga escala de mudas de eucalipto (AGGARWAL et al., 2012; PEREIRA; FORTES, 2003). E entre as possibilidades de multiplicação *in vitro*, os sistemas baseados em biorreatores, equipamentos que fazem uso de meios líquidos, merecem destaque pelas condições que são propiciadas ao material vegetal durante cultivo *in vitro*. Esses sistemas permitem maior ganho de biomassa e redução do período necessário para a propagação (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009), tornando-se alternativa viável à micropropagação convencional, especialmente por automatizar etapas do processo e reduzir os custos de produção (MOREIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2011a) ligados, principalmente, aos preços dos agentes gelificantes e custos com mão de obra especializada no método convencional.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero *Eucalyptus*, sua importância econômica e a cultura de tecidos

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, abrange mais de 700 espécies espalhadas por todo mundo, sendo uma das principais fontes de madeira e a árvore mais amplamente empregada em plantações para fins industriais. Muitas espécies de eucalipto são facilmente renováveis, em decorrência da sua alta taxa de crescimento, a forma retilínea de seus troncos, valor da madeira, ampla adaptabilidade a solos e climas, resistência a estresses bióticos e a facilidade de gerenciar processos relacionados à propagação clonal (OLIVEIRA et al., 2012).

Diferentes espécies de eucalipto são empregadas para diversos fins industriais do setor florestal como *Eucalyptus dunni*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. maidenii*, *E. nitens*, *E. saligna* e *E. urophylla*, tanto a partir de cultivos individuais de cada espécie quanto de híbridos advindos de cruzamentos duplos e triplos entre essas espécies (PRINSEN et al., 2012).

O maior interesse na madeira dessas espécies é decorrente do baixo custo de produção em determinadas regiões, principalmente, pelos altos rendimentos da biomassa, da produtividade florestal e a qualidade de suas fibras (PRINSEN et al., 2012). Por ser uma árvore com madeira contendo fibras curtas, as quais são mais demandadas pelo mercado para produção de papéis de escrever, imprimir e de fins sanitários (BRACELPA, 2014), o eucalipto é mais utilizado que outras espécies florestais que também apresentam valor comercial como, por exemplo, o pinus. A suavidade, brilho e a baixa resistência à tração das fibras de eucalipto, além do aspecto retilíneo de sua madeira que apresenta alta densidade, faz com que as espécies desse gênero sejam de grande importância para a indústria de papel e de móveis (GIRIJASHANKAR, 2011).

No Brasil, os custos de produção de biomassa são baixos quando comparados com outras partes do mundo, em razão de uma série de fatores. Dentre eles estão o clima adequado para estabelecimento da cultura, ampla área disponível para cultivo, tecnologias agrícolas, excelente adaptação de certas culturas ao clima tropical (PRINSEN et al., 2012) e o IMA obtido, na ordem de 40,7m³/ha.ano, em comparação com uma média de 15 m³/ha.ano de outros países.

Em 2012, a área plantada com *Eucalyptus*, no Brasil, totalizou 76,6% do total de 6.664.812 ha de florestas plantadas no país. Entretanto, não foi observado crescimento significativo da área de plantios tanto com *Eucalyptus* quanto com *Pinus*, pela tendência de desaceleração da expansão das áreas de plantios apresentada nos dois anos anteriores (ABRAF, 2013).

As principais causas para essa estagnação das áreas de plantios florestais em 2012 estão relacionadas com as restrições impostas pelo governo brasileiro à compra de terras por grupos nacionais que possuam composição majoritária de capital estrangeiro; a reduzida atividade econômica nos países da União Europeia e nos Estados Unidos, países estes que importam produtos florestais ou da cadeia de base florestal plantada; a redução da competitividade no mercado internacional dos produtos da cadeia produtiva brasileira de base florestal; e a burocratização excessiva somada aos longos prazos requeridos pelos órgãos ambientais nos processos de licenciamento ambiental de novos projetos florestais e industriais do país (ABRAF, 2013).

De acordo com a importância dessa espécie no cenário nacional e a atual conjuntura socioeconômica no setor, elevar a produção de plantas de *Eucalyptus* se torna crucial à silvicultura brasileira, a fim de produzir mudas de qualidade e em quantidade para atender à demanda crescente no mercado interno e externo, além de aumentar a competitividade e a preferência pelos produtos florestais nacionais em relação aos estrangeiros.

A cultura de tecidos, por meio da micropropagação, é uma opção interessante para atingir esse objetivo, pois auxilia na produção em escala comercial de mudas de qualidade, em curto espaço de tempo e livres de pragas e doenças (PEREIRA; FORTES, 2003; RIBEIRO et al., 2013). Assim, a cultura de tecidos aparece como uma alternativa viável para produção de mudas de *Eucalyptus* spp., com a finalidade de ajudar a superar as dificuldades mencionadas, reestabelecendo o aumento na quantidade de plantios, abastecendo o mercado com produtos oriundos dessas espécies e auxiliando tanto em ganhos socioeconômicos e ambientais quanto na geração de conhecimento científico a partir de pesquisas envolvendo essas metodologias.

Para a obtenção de resultados mais eficientes dentro da micropropagação é imprescindível ter conhecimento e controle sobre vários fatores que afetam o processo e, entre eles, a composição do meio de cultura é um dos mais importantes. Reguladores de crescimento, carboidratos, vitaminas, macro e micronutrientes, todas essas substâncias são essenciais para promover o crescimento adequado das culturas. São esses compostos que regulam os padrões de desenvolvimento vegetal, atuando diretamente nas respostas das plantas durante o período de cultivo *in vitro*.

2.2 Formas de fornecimento de nitrogênio na cultura de tecidos vegetais

O nitrogênio (N) é um importante macronutriente vegetal por ser considerado um elemento essencial para a biossíntese de compostos relacionados com o crescimento e desenvolvimento das plantas, tais como aminoácidos, proteínas, enzimas, pigmentos e auxinas (CRUZ; PELACANI; ARAÚJO, 2006; KOVÁČIK; BAČKOR, 2007). Em diversos sistemas de produção, a sua disponibilidade é quase sempre um fator limitante,

influenciando diretamente sobre o crescimento vegetal mais do que qualquer outro nutriente (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000).

A forma com que esse elemento está disponível e será absorvido pelas plantas, seja como nitrato ou amônio, tem impactos bem diferentes sobre a morfologia vegetal (KOVÁČIK; KLEJDUS, 2014), sendo o íon nitrato a forma mais abundante (DOMINGUEZ-VALDIVIA et al., 2008), em razão do processo de nitrificação pelas bactérias que provocam a oxidação do amônio livre. Todavia, dependendo das condições do solo, a inibição dessas bactérias pode permitir a presença em maior quantidade da forma amoniacal (SHAN et al., 2012).

Entretanto, o amônio é um íon que está relacionado com sintomas de toxicidade na planta (DOMINGUEZ-VALDIVIA et al., 2008), podendo influenciar negativamente tanto no crescimento da parte aérea quanto da raiz (KOVÁČIK; KLEJDUS, 2014). Assim, por apresentar efeitos tóxicos, o NH_4^+ é assimilado geralmente nas raízes, enquanto que o NO_3^- pode ser assimilado nas raízes, na parte aérea, ou em ambos os sítios (FORDE, 2002).

A enzima que catalisa a redução do nitrato a nitrito, conhecida como redutase do nitrato (RN), é a principal enzima responsável pela entrada do nitrogênio nítrico no metabolismo das plantas (SHAN et al., 2012) e esse processo acontece no citosol das células. Posteriormente, o nitrito é convertido a amônio nos plastídeos, por meio da redutase do nitrito (RNi) (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000). Todo esse processo de redução do nitrato a amônio é seguido por uma rápida incorporação em aminoácidos realizada pela ação das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase (GS/GOGAT) (RUBIO-WILHELMI et al., 2012), ou mesmo pela glutamato desidrogenase (GDH), a qual faz parte de uma rota alternativa e promove a catálise reversível da desaminação do glutamato (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2006).

Embora a forma nítrica seja a mais abundante no solo, a preferência por uma forma ou outra é variável de espécie para espécie e até mesmo entre genótipos de uma mesma espécie. No trabalho de Shan et al. (2012) com plântulas de *Hevea brasiliensis* (seringueira) cultivadas em casa de vegetação, os autores verificaram maiores concentrações de nitrogênio total e aminoácidos nas plantas a partir da utilização de amônio, enquanto que no trabalho de Kintzios, Starvropoulou e Skamneli (2004) com cultivares de *Cucumis melo* L. (melão), melhor regeneração dos brotos do cultivar ‘Daniel’ foi obtida apenas pela presença de NO_3^- durante cultivo *in vitro*. Oliveira et al. (2011b), trabalhando com um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* também obtiveram resultados satisfatórios, utilizando as relações 2:1 e 3:1 de $(\text{NO}_3^-):(\text{NH}_4^+)$, durante o cultivo em biorreator de imersão temporária.

Nos sistemas de cultivo *in vitro*, espera-se que os meios de cultura adotados forneçam os nutrientes na forma e proporção adequada ao crescimento do material vegetal. Conforme estudos prévios, os meios MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), JADS (CORREIA et al., 1995) e *Woody Plant Medium* (WPM) (LLOYD; MCCOWN, 1981) são os meios nutritivos mais comumente usados para as espécies de *Eucalyptus* (BRONDANI et al., 2012; FREITAG et al., 2012), e esses meios apresentam composições e proporções diferentes em relação ao conteúdo de nitrogênio (TABELA 1). O meio WPM possui 45% da força iônica total do meio MS e concentrações menores de nitrato, amônio e nitrogênio total (NUNES et al., 2002; ROCHA et al., 2007). Quantidades reduzidas de nitrogênio também são observadas para o meio JADS, com concentrações menores de NO_3^- , NH_4^+ e, aproximadamente, 2,3 vezes menos nitrogênio total que o meio MS (PINTO et al., 2008).

Tabela 1 Comparação dos níveis de macroelementos, microelementos e íons nos meios de cultura MS, WPM e JADS (mM).

Íons	MS	WPM	JADS
NO ₃ ⁻	39.31000	9.70000	22.00000
H ₂ PO ₄ ⁻	1.25000	1.24000	3.00000
SO ₄ ²⁻	1.62000	7.30000	0.30000
Cl ⁻	5.98020	1.30000	0.00022
K ⁺	19.95500	12.61500	11.00000
Ca ⁺	2.99900	3.00000	5.00000
Na ⁺	0.10200	0.10200	0.40124
Mg ₂ ⁺	1.50000	1.50000	3.00000
NH ₄ ⁺	20.61000	5.00000	4.00000
N total	59.92000	14.70000	26.00000
NH ₄ ⁺ /NO ₃ ⁻	0.52420	0.51500	0.18000

Dessa forma, estudos que envolvam identificar a melhor forma de fornecimento de nitrogênio, bem como a proporção entre os íons nitrato e amônio se mostram relevantes para promover um crescimento adequado das culturas de interesse em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*.

2.3 Biorreator de imersão temporária para cultivo *in vitro*

Os biorreatores de imersão temporária (BIT) são equipamentos baseados na utilização de meio líquido para a produção em escala comercial de material vegetal, promovendo o aumento de biomassa com redução do tempo de cultivo (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; PENCHEL; OTONI; XAVIER, 2007). Esses resultados são obtidos, pelo maior contato superficial que os explantes estabelecem com o meio de cultura, levando a um aumento na capacidade de absorção dos nutrientes (PEREIRA; FORTES, 2003; RODRIGUES et al., 2006). Além disso, esse sistema propicia maior aeração dentro do ambiente *in vitro*, pois ocorre a renovação da atmosfera gasosa no interior dos frascos (MCALISTER et al., 2005; VASCONCELOS et al., 2012).

Os biorreatores têm sido usados como alternativa ao método convencional de micropropagação, o qual faz uso de pequenos recipientes com número reduzido de explantes em meio de cultura solidificado por um agente gelificante. No método convencional, além da intensa manipulação das culturas, ocorre o envolvimento de muita mão de obra, além de outros aspectos relacionados com as condições de manutenção das culturas (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). Esses fatores encarecem o processo de micropropagação, fazendo do BIT uma alternativa tecnológica economicamente interessante e automatizada para produção em escala comercial de espécies de interesse (MOREIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2011a; SILVA et al., 2007).

Vários trabalhos têm sido realizados com diversas espécies vegetais, visando ao cultivo em sistema de biorreator de imersão temporária, tais como: *Heliconia champneiana* (helicônia) (RODRIGUES et al., 2006), *Ananas* sp. (abacaxizeiro) (SILVA et al., 2007), *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* (OLIVEIRA et al., 2011a, 2011b), *Tectona grandis* L. (teca) (QUIALA et al., 2012), *Rhodiola crenulata* (ZHAO et al., 2012), *Cattleya walkeriana* (MOREIRA et al., 2013), entre outros. A maioria desses trabalhos busca mostrar a eficiência dos BITs em promover aumento nos rendimentos de multiplicação dessas espécies e reduzir os custos de produção quando comparado ao método convencional de micropropagação.

Um dos desafios para a utilização dos biorreatores é a contaminação por microrganismos nas fases iniciais de estabelecimento do material vegetal e na manutenção do cultivo *in vitro* (MCALISTER et al., 2005). Visando a prevenção desse problema, esses autores iniciaram o cultivo de clones de *Eucalyptus* em meio semissólido, com posterior pré-tratamento à base de rifampicina, e conseguiram obter material livre de contaminação e com pouco

efeito adverso do antibiótico sobre os brotos antes de inseri-los em biorreator do tipo RITA[®].

