



LARA SIQUEIRA OLIVEIRA CARVALHO

**INFLUÊNCIA DO TDZ E DE MEIOS DE
CULTIVO NA ORGANOGÊNESE INDIRETA DE
UM HÍBRIDO COMERCIAL UROGRANDIS**

LAVRAS – MG

2015

LARA SIQUEIRA OLIVEIRA CARVALHO

**INFLUÊNCIA DO TDZ E DE MEIOS DE CULTIVO NA
ORGANOGENESE INDIRETA DE UM HÍBRIDO COMERCIAL
UROGRANDIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Carvalho, Lara Siqueira Oliveira.

Influência do TDZ e de meios de cultivo na organogênese indireta de um híbrido comercial urograndis / Lara Siqueira Oliveira Carvalho. – Lavras : UFLA, 2015.

66 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Bibliografia.

1. Eucalipto. 2. Micropropagação. 3. Organogênese Indireta.

I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

LARA SIQUEIRA OLIVEIRA CARVALHO

**INFLUÊNCIA DO TDZ E DE MEIOS DE CULTIVO NA
ORGANOGENESE INDIRETA DE UM HÍBRIDO COMERCIAL
UROGRANDIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2015.

Dra. Evânia Galvão Mendonça UFRRJ

Dra. Vanessa Cristina Stein UFG

Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

LAVRAS – MG

2015

A minha prima Maysa, que mesmo ausente, foi sempre um grande exemplo pra mim.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem ele não teria chegado até aqui.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal e ao LCBM pela oportunidade.

À CAPES, por ter concedido a bolsa.

Ao meu orientador Luciano, pelo conhecimento me passado e por ter aprendido muito com seu profissionalismo.

Ao grupo Eucalipto, que esteve sempre à disposição para tirar minhas dúvidas e pela amizade.

Aos amigos do LCBM e da Fisiologia Vegetal, que estiveram comigo nesta caminhada.

Aos meus pais, Marcelo e Marice, e aos meus irmãos, Laís e Vinícius, que sempre acreditaram na minha capacidade.

Ao meu sobrinho Pedro, pelos momentos de descontração.

Ao meu namorado Fabio, pelo amor, apoio e compreensão em todos os momentos. E também pela grande ajuda na formatação deste trabalho.

A todos que, de certa forma, torceram por mim.

Muito Obrigada!

RESUMO

Dentre as técnicas de micropropagação, a organogênese indireta figura como uma das mais promissoras, devido ao seu potencial de permitir a obtenção de altas taxas de multiplicação, gerando grandes quantidades de plantas uniformes. Objetivou-se, neste trabalho, desenvolver um protocolo de organogênese indireta a partir de ápices caulinares, de origem *ex vitro* e *in vitro*, obtidos de brotações de plantas de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. Para isso, vários experimentos foram realizados a fim de determinar o melhor regulador de crescimento e sua melhor concentração; a melhor fonte de explante para iniciar a organogênese indireta; e o melhor meio para a indução de calos e, posteriormente, a regeneração de brotos. Foram realizadas análises quanto à formação de calos, área do calo coberta por brotações e número de brotações. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo que o número de repetições e o número de parcelas foram específicos para cada experimento. Através do melhor tratamento obtido, realizou-se o acompanhamento do desenvolvimento dos calos por meio de parâmetros quantitativos e qualitativos. Verificou-se que o cultivo do explante gema apical no meio de cultura JADS, acrescido com 0,1 μ M de TDZ, foi a combinação que proporcionou os melhores resultados para a obtenção de calos e regeneração de brotos.

Palavras-chave: Eucalipto. Micropropagação. Acompanhamento dos calos.

ABSTRACT

Among micropropagation techniques, indirect organogenesis is considered one of the most promising due to its potential of allowing the obtaining of high multiplication rates, generating large quantities of uniform plants. In this work, the objective was to develop a protocol for indirect organogenesis from shoot tips, of *ex vitro* and *in vitro* origins, obtained from sprouting of *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. For this, many experiments were conducted in order to determine the best growth regulator and its best concentration; the best explant source to begin indirect organogenesis; and the best means to induce calluses and, posteriorly, the regeneration of the sprouts. We performed analyses regarding callus formation, area of the callus covered by sprouting and number of sprouting. The experimental design used was completely randomized, with the number of replicates and of plots specific to each experiment. With the best treatment obtained, we accompanied the development of the calluses by means of quantitative and qualitative parameters. We verified that the cultivation of the apex bud explant in the JADS culture medium, added of 0.1 μM of TDZ, was the combination that provided the best results for obtaining calluses and regeneration sprouts.