Outro problema associado ao cultivo em biorreatores é o aparecimento da hiperidricidade, uma desordem fisiológica relacionada com o acúmulo anormal de água no interior das células e tecidos, ocasionada pela exposição frequente dos explantes ao meio líquido (VASCONCELOS et al., 2012). A utilização desse tipo de meio promove uma alta disponibilidade de água e uma alta umidade relativa no ambiente *in vitro*, favorecendo o aparecimento dessa desordem (OLIVEIRA et al., 2011b; PENCHEL; OTONI; XAVIER, 2007). Alguns autores relataram problemas com essa desordem em espécies de eucalipto durante cultivo em BIT (MCALISTER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011b) e em outras espécies (QUIALA et al., 2012; ZHAO et al., 2012). Porém, uma maneira de contornar e/ou prevenir esse problema pode ser controlando o tempo e a frequência de imersão dos explantes no meio, bem como os intervalos de aeração do ambiente *in vitro* (SILVA et al., 2007).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A demanda por mudas de *Eucalyptus* advindas da silvicultura clonal tem aumentado, substancialmente, nos últimos anos, em decorrência das características favoráveis que as espécies desse gênero apresentam em comparação às outras espécies do mesmo setor, atendendo as exigências impostas pelos diversos mercados industriais de base florestal. Vários programas de melhoramento genético têm trabalho de forma intensa e consistente, visando ao melhoramento das espécies de *Eucalyptus* com o objetivo de superarem os problemas relacionados com as mudanças climáticas, promover a resistência a pragas e doenças, ou, ainda, incrementar características que favoreçam sua comercialização, como incrementos nos rendimentos de madeira e na velocidade da taxa de crescimento.

Aliado a essas atividades, é relevante desenvolver técnicas de propagação que viabilizem a produção de mudas das espécies melhoradas. O sistema de biorreatores é uma opção interessante, uma vez que é baseado na automatização dos processos convencionais de cultivo *in vitro*, demandando quantidade menor de mão de obra especializada e, simultaneamente, reduzindo os custos dos processos de produção.

Embora existam alguns trabalhos direcionados a entender o comportamento de alguns clones de eucalipto no sistema de biorreator, verifica-se, ainda, a necessidade de novos dados experimentais para agregar conhecimento ao processo, objetivando o estabelecimento de protocolos eficientes e, se possível, mais adaptados às diferentes espécies e/ou híbridos de interesse comercial. Nesse sentido, estudos envolvendo a composição e o tipo de meio de cultura, a influência dos reguladores de crescimento, o tempo e a frequência de imersão e aeração, períodos de cultivo, entre outros, tornam-se imprescindíveis.

No presente estudo, para execução dos experimentos utilizou-se um biorreator de imersão temporária (BIT[®]) desenvolvido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, acoplado ao chassi pneumático modelo MFE – 1001, desenvolvido pela Fitoclone (Viçosa-MG) (FIGURA 1).



Figura 1 Biorreator de imersão temporária (BIT[®]) acoplado ao chassi pneumático modelo MFE – 1001. Este equipamento foi desenvolvido em cooperação técnica entre a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF, com a empresa Fitoclone, Viçosa - MG.

De acordo com o exposto, conduziu-se esse trabalho, com o objetivo de desenvolver um protocolo específico de multiplicação *in vitro* para o híbrido comercial de *Eucalyptus urograndis*, utilizando o sistema de biorreator de imersão temporária (BIT[®]).

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, D. et al. Factors affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, New York, v. 48, n. 5, p. 521-529, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL. **Produção e receita de exportação crescem em 2013**. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/bra2/index.php>>. Acesso em: 18 fev. 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico: ano base 2012**. Brasília, 2013. 148 p. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/estatisticas.asp>>. Acesso em: 9 jan. 2014.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 365-372, mar./abr. 2000.

BRONDANI, G. E. et al. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, New York, v. 48, n. 5, p. 478-487, 2012.

CORREIA, D. et al. 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, n. 48/49, p. 107-116, 1995.

CRUZ, J. L.; PELACANI, C. R.; ARAÚJO, W. L. Efeito do nitrato e amônio sobre o crescimento e eficiência de utilização do nitrogênio em mandioca. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 3, p. 467-475, 2006.

DOMINGUEZ-VALDIVIA, M. D. et al. Nitrogen nutrition and antioxidant metabolism in ammonium-tolerant and -sensitive plants. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 132, n. 3, p. 359-369, 2008.

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

FORDE, B. G. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 203-224, 2002.

FREITAG, A. S. et al. Estudo comparativo entre dois meios de cultura para *Corymbia citriodora in vitro*. **Floresta**, Curitiba, v. 42, n. 2, p. 347-354, 2012.

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

HÉROULT, A. et al. Optimal stomatal conductance in relation to photosynthesis in climatically contrasting *Eucalyptus* species under drought. **Plant, Cell & Environment**, Hoboken, v. 36, n. 2, p. 262-274, Feb. 2013.

KINTZIOS, S.; STARVROPOULOU, E.; SKAMNELI, S. Accumulation of selected macronutrients and carbohydrates in melon tissue cultures: association with pathways of in vitro dedifferentiation and differentiation (organogenesis, somatic embryogenesis). **Plant Science**, Clare, v. 167, n. 3, p. 655-664, 2004.

KOVÁČIK, J.; BAČKOR, M. Changes of phenolic metabolism and oxidative status in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 297, n. 1/2, p. 255-265, 2007.

KOVÁČIK, J.; KLEJDUS, B. Induction of phenolic metabolites and physiological changes in chamomile plants in relation to nitrogen nutrition. **Food Chemistry**, Oxford, v. 142, n. 1, p. 334-341, 2014.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, Carlisle, v. 30, p. 421-327, 1981.

- LOPES, J. L. W. et al. Estresse hídrico em plantio de *Eucalyptus grandis* VS. *Eucalyptus urophylla* em função do solo, substrato e manejo hídrico de viveiro. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 31-39, jan. 2011.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C. et al. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 2, p. 444-456, Feb. 2006.
- MCALISTER, B. et al. Use of temporary immersion bioreactor system (RITA[®]) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, n. 3, p. 347-358, 2005.
- MOREIRA, A. L. et al. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1804-1810, 2013.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NUNES, E. C. et al. *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 70, n. 3, p. 259-268, Sept. 2002.
- OLIVEIRA, L. A. et al. Reference genes for the normalization of genes expression in *Eucalyptus* species. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 405-422, Feb. 2012.
- OLIVEIRA, M. L. de et al. Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 6, p. 1207-1217, 2011a.

OLIVEIRA, M. L. de et al. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 39, n. 91, p. 309-315, 2011b.

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

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, set. 2003.

PINTO, G. et al. 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.

PRINSEN, P. et al. Morphological characteristics and composition of lipophilic extractives and lignin in Brazilian woods from different eucalypt hybrids. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 572-583, Mar. 2012.

QUIALA, E. et al. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 109, n. 2, p. 223-234, 2012.

RIBEIRO, J. M. et al. Uso da rapadura como meio nutritivo *in vitro* de bananeira cv. Maçã. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 60, n. 5, p. 722-725, 2013.

ROCHA, S. C. et al. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 31, n. 1, p. 43-50, jan./fev. 2007.

RODRIGUES, P. H. V. et al. Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 29-35, 2006.

RUBIO-WIHELMI, M. del M. et al. Ammonium formation and assimilation in $P_{sark}::IPT$ tobacco transgenic plants under low N. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 169, n. 2, p. 157-162, 2012.

SANTOS, A. F. et al. Ocorrência de mancha foliar bacteriana em plantios de eucalipto no Estado de Mato Grosso e de Santa Catarina. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, p. 232, ago. 2010. Suplemento.

SHAN, A. Y. K. V. et al. Assimilação metabólica de nitrogênio em plântulas de seringueira cultivadas com nitrato ou amônio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 6, p. 754-762, jun. 2012.

SILVA, A. B. et al. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, p. 1257-1260, set. 2007.

VASCONCELOS, A. G. V. et al. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 837-844, 2012.

ZHAO, Y. et al. Improved mass multiplication of *Rhodiola crenulata* shoots using temporary immersion bioreactor with forced ventilation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 166, n. 6, p. 1480-1490, 2012.

SEGUNDA PARTE

Artigos

**Artigo 1 RELAÇÕES DE NITRATO E AMÔNIO NO
FORNECIMENTO DE NITROGÊNIO PARA MULTIPLICAÇÃO DE
Eucalyptus urograndis EM DOIS SISTEMAS DE CULTIVO *in vitro***

RESUMO

As espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus* são umas das mais cultivadas em todo mundo, em razão das propriedades que suas árvores possuem, como boa adaptabilidade a uma variedade de climas e por apresentarem características que atendem ao mercado consumidor crescente de madeira e celulose. O fornecimento de mudas para plantio exige um rigoroso controle das etapas do processo de produção que antecedem a sua liberação, principalmente relacionados à nutrição do material. Estudos *in vitro*, envolvendo a utilização de nutrientes específicos que interferem no crescimento vegetal, já são uma realidade nas últimas décadas, visando, principalmente, aos ganhos em produtividade de espécies de interesse. O nitrogênio é um desses nutrientes de importância para o desenvolvimento da planta, relacionado na composição de várias biomoléculas essenciais para o vegetal. Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, averiguar quais relações de nitrato e amônio são mais eficientes no fornecimento de nitrogênio durante o cultivo em dois sistemas - biorreator de imersão temporária e em meio semissólido - de um híbrido comercial de *Eucalyptus urograndis*. As relações de nitrogênio testadas foram 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e 1:3 de NO_3^- e NH_4^+ , respectivamente, em meio MS modificado e suplementado com auxina e citocinina. A relação de 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) foi a que propiciou melhores resultados para todas as variáveis em um contexto geral para os dois sistemas estudados, mostrando que os níveis mais elevados de nitrato em relação a amônio favorece o cultivo do híbrido de *E. urograndis*. Recomenda-se a utilização da relação 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) tanto para o cultivo em biorreator de imersão temporária quanto em meio semissólido para multiplicação desse híbrido.

Palavras-chave: Biorreator de imersão temporária. Silvicultura clonal. Nutrição *in vitro*. Cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Eucalyptus species are one of the most cultivated plants worldwide due to its interesting properties as good adaptability to a variety of climates, besides characteristics that meet a growing consumer market for wood pulp. The supply of seedlings for planting requires a strict control of production process stages prior to its release, mainly related to material nutrition. *In vitro* studies involving the use of specific nutrients that interfere with plant growth are already a reality in recent decades, mainly targeting productivity gains of interest species. Nitrogen is one such nutrient important for the plant development, related with the composition of various essential biomolecules to the plant. Larger studies involving the use of nutrients interfering on plant growth is a reality in last decades, mainly targeting productivity gains of interest species. Thereby, aim of this work was to investigate which relations nitrate and ammonium are more efficient in nitrogen supply during cultivation in two systems - temporary immersion bioreactor and semisolid culture medium - of a commercial hybrid of *Eucalyptus urograndis*. The nitrogen relations tested were 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 and 1:3 (NO_3^-):(NH_4^+), respectively, in modified MS medium supplemented with auxin and cytokinin. The ratio 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) was the best for all parameters studied, in a general context, for the two systems assessed and the highest nitrate levels are more suitable than the other ones to cultivate this *E. urograndis* hybrid. The ratio 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) for both cultivation in temporary immersion bioreactor as in semisolid medium for multiplication this hybrid is recommended.

Key-words: Temporary immersion bioreactor. Clonal forestry. *In vitro* nutrition. *In vitro* culture.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, abrange mais de 700 espécies espalhadas por todo mundo, sendo uma das principais fontes de madeira e a árvore mais amplamente empregada em plantações para fins industriais. Muitas de suas espécies possuem características desejáveis para o mercado, como a sua alta taxa de crescimento, a forma retilínea de seus troncos, valor da madeira, ampla adaptabilidade a solos e climas, além de resistência a estresses bióticos (OLIVEIRA et al., 2012).

As plantações com *Eucalyptus* representaram cerca de 76,6% da área total (6,6 milhões de hectares) de plantios florestais realizados em 2012, no Brasil, com previsão de aumento da área plantada nos próximos anos. Isso se deve a ampla gama de utilização de seus produtos para os segmentos industriais de papel e celulose, painéis de madeira industrializada, madeiras processadas mecanicamente, siderurgia a carvão vegetal e biomassa (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2013). Com o aumento de demanda por produtos derivados da cadeia produtiva dessas espécies, estudos envolvendo a propagação clonal se tornam de grande relevância, a partir do uso de técnicas que maximizem a produção de mudas de qualidade que possam ser fornecidas ao mercado.

Na silvicultura clonal de *Eucalyptus*, a principal forma de propagação vegetativa utilizada atualmente é a miniestaquia. Esta consiste no enraizamento de estacas caulinares com tamanhos que variam entre 5 – 8 cm, menores que na estaquia convencional (XAVIER; SILVA, 2010). Entretanto, para algumas espécies, esse método promove baixo índice de enraizamento em função do acúmulo de inibidores (ANDRADE; ALMEIDA; GONÇALVES, 2006), o que restringe a utilização dessa técnica.

A cultura de tecidos, por meio da técnica de micropropagação, é uma ferramenta valiosa para a multiplicação de espécies florestais, podendo resultar em ganhos genéticos rápidos e em maiores retornos às plantações, pelo aumento na produtividade (AGGARWAL et al., 2012; PEREIRA; FORTES, 2003). Entretanto, em decorrência dos elevados custos com agentes gelificantes e, principalmente, com mão de obra especializada, a utilização dessa técnica encarece o processo comercial de produção de mudas.

Uma abordagem que tem sido usada com o intuito de multiplicar espécies de interesse e reduzir os custos de produção é a baseada na utilização de biorreatores de imersão temporária. Esses equipamentos permitem um maior ganho de biomassa e redução do período necessário para propagação (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009), além de ser uma tecnologia automatizada com diminuição na quantidade de mão de obra necessária para a execução do processo (OLIVEIRA et al., 2011a). Tais incrementos são possíveis, pelo maior contato superficial das brotações com o meio de cultura e, conseqüentemente, aumento na absorção dos nutrientes (PEREIRA; FORTES, 2003).

Alguns trabalhos com *Eucalyptus*, utilizando o sistema de biorreator têm sido realizados, objetivando propagar as espécies desse gênero (CASTRO; GONZÁLEZ, 2002; MCALISTER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011b).