Keywords: Eucalyptus. Micropropagation. Accompaniment of the callus.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Calos oriundos de ápices caulinares do híbrido de *E. grandis X E. urophylla*, submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de ANA e TDZ, com 60 dias de cultivo. a – ausência de reguladores, b – 0,009 μM ANA e 0,5 μM TDZ, c – 0,009 μM ANA e 1,0 μM , d - 0,009 μM ANA e 1,5 μM TDZ, e – 0,09 μM ANA e 0,5 μM TDZ, f – 0,09 μM ANA e 1,0 μM TDZ, g – 0,09 μM ANA e 1,5 μM TDZ33
- Figura 2 Experimento conduzido com 0; 0,1; 0,5; 2,5 e 12,5 μM de TDZ para a indução de calos, com explantes *ex vitro*, aos 60 dias de cultivo. a – Formação de calos; b – Área do calo coberta por brotações e c – Número de brotações36
- Figura 3 Calos oriundos de ápices caulinares do híbrido de *E. grandis x E. urophylla*, de origem *ex vitro*, submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de TDZ com 60 dias de cultivo. a – ausência de reguladores, b – 0,1 μM de TDZ, c – 0,5 μM de TDZ, d – 2,5 μM de TDZ, e – 12,5 μM de TDZ.....37
- Figura 4 Experimento conduzido com 0; 0,1; 0,5; 2,5 e 12,5 μM de TDZ, com explantes *in vitro*, aos 60 dias de cultivo39
- Figura 5 Calos oriundos de ápices caulinares de *E. grandis X E. urophylla*, de origem *in vitro*, submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de TDZ com 60 dias de cultivo. a – ausência de reguladores, b – 0,1 μM de TDZ, c – 0,5 μM de TDZ, d – 2,5 μM de TDZ, e – 12,5 μM de TDZ.....40
- Figura 6 Calos oriundos de ápices caulinares de *E. grandis X E. urophylla*, de origem *in vitro*, submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de TDZ com 90 dias de cultivo. a –

	ausência de reguladores, b – 0,1 μM de TDZ, c – 0,5 μM de TDZ, d – 2,5 μM de TDZ, e – 12,5 μM de TDZ.....	41
Figura 7	Experimento conduzido com 0; 0,1; 0,5; 2,5 e 12,5 μM de TDZ, com explantes <i>in vitro</i> , aos 90 dias de cultivo. a – Área do calo coberta por brotações e b - Número de brotações	42
Figura 8	Calos oriundos de ápices caulinares de <i>E. grandis</i> X <i>E. urophylla</i> , de origem <i>in vitro</i> , submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de TDZ com 90 dias de cultivo.a – ausência de reguladores, b – 0,01 μM de TDZ, c – 0,05 μM de TDZ, d – 0,1 μM de TDZ, e – 0,15 μM de TDZ, f – 0,20 μM de TDZ	44
Figura 9	Experimento conduzido com 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,15 e 0,20 μM de TDZ com explantes <i>in vitro</i> , aos 90 dias de cultivo. a – Formação de calo; b - Área do calo coberta por brotações e c – Número de brotações.....	45
Figura 10	Calos oriundo de ápices caulinares de <i>E. grandis</i> X <i>E. urophylla</i> , de origem <i>in vitro</i> , submetidos aos tratamentos com o meio JADS e WPM com 60 dias de cultivo.a – meio JADS, b – meio WPM	47
Figura 11	Calos oriundos de ápices caulinares de <i>E. grandis</i> X <i>E. urophylla</i> , de origem <i>in vitro</i> , submetidos aos tratamentos com gemas apicais e axilares com 60 dias de cultivo.a – gemas apicais, b – gemas axilares	49
Figura 12	Acompanhamento do crescimento dos calos de <i>Eucalyptus grandis</i> X <i>Eucalyptus urophylla</i> . a – Peso médio dos calos (gramas/dia); b – Taxa de crescimento médio (gramas/dia); c – Percentagem de crescimento (%/dia)	51