Entretanto, além do sistema de cultivo, é importante averiguar a composição do meio de cultura, uma vez que a fonte e a concentração de sais minerais fornecidos aos explantes são essenciais para promover o seu crescimento e desenvolvimento adequados. Dentre os vários elementos presentes no meio de cultivo, o nitrogênio (N) está entre os principais nutrientes essenciais (VILLA et al., 2009), pois está relacionado à biossíntese de compostos envolvidos com o crescimento e desenvolvimento das plantas, tais como aminoácidos, enzimas, proteínas, pigmentos e auxinas (CRUZ; PELACANI; ARAÚJO, 2006; KOVÁČIK; BAČKOR, 2007).

Esse elemento encontra-se em grandes concentrações nos tecidos vegetais e sua participação no metabolismo tem sido investigada em diversas espécies cultivadas, principalmente as de ciclo anual. Porém, existem poucas informações disponíveis sobre esse assunto envolvendo o cultivo *in vitro* de espécies florestais (JESUS et al., 2012).

A forma na qual o nitrogênio está disponível e será absorvido pelas plantas, seja como nitrato ou amônio, tem impactos bem diferentes sobre a morfologia vegetal (KOVÁČIK; KLEJDUS, 2014), sendo o íon nitrato a forma preferencial a ser absorvida pelas plantas no solo (DOMINGUEZ-VALDIVIA et al., 2008). Entretanto, nas condições *in vitro*, a preferência por determinada forma nitrogenada varia entre espécies e mesmo dentre genótipos de uma mesma espécie (ALLÈGRE et al., 2004; IVANOVA; STADEN, 2009; KINTZIOS; STARVROPOULOU; SKAMNELI, 2004; OLIVEIRA et al., 2011b).

De acordo com o exposto, conduziu-se este trabalho, com o objetivo de verificar a influência do balanço entre nitrato e amônio na absorção de nitrogênio, durante a multiplicação do híbrido comercial de *E. urograndis* em biorreator de imersão temporária (BIT[®]) e em meio semissólido.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento do material vegetal

O material vegetal foi obtido a partir de matrizes de um híbrido comercial de *E. urograndis* proveniente de um viveiro comercial localizado no município de Lavras – MG.

Brotos advindos das matrizes clonais foram excisados e desinfestados, utilizando pastilhas de paraformaldeído, por 40 minutos. Em câmara de fluxo laminar horizontal, regiões apicais caulinares foram isoladas e inoculadas em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo 25,0 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de 20,0 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 1,7 g.L⁻¹ de Phytigel® (SIGMA). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C por 20 minutos. A inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar horizontal e os explantes permaneceram durante cinco dias no escuro. Após esse período, os explantes foram transferidos para meio MS modificado, suplementado com auxina e citocinina nas mesmas condições anteriores. O material vegetal foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, irradiância de 40 µmol.m⁻².s⁻¹ fornecida por luz fluorescente branca e temperatura de 26 ± 2 °C, permanecendo nessa condição por um período de 40 dias.

2.2 Cultivo em biorreator de imersão temporária (BIT®)

Um biorreator de imersão temporária (BIT®) acoplado a um chassi pneumático modelo MFE – 1001 (Fitoclone, Viçosa, MG, Brasil) foi utilizado na execução dos experimentos (FIGURA 1). O ciclo de imersão temporária foi controlado por um sistema eletrônico (temporizador), configurado nas seguintes

condições: troca do meio de cultura entre os frascos a cada 2 horas, contato do meio de cultura com os explantes por 10 segundos e injeção de ar para renovação do ambiente atmosférico *in vitro* a cada 1 hora. A injeção de ar foi efetuada por meio da passagem por filtros (autoclaváveis) com poros de $0,20\ \mu\text{m}$ para esterilização. Os frascos de cultivo foram esterilizados quimicamente, permanecendo 12 horas com uma solução de hipoclorito de sódio comercial diluída a $0,036\%$ (m/v) de cloro ativo. Todos os meios de cultura utilizados no biorreator tiveram o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a $121\ ^\circ\text{C}$ por 20 minutos. O biorreator contendo o material vegetal foi mantido em sala de crescimento com temperatura de $26 \pm 2\ ^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $40\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas, também pelo sistema eletrônico.

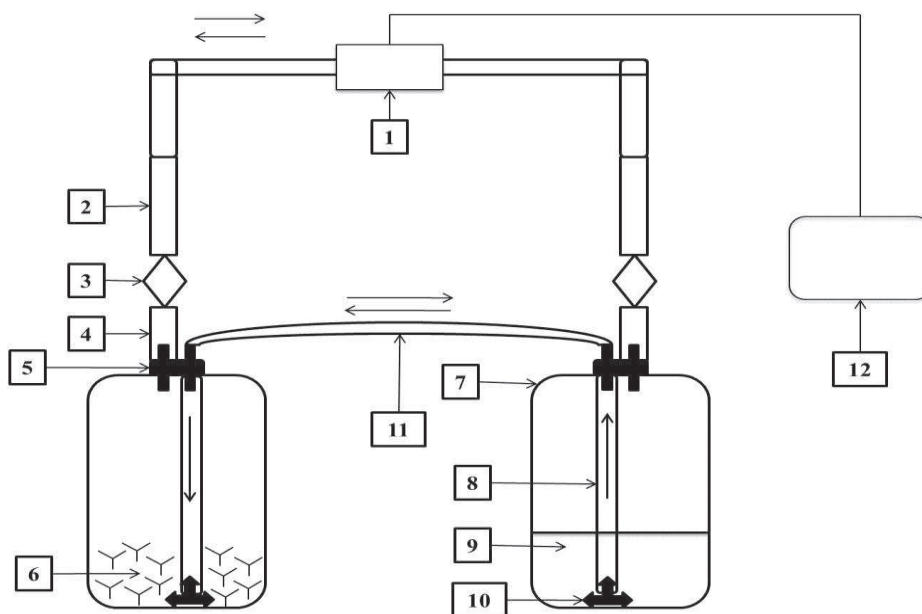


Figura 1 Diagrama do biorreator de imersão temporária com sistema de injeção de ar. 1 válvula solenoide, 2 tubo de borracha, 3 filtro de ar de $0,2\ \mu\text{m}$, 4 tubo de borracha de silicone, 5 tampa com ductos, 6 material vegetal, 7 frasco de cultivo de 5,0 L, 8 tubo de borracha de silicone, 9 Meio de cultura, 10 conexão tipo T, 11 tubo de borracha de silicone, 12 compressor de ar. Fonte: Fitoclone (modificado).

2.3 Relações de N (NO₃⁻):(NH₄⁺) utilizando BIT[®] na multiplicação de *E. urograndis*

Após 20 subcultivos dos brotos previamente estabelecidos *in vitro*, as brotações obtidas foram utilizadas como fonte de explantes, os quais consistiram de regiões caulinares com dois segmentos nodais. Os explantes foram inoculados nos frascos do biorreator, contendo 400,0 mL de meio líquido basal MS modificado com diferentes proporções de nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺) (3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3), respectivamente (TABELA 1). O meio de cultivo foi suplementado com auxina, citocinina e 20 g.L⁻¹ de sacarose. A inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar horizontal e o material vegetal mantido conforme condições descritas no item anterior.

Tabela 1 Concentração dos íons (NO₃⁻), (NH₄⁺) e de nitrogênio total (mM) nas cinco relações (NO₃⁻):(NH₄⁺) estudadas na multiplicação de um híbrido comercial de *E. urograndis* em biorreator de imersão temporária BIT[®].

Íons	Relação N(NO ₃ ⁻):(NH ₄ ⁺) (mM)				
	3:1	2:1	1:1	1:2	1:3
N(NO ₃ ⁻)	45,0	40,0	30,0	20,0	15,0
N(NH ₄ ⁺)	15,0	20,0	30,0	40,0	45,0
N total	60,0	60,0	60,0	60,0	60,0

Após 15 dias de cultivo, as variáveis analisadas foram o número de brotos, comprimento do maior broto, massa fresca e o número de folhas do maior broto. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 11 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante caulinar contendo dois segmentos nodais.

2.4 Relações de $N(NO_3^-):(NH_4^+)$ utilizando meio semissólido na multiplicação de *E. urograndis*

Este experimento foi conduzido conforme as condições experimentais anteriores, porém o cultivo foi realizado em meio semissólido. Foi utilizado o meio MS modificado, suplementado com auxina, citocinina, 20 g.L^{-1} de sacarose e diferentes relações entre $(NO_3^-):(NH_4^+)$ (3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3), conforme a tabela 1. Os meios de cultura foram gelificados com $1,7 \text{ g.L}^{-1}$ de Phytigel® (SIGMA). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, por 20 minutos. Após a inoculação, o material vegetal foi mantido nas mesmas condições do item anterior.

A avaliação do experimento foi realizada aos 15 e 30 dias de cultivo e as variáveis analisadas foram o número de brotos, comprimento do maior broto, massa fresca e o número de folhas do maior broto. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento e cada repetição composta por um frasco contendo 6 explantes (regiões caulinares com 2 segmentos nodais), totalizando 20 frascos para cada período de cultivo.

2.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas a partir da submissão dos dados à análise de variância (ANOVA), utilizando o software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011) e as médias comparadas, utilizando o teste de Scott-Knott à 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No sistema BIT[®], para multiplicação de *E. urograndis*, foi observada diferença estatística para todas as variáveis (GRÁFICO 1) e a relação 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) foi a mais eficiente em promover aumento nos valores das características analisadas. A relação de 1:3 (NO_3^-):(NH_4^+) foi a que esteve entre as menores médias para todas as variáveis, demonstrando que os níveis mais altos de amônio no sistema BIT[®] influenciam de forma menos efetiva no crescimento das brotações de eucalipto.

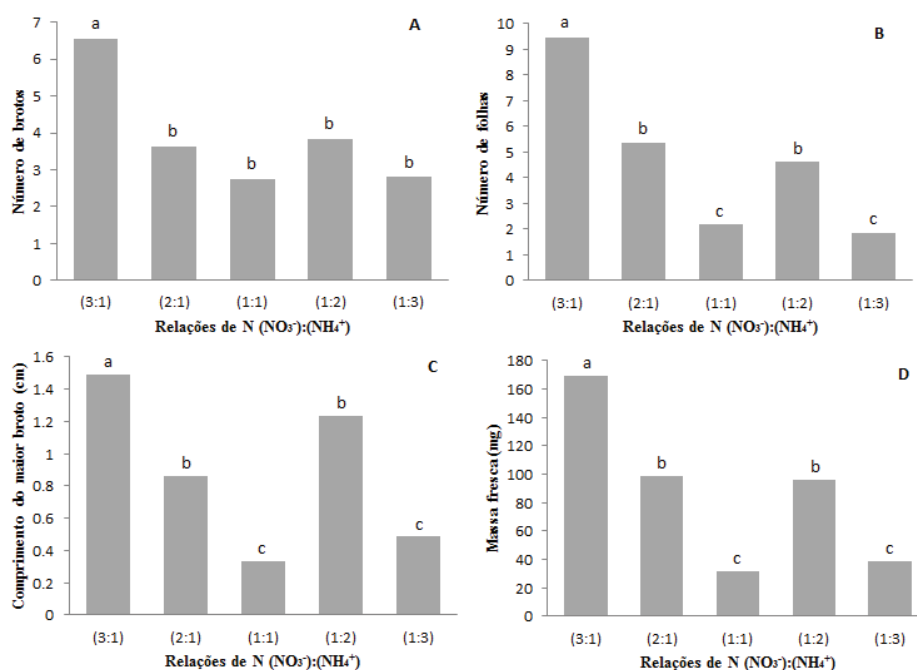


Gráfico 1 Influência das relações de nitrogênio (NO_3^-):(NH_4^+) sobre o A) número de brotos; B) número de folhas do maior broto; C) comprimento do maior broto; e D) massa fresca de explantes de *E. urograndis* cultivados em BIT[®] por um período de 15 dias. Letras diferentes sobre as colunas representam diferença estatística entre os tratamentos pelo Teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O número médio de brotos (6,54 brotos) e de folhas no maior broto (9,45 folhas) foi superior na relação 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+), propiciando um melhor fornecimento de nitrogênio para os explantes. Essa proporção de nitrogênio também permitiu a obtenção de maiores médias para o comprimento (1,49 cm) e para a massa fresca das brotações (165,69 mg), cultivadas nessa mesma condição, durante o cultivo em BIT[®]. Como na relação 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+), a quantidade de nitrato é maior que a de amônio, pode ter ocorrido um aumento da atividade da enzima nitrato redutase (NR), a partir da indução da enzima pelo substrato (LEA et al., 2006), permitindo que a absorção de nitrato fosse mais eficiente e promovesse o incremento das características citadas. Ivanova e Staden (2009), trabalhando com brotações de *Aloe polyphylla* obtiveram resultados semelhantes, em que os brotos cultivados apenas na presença de NO_3^- apresentaram maior taxa de multiplicação em relação aos cultivados em presença de NH_4^+ .

Vários mecanismos estão envolvidos na absorção, assimilação e mobilização de N para uma máxima eficiência de utilização, incluindo a regulação de complexos sistemas de vias metabólicas que variam entre si, em razão do armazenamento, da remobilização, da reassimilação, da reciclagem durante a fotorrespiração e da distribuição entre as vias primárias e secundárias do metabolismo (STITT et al., 2002). Em condições aeróbias do solo, o nitrato é a principal fonte de nutriente para a planta. Esse ânion atua como molécula sinalizadora que regula a expressão de genes relacionados com sua presença, o desenvolvimento radicular, expansão foliar, entre outros, a fim de balancear o metabolismo de nitrogênio e carbono, ajustando o crescimento da planta em função de sua disponibilidade (HO; TSAY, 2010). Como no sistema BIT[®] foram adicionadas, propositalmente, diferentes proporções entre nitrato e amônio, quando a disponibilidade de nitrato foi maior que de amônio, pode ter ocorrido

uma mimetização das condições do solo, propiciando uma utilização mais eficaz desse íon em detrimento ao NH_4^+ .

Em relação aos experimentos em meio semissólido, no período de 15 dias de cultivo apenas o comprimento da maior brotação apresentou médias semelhantes entre os tratamentos, a partir da utilização das diferentes relações de nitrogênio (GRÁFICO 2).