Figura 13 Cortes histológicos corados com azul de toluidina do explante inicial e calos oriundos de ápices caulinares de *E. grandis* x *E. urophylla*, de origem *in vitro*, inoculados em meio JADS. a – no momento da inoculação, b- 10 dias, c – 20 dias, d - 30 dias, e – 40 dias, f – 50 dias e g- 60 dias após a inoculação. f- folha, ma-meristema apical, pf- primórdio foliar, fc- formação de calo, pt-parênquima de transfusão, pd- protoderme, eg – estrutura globular, pc- procâmbio55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Experimento submetido aos tratamentos com os meios JADS e WPM, aos 60 dias de cultivo.....	47
Tabela 2 Experimento submetido aos tratamentos com gemas apicais e laterais, aos 60 dias de cultivo.....	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Objetivo geral.....	14
1.2	Objetivos específicos.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Eucalipto.....	16
2.2	Cultura de tecidos e micropropagação.....	17
2.3	Organogênese.....	19
2.4	Reguladores de crescimento.....	20
2.5	Explante.....	21
2.6	Meios de cultura.....	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Local dos experimentos.....	24
3.2	Material vegetal.....	24
3.3	Indução de calos de explantes <i>ex vitro</i> em meio de cultura com os reguladores ANA e TDZ.....	24
3.4	Indução de calos de explantes <i>ex vitro</i> e <i>in vitro</i> com o regulador TDZ.....	25
3.5	Otimização das concentrações do meio de indução com TDZ (explantes <i>in vitro</i>).....	27
3.6	Meio JADS e WPM (explantes <i>in vitro</i>).....	28
3.7	Gemas apicais e axilares (explantes <i>in vitro</i>).....	28
3.8	Curva de crescimento dos calos.....	29
3.9	Análises histológicas.....	31
3.10	Análises estatísticas.....	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Indução de calos de explantes <i>ex vitro</i> , em meio de cultura, com os reguladores ANA e TDZ.....	33
4.2	Indução de calos de explantes <i>ex vitro</i> com o regulador TDZ.....	35
4.3	Indução de calos de explantes <i>in vitro</i> com o regulador TDZ.....	38
4.4	Otimização das concentrações do meio de indução com TDZ (explantes <i>in vitro</i>).....	43
4.5	Meio JADS e WPM (explantes <i>in vitro</i>).....	46
4.6	Gema apicais e axilares (explantes <i>in vitro</i>).....	48
4.7	Curva de crescimento dos calos.....	50
4.8	Análises histológicas.....	53
5	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS.....	58
	APÊNDICE.....	66

1 INTRODUÇÃO

O eucalipto devido ao rápido crescimento, ampla adaptabilidade a solos e climas e à variedade de uso da madeira, é cultivado largamente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (AGGARWAL; KUMAR; REDDY, 2010).

O Brasil destaca-se no cenário mundial por seu excelente desempenho no setor florestal, fruto das condições climáticas e da tecnologia desenvolvida pelas empresas e instituições de pesquisas do país. Atualmente, as plantações de eucalipto no Brasil ocupam 5,47 milhões de hectares (INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ, 2015).

Alguns indicadores econômicos reforçam a importância da cadeia produtiva vinculada ao eucalipto, uma vez que o setor florestal foi responsável por gerar 4,4 milhões de empregos diretos e indiretos no País em 2013 e a balança comercial do setor de árvores plantadas, nesse mesmo ano, teve um saldo de U\$\$ 6,4 bilhões (IBÁ, 2015). Essa cadeia produtiva é responsável por produtos essenciais ao bem-estar da sociedade, como matéria-prima para a produção de papel, madeira para a fabricação de móveis, geração de energia, carvão vegetal e construção civil, além dos óleos essenciais, a partir dos quais são fabricados alimentos, cosméticos, remédios, entre outros usos.

Frente à grande demanda pelos produtos do eucalipto, torna-se necessário o uso de tecnologias que auxiliem na sua produção em maior escala e na obtenção de genótipos superiores. Assim, a biotecnologia aparece como uma ferramenta interessante para atingir esses objetivos, pois além de possibilitar ganhos em produtividade, resultando em maior taxa de produção em um curto intervalo de tempo e plantas com maior resistência à estresses bióticos e abióticos, ela propicia também ganhos em sustentabilidade, através da redução das áreas plantadas e consequente redução de impactos ambientais (ANDRADE, 2006; GOLLEL; REINIGER; CURTI, 2009).