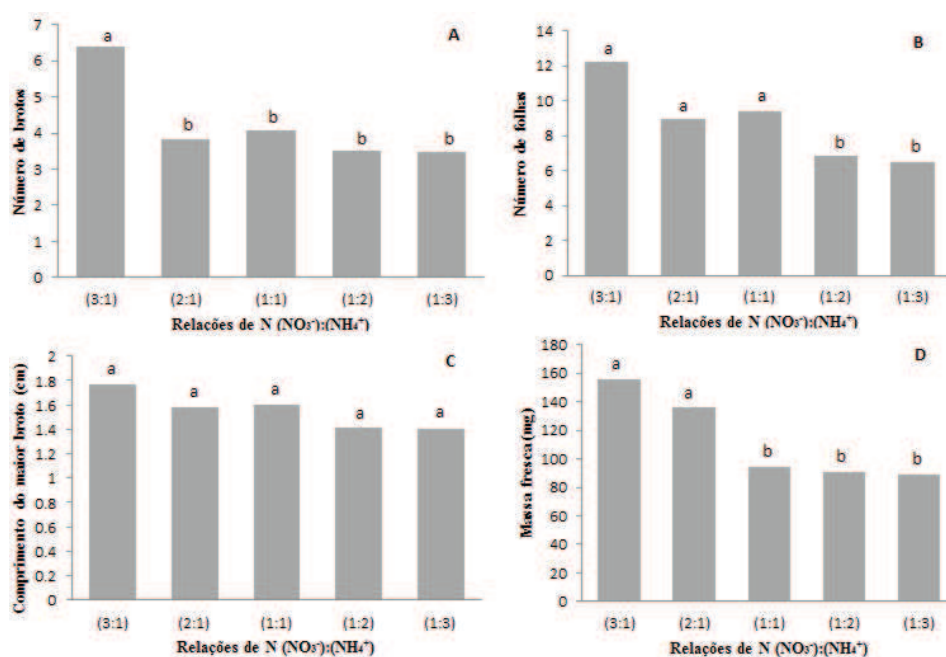


Gráfico 2 Influência das relações de nitrogênio (NO_3^-):(NH_4^+) sobre o A) número de brotos; B) número de folhas do maior broto; C) comprimento do maior broto; e D) massa fresca de explantes de *E. urograndis* cultivados em meio semissólido por um período de 15 dias. Letras diferentes sobre as colunas representam diferença estatística entre os tratamentos pelo Teste de Scott-Knott a 5% de significância.

A relação 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) foi a que propiciou o maior número médio de brotos (6,37 brotos), enquanto que, assim como no cultivo em BIT[®], a relação de 1:3 (NO_3^-):(NH_4^+) foi a que esteve quase sempre entre os tratamentos que

influenciaram de forma menos efetiva no incremento das características estudadas.

Embora as respostas ao híbrido de *E. urograndis* aos níveis mais elevados de nitrato tenham sido melhores, diferentes espécies ou até mesmo genótipos de uma mesma espécie podem apresentar diferentes respostas aos níveis de nitrato ou amônio, conforme as pressões seletivas e consequentes adaptações fisiológicas (ALLÈGRE et al., 2004; TERCÉ-LAFORGUE; MÄCK; HIREL, 2004). Kintzios, Starvropoulou e Skamneli (2004), trabalhando com dois cultivares de *Cucumis melo* L. (melão), verificaram que a melhor regeneração dos brotos do cultivar 'Daniel' foi favorecida apenas pela presença de NO_3^- . Selby e Harvey (1990) também observaram que as relações de 5:1 e 2:1 de $(\text{NO}_3^-):(\text{NH}_4^+)$ foram as mais eficientes no desenvolvimento de gemas adventícias de *Picea sitchensis* (conífera), corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

Para a massa fresca, não houve diferença entre os tratamentos 3:1 e 2:1 $(\text{NO}_3^-):(\text{NH}_4^+)$, com valores médios de 155,99 e 135,94 mg, respectivamente. Esses resultados mostram que os níveis mais elevados de nitrato, independente do sistema de cultivo, são mais eficientes em promover os incrementos das características avaliadas no híbrido comercial de *E. urograndis* em estudo.

Embora os sistemas de cultivo em BIT[®], utilizando meio líquido, e no método convencional, com meio semissólido, tenham apresentado médias semelhantes para as características estudadas, o BIT[®] torna-se mais eficiente pelo fato do meio líquido ter como vantagens a facilidade de ser preparado e manipulado e a não utilização de um agente gelificante, reduzindo, assim, os custos de produção (MCALISTER et al., 2005; PEREIRA; FORTES, 2003).

Observando os valores das médias da massa fresca das brotações, verificou-se que aquelas que foram cultivadas em BIT[®] tiveram biomassa 8,76% maior que no cultivo em meio semissólido. Esse resultado se deve,

provavelmente, a um maior contato superficial dos explantes com o meio líquido, o que leva a uma maior área de absorção e, conseqüentemente, melhor aproveitamento dos nutrientes do meio de cultivo (LEMOS et al., 2001), situação que não acontece no meio semissólido, uma vez que apenas a base dos explantes está em contato com o meio de cultivo. Oliveira et al. (2011b), trabalhando com um clone de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, também tiveram resultados mais satisfatórios com o sistema de biorreator do tipo RITA[®] em relação ao método convencional, utilizando ágar como agente gelificante, dando suporte à ideia de utilizar o biorreator BIT[®], ao invés do método convencional para cultivo do híbrido de *E. urograndis* estudado.

Nas brotações cultivadas por 30 dias em meio semissólido foi observado que os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si. A única exceção é o número de folhas do maior broto em que, como nos experimentos anteriores, as relações com níveis mais elevados de amônio promoveram as menores médias (GRÁFICO 3). Entretanto, é possível verificar que os valores médios das variáveis massa fresca e comprimento do maior broto nesse experimento foram maiores que os valores das mesmas durante o cultivo em BIT[®] e por 15 dias em meio semissólido. Essa diferença pode estar relacionada com o maior tempo que as brotações tiveram para crescer (30 dias). Além disso, por ter ocorrido formação de calos nas bases dos explantes, uma maior massa fresca era esperado.

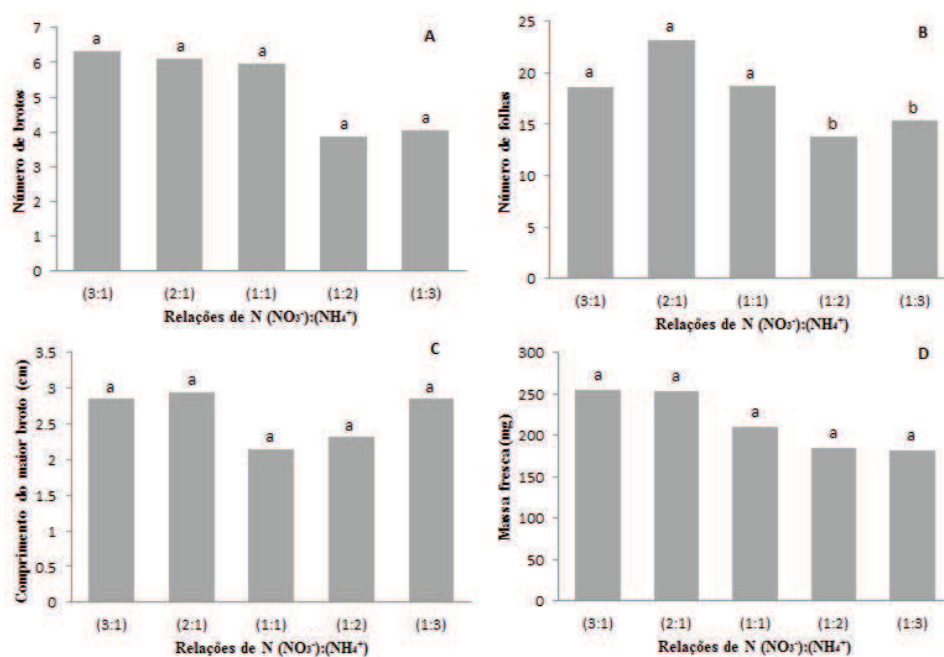


Gráfico 3 Influência das relações de nitrogênio (NO_3^-):(NH_4^+) sobre o A) número de brotos; B) número de folhas do maior broto; C) comprimento do maior broto; e D) massa fresca de explantes de *E. urograndis* cultivados em meio semissólido por um período de 30 dias. Letras diferentes sobre as colunas representam diferença estatística entre os tratamentos pelo Teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Em todos os sistemas e períodos de cultivo foi possível verificar que as brotações cultivadas nas relações 1:2 e 1:3 (NO_3^-):(NH_4^+) apresentaram aspectos morfológicos anormais. As brotações advindas do cultivo em BIT[®] nessas duas relações com maior quantidade de amônio não conseguiram se desenvolver adequadamente, apresentando poucos brotos e de comprimento reduzido (FIGURA 2, D e E); as que vieram do cultivo por 15 dias em meio semissólido também tiveram baixo crescimento e com início de formação de calos na base dos explantes, bem como uma quantidade inferior de brotos, quando comparado com a relação 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) (FIGURA 2, I e J); e as brotações cultivadas por 30 dias em meio semissólido apresentaram coloração alaranjada em toda a

extensão da região caulinar, clorose nas folhas e formação de calos na base dos explantes (FIGURA 2, N e O).

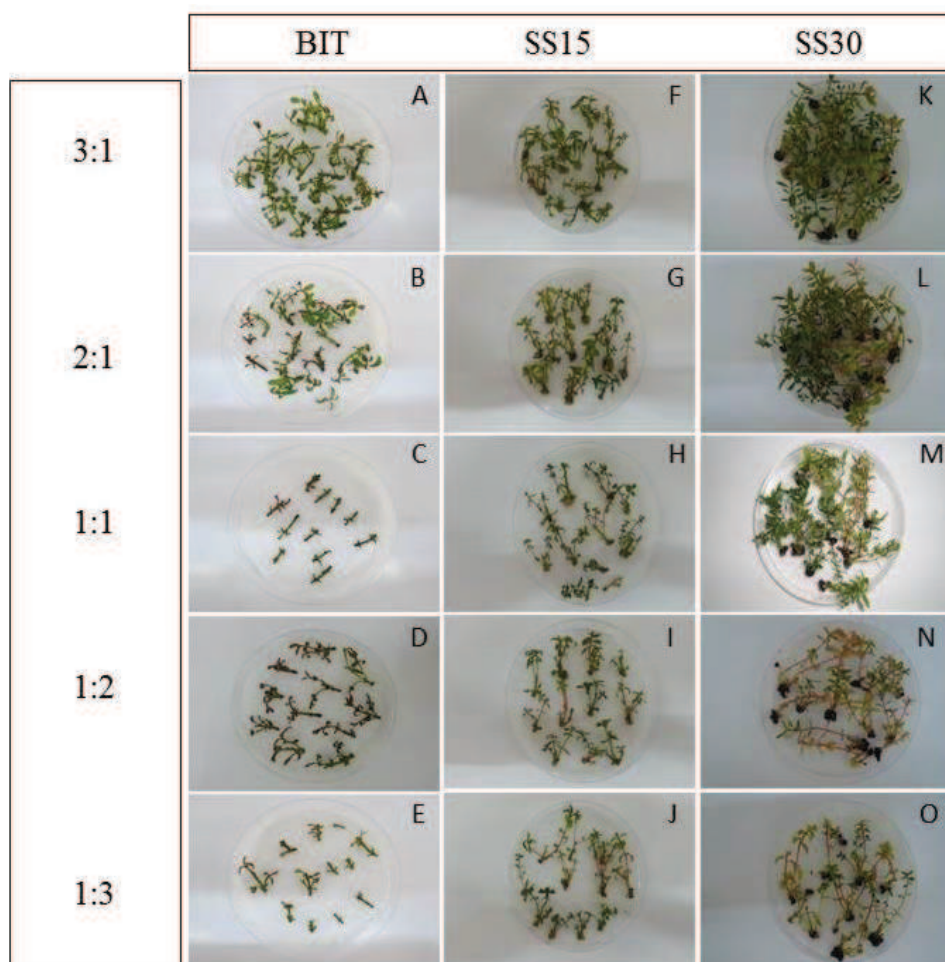


Figura 2 Brotos cultivados em diferentes relações de $(\text{NO}_3^-):(\text{NH}_4^+)$ e sob diferentes condições. De A – E cultivo em BIT[®] (BIT), F – J cultivo em meio semissólido por um período de 15 dias (SS15) e K – O cultivo em meio semissólido por um período de 30 dias (SS30). Brotos cultivados nas relações A, F e K) 3:1; B, G e L) 2:1; C, H e M) 1:1; D, I e N) 1:2; E, J e O) 1:3 de $(\text{NO}_3^-):(\text{NH}_4^+)$, respectivamente.

Embora a absorção da forma amoniacal seja mais econômica energeticamente que a nítrica, por esse íon encontrar-se na forma reduzida, altos

níveis de amônio no tecido podem causar toxidez (BRITTO; KRONZUCKER, 2002; HO; TSAY, 2010). Mesmo com seus mecanismos de toxicidade sobre as plantas não sendo entendidos completamente, a acidificação do ambiente externo, o rompimento do balanço ácido/base e a energia perdida com o excesso de exportação de amônio podem ser fatores chaves relacionados com essas respostas (HO; TSAY, 2010). Há estudos sugerindo que, como nos animais, a sensibilidade ao amônio está associada a uma redução da glicosilação proteica (QIN et al., 2008). Essas constatações explicariam melhor os sintomas observados nas brotações do híbrido em estudo, tais como crescimento reduzido, baixo número de brotos, região caulinar alaranjada e o aspecto clorótico das folhas.

Nas relações mais altas de nitrato, verificou-se que os brotos estavam com aspecto visual normal, com mais vigor, folhas verdes, não hiperídricas e com comprimento médio dos brotos acima de 1,4 cm tanto no cultivo em BIT[®] quanto pelo período de 15 dias de cultivo em meio semissólido, principalmente na relação 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) (FIGURA 2, A e F).

No cultivo por 30 dias em meio semissólido, entretanto, foi averiguada formação acentuada de calos na base dos explantes nas relações com razões mais altas de (NO_3^-):(NH_4^+). De forma geral, a formação de calos requer mais K, P e Ca que culturas organogênicas e tendem a consumir mais nitrogênio do meio (KINTZIOS; STARVROPOULOU; SKAMNELI, 2004). Como houve aumento na quantidade de KNO_3 adicionado ao meio de cultura, principalmente nas relações com níveis mais elevados de nitrato, ocorreu, provavelmente, aumento na disponibilidade de nitrogênio e potássio, os quais se acumularam na região basal e promoveram o crescimento dos calos. A formação de calos na base do explante é muito comum em espécies lenhosas, porém é considerada desfavorável na micropropagação (BASSAN et al., 2006). Erig e Schuch (2005) também relataram que a formação de calo na zona de enraizamento é

indesejável, pois ela pode afetar a qualidade das raízes, principalmente no que se refere à conexão vascular com a planta e, conseqüentemente, na absorção dos nutrientes do meio para os órgãos do vegetal.

Um fato importante a se considerar é que, como o nitrato de amônio é um composto relativamente caro, de difícil aquisição (FRÁGUAS et al., 2003; VILLA et al., 2009) e o único dentre os sais do meio MS que fornece NH_4^+ aos explantes, a sua substituição por algum outro composto pode ser uma alternativa interessante, uma vez que o efeito desse cátion no cultivo do clone de *E. urograndis* não foi benéfico. A ureia, por ser um composto nitrogenado e orgânico, poderia ser uma opção, principalmente do ponto de vista econômico, pois seu valor para aquisição é menor que o nitrato de amônio, o que acarretaria na redução de custos (VILLA et al., 2009). Portanto, estudos avaliando o efeito da adição de ureia na formulação do meio poderiam ser realizados, a fim de viabilizar essa possibilidade e verificar os efeitos desse composto no desenvolvimento do híbrido em estudo.

4 CONCLUSÃO

Níveis mais elevados de amônio em relação a nitrato no meio de cultura são tóxicos no cultivo do híbrido comercial de *E. urograndis*, ocasionando baixa produtividade no cultivo em BIT[®] e formação de plantas anormais no cultivo em meio semissólido.

A relação 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) é a mais eficiente em promover ganhos de produtividade durante cultivo por 15 dias em meio semissólido e em BIT[®].

Para o híbrido avaliado, o sistema BIT[®] se mostrou mais eficiente que o sistema semissólido, em decorrência da não utilização de agentes gelificantes e menor necessidade de manipulação do material vegetal.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, D. et al. Factors affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, New York, v. 48, n. 5, p. 521-529, 2012.

ALLÈGRE, A. et al. Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: a possible role in tolerance to long-term root anoxia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 408, p. 2625-2634, Dec. 2004.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico**: ano base 2012. Brasília, 2013. 148 p. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/estatisticas.asp>>. Acesso em: 9 jan. 2014.

BASSAN, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de Canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.

BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 159, n. 6, p. 567-584, 2002.

CASTRO, D. R.; GONZÁLEZ, J. O. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. **Agricultura Técnica**, Chillán, v. 62, n. 1, p. 68-78, 2002.

CRUZ, J. L.; PELACANI, C. R.; ARAÚJO, W. L. Efeito do nitrato e amônio sobre o crescimento e eficiência de utilização do nitrogênio em mandioca. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 3, p. 467-475, 2006.

DOMINGUEZ-VALDIVIA, M. D. et al. Nitrogen nutrition and antioxidant metabolism in ammonium-tolerant and -sensitive plants. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 132, n. 3, p. 359-369, 2008.

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

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de Framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 3, p. 488-490, 2005.

FERREIRA, D. F. A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FRÁGUAS, C. B. et al. Micropropagação de gloxínia em diferentes concentrações de nitrato de amônio e uréia. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 811-815, jul./ago. 2003.

HO, C. H.; TSAY, Y. F. Nitrate, ammonium and potassium sensing and signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, n. 5, p. 604-610, Oct. 2010.

IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Nitrogen source, concentration, and $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, n. 2, p. 167-174, 2009.

JESUS, G. L. et al. Doses e fontes de nitrogênio na produtividade do eucalipto e nas frações da matéria orgânica em solo da região do cerrado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 36, n. 1, p. 201-214, 2012.

KINTZIOS, S.; STARVROPOULOU, E.; SKAMNELI, S. Accumulation of selected macronutrients and carbohydrates in melon tissue cultures: association

with pathways of in vitro dedifferentiation and differentiation (organogenesis, somatic embryogenesis). **Plant Science**, Clare, v. 167, n. 3, p. 655-664, 2004.

KOVÁČIK, J.; BAČKOR, M. Changes of phenolic metabolism and oxidative status in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 297, n. 1/2, p. 255-265, 2007.

KOVÁČIK, J.; KLEJDUS, B. Induction of phenolic metabolites and physiological changes in chamomile plants in relation to nitrogen nutrition. **Food Chemistry**, Oxford, v. 142, n. 1, p. 334-341, 2014.

LEA, U. S. et al. Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, n. 3, p. 1085-1094, Mar. 2006.

LEMOS, E. E. P. de et al. Micropropagação de clones de Banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482-487, 2001.

MCALISTER, B. et al. Use of temporary immersion bioreactor system (RITA[®]) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, n. 3, p. 347-358, 2005.

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

OLIVEIRA, L. A. et al. Reference genes for the normalization of genes expression in *Eucalyptus* species. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 405-422, Feb. 2012.

OLIVEIRA, M. L. de et al. Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla* em

biorreator de imersão temporária. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 6, p. 1207-1217, 2011a.

OLIVEIRA, M. L. de et al. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 39, n. 91, p. 309-315, 2011b.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, set. 2003.

QIN, C. et al. GDP-mannose pyrophosphorylase is a genetic determinant of ammonium sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 47, p. 18308-18313, 2008.

SELBY, C.; HARVEY, B. M. R. The influence of composition of the basal medium on the growth and morphogenesis of cultured sitka spruce (*Picea sitchensis*) tissues. **Annals of Botany**, Oxford, v. 65, n. 4, p. 395-407, 1990.

STITT, M. et al. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 959-970, 2002.

TERCÉ-LAFORGUE, T.; MÄCK, G.; HIREL, B. New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown under different nitrogen regimes. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 120, n. 2, p. 220-228, Feb. 2004.

VILLA, F. et al. Utilização de nitrato de amônio e de uréia como fontes de nitrogênio na micropropagação de amoreira-preta. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 5, p. 365-370, 2009.

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

**Artigo 2 ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO DE
MULTIPLICAÇÃO EM BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA
DE UM HÍBRIDO COMERCIAL DE *Eucalyptus urograndis***

RESUMO

Os biorreatores são equipamentos utilizados como alternativa à micropropagação convencional, pela otimização do processo e redução dos custos, principalmente, com agentes gelificantes e mão de obra especializada. A utilização desse sistema está se tornando uma tendência para as biofábricas, as quais produzem mudas em escala comercial e têm gastos elevados com o processo convencional. Entretanto, para ocorrer substituição do sistema convencional pelo sistema baseado em biorreatores são necessários estudos envolvendo a otimização de protocolos de cultura de tecidos para as espécies de interesse, como é o caso das espécies do gênero *Eucalyptus*. Neste trabalho, objetivou-se identificar e avaliar diferentes meios de cultura, tipos de citocinina e o período de cultivo adequado na multiplicação em biorreator de imersão temporária (BIT[®]) de um híbrido comercial de *E. urograndis*. Foram avaliados três meios de cultura na forma líquida, o MS modificado com a proporção 3:1 (NO₃⁻):(NH₄⁺), o WPM e JADS. As citocininas avaliadas foram a BAP, a KIN e o TDZ, todas fornecidas em concentração equimolar de 0,14 µM. Os períodos de cultivo avaliados foram: 40 dias de cultivo com renovação do meio aos 20 dias; 60 dias de cultivo com renovação do meio aos 30 dias; e 80 dias de cultivo com renovação do meio aos 40 dias. Os meios líquidos utilizados neste trabalho foram suplementados com auxina e 20 g.L⁻¹ de sacarose. As variáveis analisadas em todos os experimentos foram o número de brotos, número de folhas do maior broto, comprimento do maior broto e massa fresca dos explantes. O meio MS modificado foi o que apresentou melhor resultado entre as variáveis analisadas, assim como a citocinina BAP e o período de 40 dias de cultivo com renovação do meio aos 20 dias. Recomenda-se para a multiplicação em BIT[®] do híbrido comercial de *E. urograndis* o meio MS modificado com a proporção de 3:1 (NO₃⁻):(NH₄⁺) e suplementado com 0,14 µM de BAP. Em relação ao período de cultivo, ajustes podem ser realizados para a obtenção de resultados mais promissores.

Palavras-chave: Silvicultura clonal. Sistema automatizado. Citocininas. Período de cultivo.

ABSTRACT

Bioreactors are equipments used as an alternative to micropropagation due to process optimization and cost reduction, especially with gelling agents and skilled labor. Use of this system is becoming a trend for bio-factories, which produce seedlings on a commercial scale and have high expenses to the conventional process. However, studies involving the protocol optimization of plant tissue culture are needed for the interest species in order to replace the conventional system by bioreactor-based system. The objective this study was to identify and evaluate different culture media, types of cytokinin and appropriate period of cultivation for multiplication in a temporary immersion bioreactor (TIB) of an *E. urograndis* commercial hybrid. Three culture media were evaluated: the MS modified with ratio 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+), WPM and JADS . The cytokinins tested were BAP, KIN and TDZ, all supplied in equimolar concentration of 0.14 μM . The cultivation periods assessed were: 40 days with medium renewal at 20 days, 60 days of culture with medium renewal at 30 days and 80 days of culture with medium renewal at 40 days. All liquid media used in this study were supplemented with auxin and 20 g.L^{-1} of sucrose. The variables analyzed in all experiments were shoots number, leaves number of the sprout with greater length, the highest length shoot and fresh weight. The modified MS medium showed the best results among the variables analyzed as well as the BAP cytokinin and the period of 40 days of cultivation with medium renewal at 20 days. It is recommended to use modified MS medium with a ratio 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) and supplemented with 0.14 μM BAP. Adjustments can be done regarding the cultivation period in order to obtain better results for multiplication in TIB of this *E. urograndis* commercial hybrid.

Key-words: Clonal forestry. Automated system. Cytokinins. Cultivation period

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* inclui grande parte das espécies florestais utilizadas no estabelecimento de plantações em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo (DIBAX et al., 2010). Quando comparado com outras espécies florestais, visando a atender a crescente demanda de madeira destinada aos mais diversos setores da cadeia produtiva florestal, o eucalipto se destaca pela qualidade de sua madeira e, principalmente, pelo seu rápido crescimento no campo, o que possibilita ciclos menores para as florestas plantadas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2013).

Para a propagação vegetativa de *Eucalyptus* spp., o método clássico de miniestaquia é o mais utilizado. Entretanto, para algumas espécies, esse método promove o baixo índice de enraizamento em função do acúmulo de inibidores (ANDRADE; ALMEIDA; GONÇALVES, 2006). A micropropagação aparece como alternativa viável para a multiplicação de indivíduos que apresentam baixa taxa de enraizamento no sistema convencional, visto que promove um rejuvenescimento do material e, conseqüentemente, uma maior eficiência no processo de enraizamento. Pode também ser utilizada para a produção de mudas em curto espaço de tempo, aplicável principalmente para aquelas situações onde novos materiais são gerados pelos programas de melhoramento das empresas e precisam ser disponibilizados em escala para entrarem no sistema de produção.

Embora eficiente para promover a clonagem rápida e melhor enraizamento dos materiais, a multiplicação *in vitro* apresenta como restrição, em relação ao método convencional, os elevados custos com agentes gelificantes e, principalmente, com mão de obra necessária para executar os procedimentos de micropropagação. Os biorreatores têm surgido como alternativa tecnológica a esse método convencional, visando à otimização do processo (OLIVEIRA;

MEDEIROS FILHO; BEZERRA, 2011). Esses equipamentos auxiliam no ganho de biomassa dos tecidos vegetais aliado à redução do período necessário para propagação (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). Esses incrementos são possíveis, em razão do maior contato das brotações com o meio de cultura e, conseqüentemente, maior absorção dos nutrientes (PEREIRA; FORTES, 2003).

O desenvolvimento *in vitro* de células e tecidos depende da interação combinada de fatores intrínsecos (genótipo, idade, tipo de explante, condições fisiológicas) e fatores extrínsecos (composição do meio de cultura, reguladores de crescimento, temperatura, luminosidade, período de cultivo, entre outros) (PINTO et al., 2008). Para *Eucalyptus*, a proliferação de gemas pré-formadas tem sido a forma mais utilizada de micropropagação, por ser mais simples que outros sistemas de propagação *in vitro*, tais como a embriogênese somática e a organogênese adventícia (GOMES; CANHOTO, 2003).

De acordo com estudos prévios, os meios MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), JADS (CORREIA et al., 1995) e *Woody Plant Medium* (LLOYD; MCCOWN, 1981) são os meios nutritivos mais comumente usados para as espécies de *Eucalyptus* (BRONDANI et al., 2012; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009), mas novos estudos devem ser realizados para avaliar qual das formulações melhor se adequa especificamente a cada espécie, híbrido ou clone desse gênero. Além da constituição do meio de cultivo, estudos relacionados ao entendimento da interação entre regulador de crescimento e a espécie são de grande importância, principalmente quando se objetiva aumentar a eficiência durante a etapa de multiplicação *in vitro*. Estes estudos são necessários pelo fato de estarem associados com as respostas morfogenéticas *in vitro* do material vegetal (GARCIA et al., 2011).