Várias técnicas biotecnológicas auxiliam o melhoramento genético convencional na obtenção de genótipos mais produtivos, como por exemplo, a cultura de tecidos. Essa ferramenta, através de um eficiente protocolo de regeneração de plantas, permite uma alta taxa de multiplicação clonal, propagando, assim, os genótipos de interesse. A cultura de tecidos também é essencial para a transformação genética, visto que uma alta taxa de regeneração de plantas aumenta a probabilidade de obter eventos transformantes. (SARTORETTO; SALDANHA; CORDER, 2008).

Além disso, a cultura de tecidos possui a micropropagação como uma de suas aplicações mais utilizadas. E essa consiste na cultura asséptica de células, tecidos e órgãos sob condições químicas e físicas definidas *in vitro* (THORPE, 2007) e permite a propagação clonal em larga escala de várias espécies florestais (ECHEVERRIGARAY et al., 2001). E entre as técnicas de micropropagação, a organogênese indireta, é uma das mais utilizadas por fornecer uma alta taxa de regeneração de brotos a partir de calos (LAINÉ; DAVID, 1994; MORALEJO et al., 1998).

1.1 Objetivo geral

Desenvolver um protocolo de organogênese indireta de um híbrido comercial de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*.

1.2 Objetivos específicos

- a) Identificar o regulador de crescimento mais adequado, bem como sua concentração, para indução de calos e posterior regeneração de brotações.

- b) Avaliar qual fonte de explante é mais viável para o processo de indução de calos.
- c) Verificar qual meio de cultura promoveria, ao final do processo de organogênese, um maior número de brotações.
- d) Obter uma curva de crescimento dos calos de eucalipto.
- e) Caracterizar, histologicamente, o processo de organogênese indireta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Eucalipto

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, possui cerca de 700 espécies descritas, além de muitas variedades e alguns híbridos (LONGUE JUNIOR; COLODETTE, 2013). As principais espécies cultivadas no Brasil incluem o *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus saligna* e *Eucalyptus urophylla*, entre outras. Além disso, foram desenvolvidos cruzamentos entre as espécies, resultando em híbridos, como é o caso do *E. urograndis* (*E. grandis* X *E. urophylla*) (CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA- CIB, 2008).

Dentre as várias espécies arbóreas que existem, o eucalipto tem sido extensivamente utilizado em plantios florestais, devido às características de rápido crescimento, produtividade, ampla diversidade de espécies, capacidade de adaptação a diferentes tipos de climas e solos e aplicação para as mais diversas finalidades, como por exemplo na fabricação de papel e na indústria de móveis (MORA; GARCIA, 2002). A suavidade, brilho, baixa resistência à tração das fibras do eucalipto e o aspecto retilíneo de sua madeira que apresenta alta densidade faz esse gênero ser muito importante para a fabricação de papel e de móveis (GIRIJASHANKAR, 2011).

O grande interesse na madeira do eucalipto é devido ao baixo custo de produção, devido principalmente ao alto rendimento da polpa, alta produtividade florestal e qualidade de suas fibras (PRINSEN et al., 2012).

Uma das vantagens conferidas ao eucalipto é a facilidade em se obter cruzamentos entre diferentes espécies do mesmo gênero, processo chamado de hibridação. O *E. urograndis* é um dos híbridos de eucalipto mais conhecido e usado no Brasil. Esse cruzamento confere as melhores características do *E.*

grandis (crescimento e qualidade da madeira) e do *E. urophylla* (adaptação à diferentes condições climáticas e resistência à doenças, particularmente ao fungo causador do cancro do eucalipto) (CIB, 2008).

Em 2013, a área ocupada por plantios florestais de *Eucalyptus* e *Pinus* no Brasil totalizou 7,04 milhões de hectares, sendo que, desse total, 77,7% corresponde a área de plantios de *Eucalyptus* (IBÁ, 2014).