Dentre os reguladores de crescimento utilizados *in vitro*, as citocininas são uma classe que vem sendo considerada indispensável para quebrar a inibição

correlativa e induzir a proliferação de gemas axilares. Entre as diversas citocininas disponíveis comercialmente, o tipo e a concentração são os fatores que mais influenciam na eficiência da multiplicação *in vitro* (BRONDANI et al., 2009). Apenas a composição do meio e os reguladores de crescimento, entretanto, não bastam para se obter quantidade e qualidade de material vegetal ao término do processo. O período de cultivo também está entre os fatores que afetam o processo de micropropagação, pois, a partir da avaliação de diferentes intervalos de tempo, é possível determinar qual o momento mais adequado para retirar as plântulas do cultivo com padrões morfológicos desejados (OLIVEIRA; MEDEIROS FILHO; BEZERRA, 2011).

Nesse contexto, objetivou-se, neste trabalho, definir o meio de cultura, o tipo de citocinina e o período mais adequado de cultivo em biorreator de imersão temporária (BIT[®]) de um híbrido comercial de *Eucalyptus urograndis*, visando a obter um protocolo específico de multiplicação *in vitro* desse híbrido.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento do material vegetal

O material vegetal foi obtido a partir de matrizes de um híbrido comercial de *E. urograndis* proveniente de um viveiro comercial localizado no município de Lavras – MG.

Brotos advindos das matrizes clonais foram excisados e desinfestados utilizando pastilhas de paraformaldeído, por 40 minutos. Em câmara de fluxo laminar horizontal, regiões apicais caulinares foram isoladas e inoculadas em placas de Petri (90 x 15 mm), contendo 25,0 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 20,0 g.L⁻¹ de sacarose e solidificado com 1,7 g.L⁻¹ de Phytigel® (SIGMA). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C por 20 minutos. A inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar horizontal e os explantes permaneceram durante cinco dias no escuro. Após esse período, os explantes foram transferidos para meio MS modificado suplementado com auxina e citocinina nas mesmas condições anteriores. O material vegetal foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, irradiância de 40 µmol.m⁻².s⁻¹ fornecida por luz fluorescente branca fria e temperatura de 26 ± 2 °C, permanecendo nessa condição por um período de 40 dias.

2.2 Cultivo em biorreator de imersão temporária (BIT®)

Um biorreator de imersão temporária (BIT®), desenvolvido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, acoplado a um chassi pneumático modelo MFE – 1001 (Fitoclone, Viçosa, MG, Brasil) foi utilizado na execução dos experimentos (FIGURA 1). O ciclo de imersão temporária foi controlado

por um sistema eletrônico (temporizador), configurado nas seguintes condições: troca do meio de cultura entre os frascos a cada 2,0 horas, contato do meio de cultura com os explantes por 10 segundos e injeção de ar para renovação do ambiente atmosférico *in vitro* a cada 1,0 hora. A injeção de ar foi efetuada por meio da passagem por filtros (autoclaváveis) com poros de $0,20\ \mu\text{m}$ para esterilização. Os frascos de cultivo foram esterilizados quimicamente, permanecendo 12 horas com uma solução de hipoclorito de sódio comercial diluída a $0,036\%$ (m/v) de cloro ativo. Todos os meios de cultura utilizados no biorreator tiveram o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, a $121\ ^\circ\text{C}$, por 20 minutos. O biorreator contendo o material vegetal foi mantido em sala de crescimento com temperatura de $26 \pm 2\ ^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e irradiância de $40\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas, também pelo sistema eletrônico.

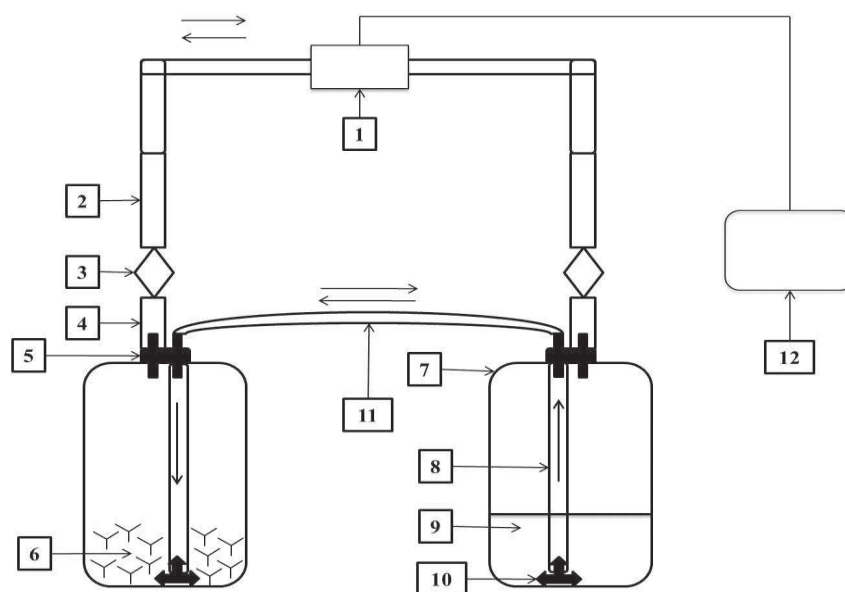


Figura 1 Diagrama do biorreator de imersão temporária com sistema de injeção de ar. 1 válvula solenoide, 2 tubo de borracha, 3 filtro de ar de $0,2\ \mu\text{m}$, 4 tubo de borracha de silicone, 5 tampa com ductos, 6 material vegetal, 7 frasco de cultivo de 5,0 L, 8 tubo de borracha de silicone, 9 Meio de cultura, 10 conexão tipo T, 11 tubo de borracha de silicone, 12 compressor de ar. Fonte: Fitoclone (modificado).

2.3 Meios de cultura MS modificado, WPM e JADS no cultivo em BIT[®]

Com a finalidade de avaliar a influência do meio de cultura na multiplicação em BIT[®], as brotações previamente estabelecidas *in vitro* foram utilizadas como fontes de explantes. Estes consistiram de regiões caulinares contendo dois segmentos nodais, as quais foram inoculadas nos frascos do biorreator contendo 400,0 mL de meio de cultura. Os três meios líquidos utilizados foram o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado com a proporção 3:1 (NO₃⁻):(NH₄⁺), previamente escolhido em experimentos anteriores, o meio JADS (CORREIA et al., 1995) e o meio *Woody Plant Medium* (LLOYD; MCCOWN, 1981). Os meios foram suplementados com auxina, citocinina e 20 g.L⁻¹ de sacarose. A inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar horizontal e o material vegetal mantido conforme condições estabelecidas para o cultivo em BIT[®].

Após 18 dias de cultivo, foram analisadas as variáveis número de brotos, comprimento do maior broto, massa fresca e o número de folhas do maior broto. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 30 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante caulinar contendo dois segmentos nodais.

2.4 Multiplicação em BIT[®] a partir da adição de diferentes citocininas

A partir da seleção do meio de cultura mais adequado no experimento anterior foi avaliado o efeito de diferentes tipos de citocinina na multiplicação do híbrido comercial de *E. urograndis*. As brotações previamente estabelecidas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes. Os explantes, constituídos por regiões caulinares com dois segmentos nodais, foram inoculados nos frascos do biorreator, contendo 400,0 mL do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962)

modificado com a proporção 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) acrescido de auxina e 20 g.L^{-1} de sacarose. Os tratamentos consistiram na utilização das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), tidiazuron (TDZ) e cinetina (KIN). Independente da citocinina, a concentração fornecida foi de $0,14 \mu\text{M}$, além de um tratamento controle sem adição de citocininas. A inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar horizontal e o material vegetal mantido conforme condições estabelecidas para o cultivo em BIT[®].

Após 19 dias de cultivo, foram analisadas as mesmas variáveis do experimento anterior. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 21 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante caulinar contendo dois segmentos nodais.

2.5 Período de cultivo das brotações de *E. urograndis* em BIT[®]

A partir da seleção do meio de cultura e da citocinina no experimento anterior, buscou-se avaliar a influência de diferentes períodos de cultivo do clone de *E. urograndis*. Brotações previamente estabelecidas *in vitro* foram utilizadas como fontes de explantes e estes consistiram de regiões caulinares contendo dois segmentos nodais. O material vegetal foi inoculado em frascos do biorreator contendo $400,0 \text{ mL}$ do meio basal MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado com a proporção 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) acrescido de auxina, citocinina e 20 g.L^{-1} de sacarose. A inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar horizontal e o material vegetal mantido conforme condições estabelecidas para o cultivo em BIT[®].

Os três períodos de cultivo das brotações em BIT[®] avaliados foram: 40 dias de cultivo com renovação do meio de cultura aos 20 dias; 60 dias de cultivo com renovação do meio de cultura aos 30 dias; 80 dias de cultivo com renovação do meio de cultura aos 40 dias.

Após os períodos de cultivo, foram avaliadas as mesmas variáveis dos dois experimentos anteriores. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 25 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por um explante caulinar contendo dois segmentos nodais.

2.6 Análise anatômica

As brotações cultivadas no meio de cultura MS 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+), contendo as diferentes citocininas, tiveram as folhas coletadas para a realização de análise histológica. As folhas foram oriundas das seguintes condições de cultivo: brotações cultivadas em BIT[®] em ausência de citocinina (controle) e em presença das citocininas BAP, TDZ e KIN.

As amostras foliares foram fixadas em FAA 70 (JOHANSEN, 1940), sendo, posteriormente, armazenadas em álcool etílico a 70% (v/v). O material foi desidratado em série etílica (80, 90 e 100% por 1 hora cada, repetindo a concentração etílica de 100%). Posteriormente, as amostras foram infiltradas durante 24 horas com solução 1:1 de resina epoxi (Historesin[®] Leica) e etanol, e depois disso, transferidas para resina pura, onde permaneceram por 48 horas. Após infiltração, as amostras foram emblocadas na proporção 15:1 de resina + polimerizador em cápsulas cilíndricas dissolvíveis em água. As amostras ficaram em forno (HL-2000 HybriLinker) a 37°C por, aproximadamente, 72 horas. Cortes transversais com espessuras de 3,0 µm foram realizados em micrótomo semiautomático (Easypath EP-31-20091), fixados em lâminas de vidro, corados com solução safrablau (safranina 0,1% + azul de astra 1%) (KRAUS; ARDUIN, 1997) e, posteriormente, visualizados em microscópio de luz (Zeiss, Axio Scope).

Após a obtenção das imagens, estas foram analisadas utilizando o software UTHSCSA ImageTool for Windows, versão 3.0 (WILCOX et al.,

1995). As variáveis avaliadas foram as espessuras da epiderme adaxial, da folha, do mesofilo, do parênquima paliçádico e do parênquima esponjoso.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo utilizada uma folha de cada tratamento para confecção das lâminas, cinco cortes transversais por lâmina e duas lâminas por tratamento, totalizando 10 repetições por tratamento. De cada corte foram selecionados três campos para medição das variáveis.

2.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas a partir da submissão dos dados à análise de variância (ANOVA), utilizando o software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011), e as médias comparadas, utilizando o teste de Tukey a 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa, utilizando o sistema de biorreatores para a multiplicação de eucalipto, ainda é incipiente e, dessa forma, existem poucas informações disponíveis acerca do efeito de diferentes composições de meio de cultura em sistema de biorreator (OLIVEIRA et al., 2011). Assim, a discussão do presente trabalho se baseou na utilização de cultivos em meio semissólido.

Houve diferença estatística entre os três meios de cultura para todas as variáveis analisadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. O meio MS modificado com a proporção de 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) foi o que demonstrou melhores resultados para todas as características estudadas (GRÁFICO 1).

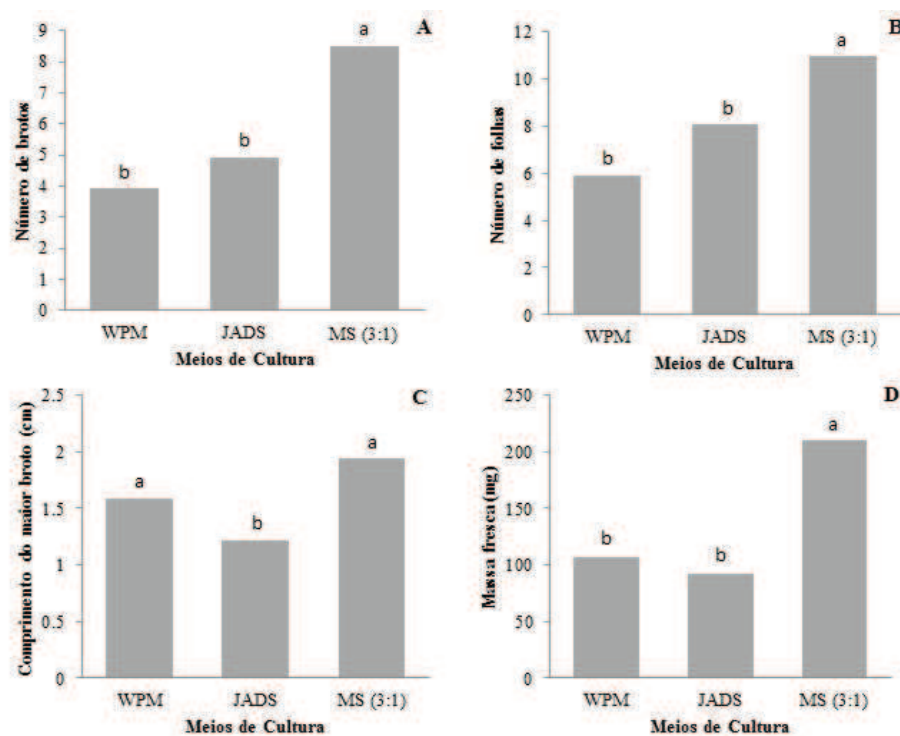


Gráfico 1 Influência dos meios de cultura WPM, JADS e MS modificado com a proporção 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) sobre o A) número de brotos; B) número de folhas do maior broto; C) comprimento do maior broto; e D) massa fresca de *E. urograndis* cultivados em BIT[®] por 18 dias.

A média das variáveis obtida durante cultivo em meio MS modificado foi de 8,5 brotos, 11,0 folhas no maior broto, comprimento de 1,94 cm do maior broto e massa fresca de 210, 28 mg dos explantes. O meio de cultura MS tem apresentado melhores resultados no cultivo, regeneração e multiplicação de *Eucalyptus* spp., em relação aos meios JADS e/ou WPM em uma série de outros trabalhos (BORGES et al., 2011; BRONDANI et al., 2009; DIBAX et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011), bem como em trabalhos envolvendo embriogênese somática com *Eucalyptus* sp. (PINTO et al., 2008), técnica bastante utilizada com o intuito de propagar em larga escala espécies de interesse.

As brotações advindas do meio MS modificado com a proporção 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) apresentaram, visualmente, maior vigor, folhas mais verdes, caule robusto e maior padrão de uniformidade em relação às brotações cultivadas no meio JADS, as quais apresentaram comprimento reduzido dos brotos e maior desuniformidade entre as brotações. Alterações na morfologia das brotações cultivadas em meio WPM também foram observadas. Estas apresentaram caules retorcidos, de coloração avermelhada e uma baixa quantidade de folhas (FIGURA 2).

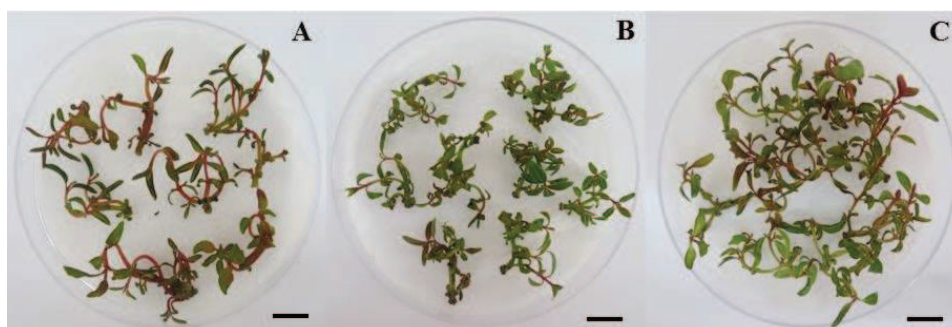


Figura 2 Aspecto das brotações do clone de *E. urograndis* cultivadas por 18 dias em BIT[®] em três meios de cultura distintos. Os meios de cultura utilizados foram o A) WPM; B) JADS; e C) MS modificado com a proporção 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+). Barras = 10 mm.

O meio MS é frequentemente relatado como um meio salino muito rico em nutrientes, principalmente em nitrogênio, enquanto que o WPM tem níveis mais baixos desse elemento (PINTO et al., 2008). Além disso, proporções adequadas de $(\text{NO}_3^-):(\text{NH}_4^+)$ estimulam a morfogênese do material vegetal (RAMAGE; WILLIAMS, 2002), sendo que a relação ótima entre esses íons é dependente da espécie (PINTO et al., 2008). Isso sugere que as respostas podem não ter sido semelhantes entre os meios, em razão da menor disponibilidade de N no meio WPM, o que é coerente com os resultados obtidos no presente trabalho, indicando que a relação 3:1 $(\text{NO}_3^-):(\text{NH}_4^+)$ do meio MS modificado pode ter sido a mais adequada para o híbrido comercial de *E. urograndis*. Oliveira et al. (2011), trabalhando com clones de *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla* verificaram que brotações cultivadas em meio WPM também apresentaram coloração avermelhada dos caules e calosidades nas folhas, sendo o meio MS superior no cultivo desse híbrido.

O meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995) foi formulado com reduções significativas na concentração dos sais minerais, principalmente de íons potássio, quando comparado ao meio MS, e, ainda assim, apresentou resultados positivos no trabalho desse autor no cultivo de *E. grandis*. Entretanto, essa diferença na composição dos meios de cultura pode ter sido crucial para uma resposta menos eficiente dos brotos cultivados no meio JADS, em comparação aos cultivados em meio MS modificado com a relação 3:1 $(\text{NO}_3^-):(\text{NH}_4^+)$ para o híbrido comercial de *E. urograndis* avaliado neste experimento.

Brondani et al. (2012), trabalhando com clones de *E. benthamii*, obtiveram resultados contrários aos encontrados no presente trabalho, em que o meio WPM foi o mais eficiente em promover aumento na multiplicação de gemas adventícias em comparação ao MS, com este último resultando em clorose intensa e posterior necrose das folhas. Esses resultados apenas confirmam que a composição nutricional do meio de cultura é um fator de

grande importância na resposta do material vegetal durante o cultivo, com especificidades para cada espécie.

No experimento, visando a avaliar a eficiência de citocininas, houve diferença estatística, de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância, para todas as características analisadas, com exceção da massa fresca dos brotos. O TDZ esteve sempre entre as menores médias para as características analisadas (GRÁFICO 2).

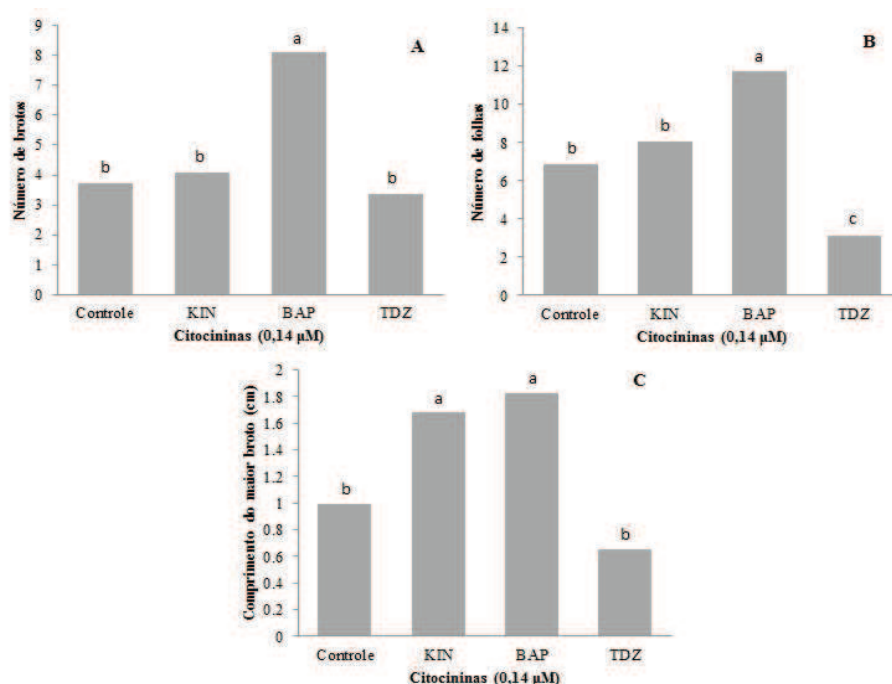


Gráfico 2 Influência de diferentes citocininas e do controle (ausência de citocinina) sobre o A) número de brotos; B) número de folhas do maior broto; e C) comprimento do maior broto em explantes de *E. urograndis* cultivados em biorreator de imersão temporária.

O BAP foi a citocinina que apresentou as maiores médias, porém sem diferença significativa em relação a KIN para o comprimento do maior broto. Essa citocinina está diretamente relacionada com a divisão celular, favorecendo o desenvolvimento de brotos laterais (ANDRADE; ALMEIDA; GONÇALVES,

2006), enquanto a KIN apresenta, além da capacidade de divisão, a de aumentar o número de microtubos na célula (ROMANOV et al., 2000), o que pode favorecer o alongamento em detrimento à produção de novas brotações.

As brotações cultivadas em presença de BAP foram as que apresentaram características morfológicas mais adequadas durante o cultivo em BIT[®], com brotos de maior padrão de qualidade e quantidade, folhas verdes, caule espesso e sem hiperidricidade (FIGURA 3D). Oliveira et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes, em que brotações de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivadas em meio com baixa concentração de BAP também não apresentaram sintomas de hiperidricidade no cultivo em biorreator do tipo RITA[®]. Os explantes oriundos do cultivo em presença de KIN, entretanto, apresentaram uma quantidade menor de brotos, caules mais finos, translúcidos e folhas de aspecto hiperídrico (FIGURA 3C).

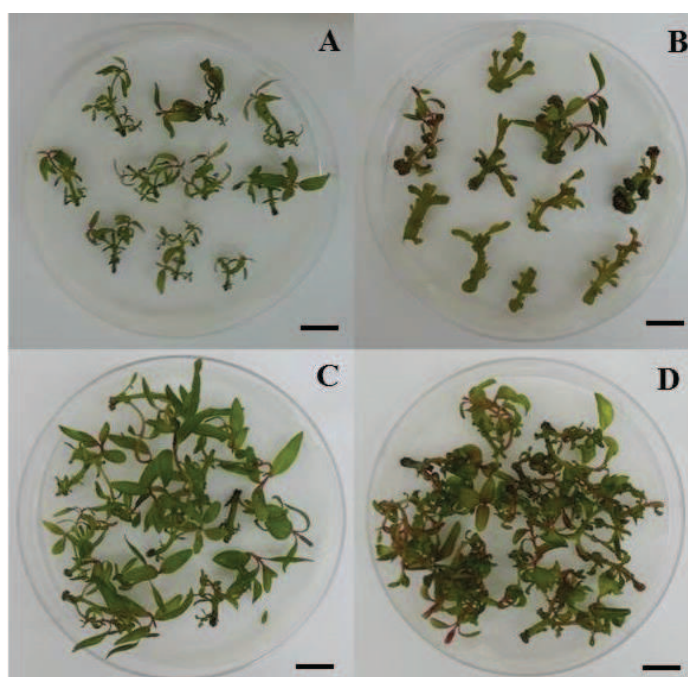


Figura 3 Aspecto morfológico das brotações de *E. urograndis* cultivadas em BIT[®] sobre influência de diferentes citocininas. A) Controle (ausência de citocininas); B) TDZ; C) KIN; e D) BAP. Barras = 10 mm.

Partes aéreas de plantas hiperídricas normalmente apresentam caules e folhas túrgidas, espessas, enrugadas, translúcidas, rígidas e facilmente quebráveis (KEVERS et al., 2004; PICOLI et al., 2001), além de encurtamento dos nós e acúmulo excessivo de água (VASCONCELOS et al., 2012). Estas características visuais foram também observadas nas brotações cultivadas em meio contendo TDZ para cultivo do híbrido comercial estudado (FIGURA 3B). Essa citocinina foi a menos efetiva para todas as características avaliadas, culminando na formação de brotos anormais, de tamanho reduzido, folhas pouco desenvolvidas, hiperídricas e formação de calos tanto na região caulinar quanto foliar. Resultados semelhantes foram observados por Ivanova e Staden (2011), trabalhando com *Aloe polyphylla*, em que o emprego de TDZ levou a formação frequente de calos, folhas com morfologia anormal e brotos de tamanho reduzido e de aspecto hiperídrico. O aparecimento dessa desordem, bem como das características ligadas a ela, são um dos problemas mais importantes na micropropagação em larga escala de plantas, podendo levar a perdas de até 70% do material vegetal ao final do processo (FRÁGUAS; DORNELLES; LIMA, 2009).

Em relação às características anatômicas, alterações relacionadas com a hiperidricidade podem acontecer ao nível do mesofilo e das células envolvidas em sua constituição. Geralmente, o mesofilo apresenta aspecto vacuolado e esponjoso, com muitos espaços intercelulares (VASCONCELOS et al., 2012). Além disso, uma baixa relação no número de células/ área celular pode ser visualizada, sugerindo que o espessamento foliar seja resultado do incremento no tamanho das células do mesofilo (KEVERS et al., 2004). Dessa forma, estudar e avaliar o espessamento das células do mesofilo se mostra interessante na identificação de plantas com aspectos hiperídricos.

De acordo com a ANAVA para as análises referentes à anatomia das folhas, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre as citocininas para todas as variáveis analisadas (TABELA 1).

Tabela 1 Resumo da ANAVA para as espessuras da folha (EF), do mesofilo (EM), da epiderme adaxial (EAd), do parênquima paliçádico (PP) e do parênquima esponjoso (PE) durante o cultivo em BIT[®] de um híbrido comercial de *E. urograndis* sob influência de diferentes tipos de citocininas.

FV	GL	Quadrado médio				
		EF	EM	EAd	PP	PE
Citocinina	3	2543,47**	3408,72***	27,88*	1049,51***	901,63**
Erro	36	385,10	280,52	5,35	46,13	170,79
C.V. (%)		10,27	10,88	12,35	11,72	12,97

*Significativo ao nível de 5%. **Significativo ao nível de 1%. ***Significativo ao nível de 0,1%. As siglas FV e GL representam a fonte de variação e o grau de liberdade, respectivamente.

O BAP foi a citocinina que apresentou as maiores médias para as espessuras da folha, do mesofilo, do parênquima paliçádico e do parênquima esponjoso. O TDZ e a KIN, entretanto, apresentaram médias superiores para a espessura da epiderme adaxial (TABELA 2).

Tabela 2 Médias das espessuras da folha (EF), do mesofilo (EM), da epiderme adaxial (EAd), do parênquima paliçádico (PP), do parênquima esponjoso (PE) e da relação entre parênquima esponjoso e paliçádico (PE/PP) durante o cultivo em BIT[®] de um híbrido comercial de *E. urograndis* sob influência de diferentes tipos de citocininas.

Citocininas	EF	EM	EAd	PP	PE	PE/PP
Controle	182,23 b	149,27 b	17,39 bc	54,12 b	99,44 ab	1,84
TDZ	184,20 b	142,03 b	20,06 ab	52,69 b	93,94 b	1,78
KIN	182,91 b	143,38 b	20,28 a	51,71 b	95,09 b	1,84
BAP	214,97 a	181,28 a	17,18 c	73,23 a	114,55 a	1,56

*Letras iguais nas colunas não são diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Em folhas compactas hiperídricas é possível encontrar uma camada de células paliçádicas pouco diferenciadas, enquanto que nas folhas lacunosas hiperídricas a diferenciação em tecido paliçádico é reduzida, com aumento dos espaços intercelulares e da extensão do parênquima esponjoso (PICOLI et al., 2001). Essas informações são condizentes com os resultados obtidos no presente trabalho, uma vez que as brotações advindas do cultivo em meio de cultura, contendo BAP (FIGURA 4B), tiveram suas folhas relativamente normais, enquanto que as folhas dos demais tratamentos apresentaram maior quantidade de espaços intercelulares, evidenciado pela maior razão existente entre as espessuras do parênquima esponjoso e paliçádico (PE/PP) (FIGURA 4 – A, C e D), se comportando, aparentemente, como folhas lacunosas hiperídricas. Além disso, é possível verificar a presença de irregularidades na extensão da epiderme abaxial das folhas hiperídricas das brotações cultivadas em presença de TDZ, com estômatos acima do nível das células epidérmicas “ordinárias” (FIGURA 4D).