Os sistemas de produção de mudas de eucalipto mais utilizados são os provenientes de sementes e de estaquia (plantios clonais). No sistema de produção de mudas por meio de sementes, essas podem ser obtidas de plantios comerciais, áreas de produção ou de pomares porta-sementes melhorados geneticamente por seleção (MOURA; GUIMARÃES, 2003). A estaquia é o principal método de reprodução vegetativa utilizado em escala comercial, por ter seus princípios já bem conhecidos. Porém, esse método tem apresentado algumas dificuldades na produção de mudas de certos clones, principalmente em relação ao enraizamento, à formação de mudas e ao desenvolvimento da árvore (ANDRADE, 2006).

Assim, toda tecnologia que facilite ou que torne viável comercialmente a produção de determinados clones é atrativa. Dessa forma, a micropropagação é uma ferramenta importante na propagação de clones, tornando-os aptos à produção de mudas (ANDRADE, 2006).

2.2 Cultura de tecidos e micropropagação

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta utilizada com a finalidade de manter, propagar e regenerar certas partes da planta (células, tecidos ou órgãos), em condições assépticas (ambiente livre de microrganismos) e controladas (*in vitro*), constituindo uma das áreas de maior êxito da biotecnologia (SARTORETTO; SALDANHA; CORDER, 2008). Essa

ferramenta é fundamental para o processo de transformação genética, pois é primordial que já se tenha estabelecido um eficiente protocolo de regeneração que possibilite o desenvolvimento de plantas inteiras a partir das células transformadas, visando sua posterior clonagem.

A propagação vegetativa *in vitro*, ou micropropagação, devido ao tamanho reduzido dos propágulos utilizados (ápices caulinares, segmentos nodais e embriões zigóticos), é a técnica mais usada da cultura de tecidos e a de maior impacto (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS - ABCTP, 2011; TORRES; CALDAS; BUSO, 1998), pois permite a obtenção de taxas de multiplicação elevadas em curtos intervalos de tempo, sendo fundamental para programas de melhoramento, principalmente para espécies recalcitrantes como o eucalipto, as quais apresentam grande dificuldade de regeneração *in vitro* (RIBEIRO, 2012).

Devido aos vários problemas existentes na regeneração *in vitro* do eucalipto, como a hiperhidricidade, senescência e oxidação causada pela presença de fenóis (PINTO, 1997), muitos trabalhos desenvolvidos baseiam-se na otimização de protocolos para a cultura *in vitro* ou na criação de novos protocolos para as diferentes espécies de eucaliptos.

O sucesso da regeneração *in vitro* depende do controle da morfogênese, que é influenciada por fatores como o genótipo, tipo de explante, componentes nutricionais do meio de cultura, reguladores de crescimento e condições de incubação (GIRI; SHYAMKUMAR; ANJANEYULU, 2004).

Apesar do grande impacto da utilização da micropropagação na silvicultura clonal e na indústria florestal, são poucos os resultados efetivos obtidos com a propagação contínua de espécies do gênero *Eucalyptus*. Dessa forma, a micropropagação para produção comercial de mudas ainda não se justifica economicamente, embora tenha se mostrado tecnicamente viável na clonagem de espécies recalcitrantes (ASSIS; MAFIA, 2007), sendo indicada, por

enquanto, apenas para o rejuvenescimento de clones selecionados, híbridos com alto valor comercial (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009), e também em programas de melhoramento genético, a fim de reduzir o tempo de obtenção de novas cultivares modificadas geneticamente.

2.3 Organogênese

A propagação vegetativa *in vitro* do eucalipto pode ser obtida, tanto por organogênese, quanto por embriogênese somática. Na propagação via organogênese, órgãos como partes aéreas e raízes são induzidos a formarem tecidos vegetais em meio de cultura pela diferenciação de células (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

A micropropagação, via organogênese, possui a atuação de fatores externos e internos que envolvem a interação entre a fonte de explante, o meio de cultura e fatores do ambiente (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009). Depende também da ação de reguladores de crescimento, como auxinas e citocininas, e da habilidade do tecido em responder a essas mudanças hormonais (ALVES; XAVIER; OTONI, 2004).

Na organogênese direta ocorre o surgimento de gemas, a partir de tecidos que apresentam potencial morfogenético na planta *in vitro*, mas que em geral não se expressam. Já a organogênese indireta ocorre quando o processo de regeneração de gemas é precedido da formação de calo. A partir de células não organizadas do calo, surgem gemas adventícias que crescem e se desenvolvem em novas partes aéreas (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

A principal vantagem de se utilizar a organogênese indireta é o potencial de otimizar as taxas de multiplicação, reproduzindo grandes quantidades de plantas uniformes (ARENHART; ZAFFARI, 2008).