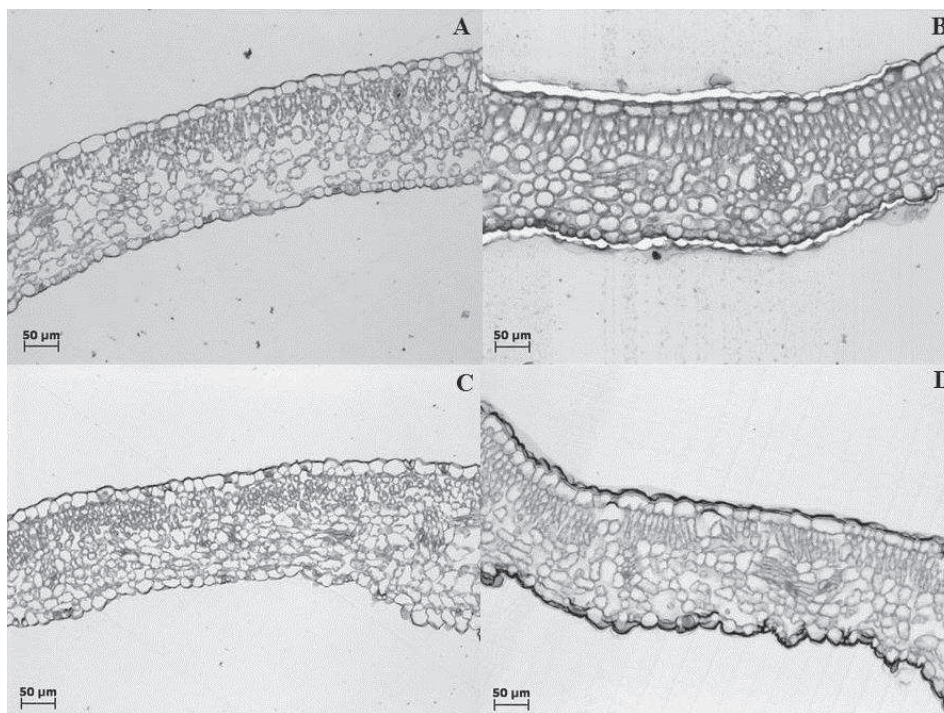


Figura 4 Fotomicrografias de cortes transversais do mesofilo de brotações cultivadas sob influência de diferentes citocininas em BIT[®]. A) ausência de citocinina (Controle), B) BAP, C) KIN e D) TDZ por um período de 19 dias.

Outros estudos têm relatado o aparecimento dessa desordem (hiperidricidade) na multiplicação de algumas espécies cultivadas na presença de TDZ (BOSELA; MICHLER, 2008; SUNAGAWA et al., 2007), mostrando que a utilização dessa citocinina é inadequada também para o híbrido comercial avaliado neste trabalho.

Com relação ao período de cultivo, a manutenção dos explantes no sistema de biorreator por 60 e 80 dias de cultivo teve que ser abortada antes do período final do experimento, pois os explantes não estavam resistindo ao estresse causado pelos períodos pré-determinados. O tratamento de 60 dias teve a renovação do meio aos 30 dias e foi cultivado por mais 20 dias após a

renovação do meio, totalizando 50 dias de cultivo, enquanto que o tratamento de 80 dias de cultivo foi abortado aos 40 dias, sem renovação do meio.

Observou-se que o período de 40 dias de cultivo com renovação do meio aos 20 dias foi o que apresentou melhores resultados para todas as características analisadas, com diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância (GRÁFICO 3), exceto para o número de folhas.

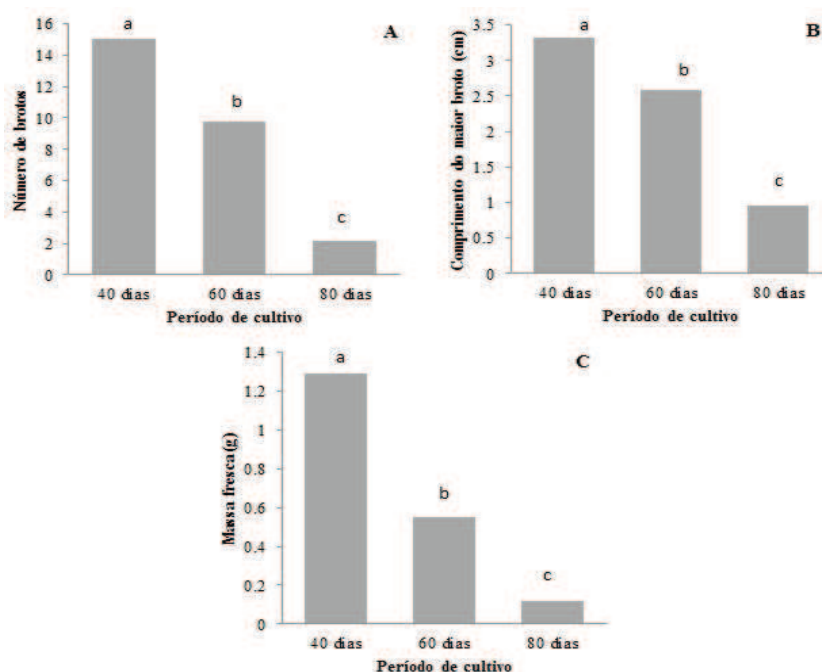


Gráfico 3 Influência dos períodos de cultivo de 40, 60 e 80 dias sobre as variáveis A) número de brotos do maior broto; B) comprimento do maior broto; e C) massa fresca de explantes de *E. urograndis* cultivados em biorreator de imersão temporária .

O período de cultivo de 80 dias foi o que apresentou piores resultados, pois a maioria dos brotos não tolerou o intervalo até atingir os primeiros 40 dias para a renovação do meio de cultura. Os explantes apresentaram sinais aparentes de necrose e, conseqüentemente, morte do material vegetal. Essa característica pode estar relacionada com o esgotamento dos nutrientes no meio de cultura

necessários para manter um crescimento ótimo e/ou ao acúmulo de produtos inibidores resultantes do próprio metabolismo celular (CORREIA et al., 1995), o que pode interferir até mesmo na manutenção do padrão dos brotos durante o cultivo.

Em todos os tratamentos foi observado que, a partir do 20º dia de cultivo, ocorreu o escurecimento do meio de cultura, provavelmente, pela oxidação dos explantes e consequente liberação de compostos fenólicos no meio líquido (FIGURA 5A). Borges et al. (2011) também observaram escurecimento do meio de cultura aos 20 dias de cultivo trabalhando com *E. globulus*, evidenciando a oxidação de compostos fenólicos liberados pelo explante no meio de cultura. Uma provável solução ou minimização desse problema seria atuar de forma preventiva, a partir da utilização de compostos antioxidantes. Dentre esses compostos podem-se citar o ácido cítrico, ácido ascórbico, carvão ativado, entre outros, os quais podem atuar inibindo a síntese ou a ação de enzimas envolvidas à oxidação de polifenóis ou agir como adsorventes dessas substâncias (GOULART; XAVIER; DIAS, 2010).

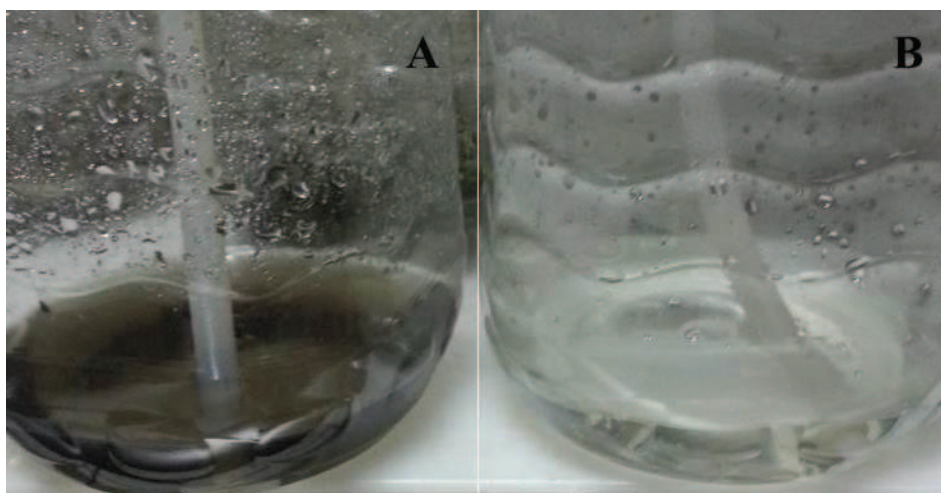


Figura 5 Aspecto escurecido do meio de cultura no tratamento de 40 dias de cultivo aos 20 dias de cultivo (A) e aspecto do meio de cultura renovado no mesmo tratamento (B).

Apesar do cultivo por 40 dias com renovação do meio de cultura aos 20 dias ter apresentado resultados superiores aos demais tratamentos, é possível melhorar a qualidade das culturas e o aumento da taxa de multiplicação a partir de renovações do meio de cultura em períodos menores do que 20 dias. Essas observações têm sido sugeridas por Correia et al. (1995) que trabalharam na multiplicação do híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* e obtiveram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho. McAlister et al. (2005) trabalhando com clones de *Eucalyptus* em biorreator do tipo RITA[®] conseguiram grande proliferação de brotos do 14^o ao 18^o dia de cultivo, mostrando que períodos menores que 20 dias podem ser efetivos na multiplicação em biorreator.

Em geral, ocorreu grande heterogeneidade no crescimento dos explantes de um mesmo tratamento em todos os experimentos. Resultados semelhantes foram encontrados nos trabalhos de Correia et al. (1995) e Oliveira et al. (2011), ambos trabalhando com espécies do gênero *Eucalyptus*. Essa variação no crescimento *in vitro* dos explantes pode estar relacionada com as características morfológicas inerentes a cada explante, como diâmetro do caule e número de pares de folhas, bem como as idades cronológica, fisiológica e ontogenética das culturas (OLIVEIRA et al., 2011).

4 CONCLUSÃO

A utilização do meio de cultura MS modificado com a proporção 3:1 (NO_3^-):(NH_4^+) foi a que proporcionou a melhor performance para cultivo do híbrido *E. urograndis* em BIT[®];

A citocinina BAP promoveu os melhores ganhos no processo de multiplicação em BIT[®] para o híbrido comercial, além de ser a citocinina que gerou menos hiperidricidade.

O período de 40 dias com renovação do meio de cultura aos 20 dias foi o que apresentou resultados mais promissores. Entretanto, novos estudos devem ser realizados, buscando encontrar o período mais adequado de cultivo para esse híbrido em BIT[®].

REFERÊNCIAS

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico**: ano base 2012. Brasília, 2013. 148 p. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br/estatisticas.asp>>. Acesso em: 9 jan. 2014.

BORGES, S. R. et al. Multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 2, p. 173-182, 2011.

BOSELA, M. J.; MICHLER, C. H. Media effects on black walnut (*Juglans nigra* L.) shoot culture growth *in vitro*: evaluation of multiple nutrient formulations and cytokinin types. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, New York, v. 44, n. 4, p. 316-329, 2008.

BRONDANI, G. E. et al. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage X *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 1, p. 11-19, jan./fev. 2009.

BRONDANI, G. E. et al. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, New York, v. 48, n. 5, p. 478-487, 2012.

CORREIA, D. et al. 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, n. 48/49, p. 107-116, 1995.

DIBAX, R. et al. 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.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 10, n. 58, p. 49-59, 2009.

FERREIRA, D. F. A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FRÁGUAS, C. B.; DORNELLES, C. M. V.; LIMA, G. P. P. Benzilaminopurina e ácido naftaleno acético na indução e multiplicação *in vitro* de gemas de abacaxizeiro da cultivar 'IAC Gomo-de-mel'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 6, p. 1682-1687, 2009.

GARCIA, R. et al. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal médium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, n. 1, p. 47-54, 2011.

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

GOULART, P. B.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M. Efeito de antioxidantes no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 34, n. 6, p. 961-972, 2010.

IVANOVA, M.; STADEN, J. van. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 104, n. 1, p. 13-21, 2011.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

KEVERS, C. et al. Hyperhydricity of micropropagated shoots: at typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 2, p. 181-191, May 2004.

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

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagator's Society**, Carlisle, v. 30, p. 421-327, 1981.

MCALISTER, B. et al. Use of temporary immersion bioreactor system (RITA[®]) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forests (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 81, n. 3, p. 347-358, 2005.

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

OLIVEIRA, A. B. de; MEDEIROS FILHO, S.; BEZERRA, A. M. E. Tempo de cultivo e tamanho do recipiente na formação de mudas de *Copernicia hospita*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 3, p. 533-538, 2011.

OLIVEIRA, M. L. de et al. Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 6, p. 1207-1217, 2011.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de bata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, set. 2003.

PICOLI, E. A. T. et al. Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). **Plant Science**, Clare, v. 160, n. 5, p. 857-868, Apr. 2001.

PINTO, G. et al. 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.

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

ROMANOV, G. A. et al. Effect of indole-3-acetic acid and kinetin on tuberisation parameters of different cultivars and transgenic lines of potato in vitro. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 32, n. 2/3, p. 245-251, 2000.

SUNAGAWA, H. et al. Effect of urea-type cytokinins on the adventitious shoots regeneration from cotyledonary node explant in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Production Science**, Tokyo, v. 10, n. 1, p. 47-56, 2007.

VASCONCELOS, A. G. V. et al. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 837-844, 2012.

WILCOX, D. et al. **Image tool for Windows 3.0**. San Antonio: UTHSCSA, 1995. Software.