Várias pesquisas estão voltadas para o entendimento do processo de organogênese a nível molecular, bem como a relação desse processo com os reguladores de crescimento, como sinalizadores de membranas e suas interações com os genes envolvidos no processo de organogênese. Como por exemplo os genes da família *LBD* (Lateral Organ Boundaries), onde a super expressão desses genes induz à formação de calos com capacidade de regeneração eficiente, e o gene *TIR1*, relacionado à percepção da citocinina, em que a sua superexpressão aumenta a capacidade de regeneração de plantas (MOTTE et al., 2014).

Análises histológicas em estudos de organogênese são fundamentais para confirmar a fonte de brotações formadas no meio, excluindo assim a possibilidade de uma má interpretação dos resultados decorrentes de gemas pré-formadas no explante inicial (HÉRVE et al., 2001). Além disso, o autor também destaca a importância de se conhecer o exato local onde as divisões celulares começam, antes da formação do calo, para estudos de transformação genética, porque eles indicam a superfície de origem de brotações adventícias.

2.4 Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento são usados na cultura de tecidos, tanto na indução da organogênese, como na embriogênese somática. As auxinas e citocininas, em formas naturais ou sintéticas, são os hormônios mais frequentemente usados na cultura de tecidos (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010).

As auxinas são usadas na indução de calos a partir de um explante e no enraizamento a partir de brotos. Alguns reguladores de crescimento têm uma posição ambígua, atuando como auxina ou como citocinina, como é o caso do Thidiazuron ou TDZ (1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il). As citocininas na cultura de

tecidos são geralmente usadas para promover a indução de brotos adventícios, a partir de calos ou para induzir brotações a partir de gemas axilares ou apicais, porém, também podem inibir a indução de raízes em plântulas (BARRUETO CID; ILLG; PIEDRABUENA, 1994).

O adequado balanço entre auxinas e citocininas é necessário para o estabelecimento de um controle eficiente no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro* (ANDRADE, 2006). Skoog e Miller (1957) observaram que a alta razão auxina/citocinina induz à formação de raízes, enquanto a baixa razão promove a indução de parte aérea. Isso indica que auxina e citocinina podem ter uma relação na organogênese *in vitro* (SU; LIU; ZHANG, 2011).

2.5 Explante

O explante é um dos fatores que influenciam no sucesso do cultivo *in vitro*. A escolha do explante pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: disponibilidade de material, nível de contaminação, juvenilidade do tecido e estação do ano (BARRUETO CID; TEIXEIRA, 2010).

Além disso, cada explante reage de determinada maneira a uma condição de cultura *in vitro*. O uso de ápices caulinares como explantes por exemplo é vantajoso, pois estabelece plantas livres de vírus. Uma vez que na excisão do meristema apical com um ou dois primórdios foliares, não se observa conexão vascular com os tecidos da planta (TORRES; TEIXEIRA; POZZER, 1998).

Em *Saussurea obvallata* (planta medicinal e ornamental), verificou-se que explantes foliares reagiram mais satisfatoriamente que raízes, hipocótilo e cotilédones, em relação à indução de calos e regeneração de brotações (DHAR; JOSHI, 2005).

Em um estudo de organogênese em *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, em meio MS com modificações, acrescidos dos reguladores ANA e BAP, observou-se aos 45 dias o início da formação de brotações em calos advindos de ápices caulinares, o que não ocorreu em calos advindos de folhas. Esses apresentavam-se completamente oxidados nessa idade (BATISTA, 2012).

A idade do explante também pode ser levada em consideração no processo de organogênese. Explantes jovens, como o ápice caulinar estudado aqui, apresenta um melhor potencial organogênico, pois os tecidos jovens são menos diferenciados e suas células são metabolicamente mais ativas ao serem cultivadas sob condições hormonais e nutricionais adequadas (FAMIANI et al., 1994).

Plantas de um clone de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, repicadas a cada 17 dias apresentaram superioridade organogênica, em relação à plantas repicadas a cada 26 ou 35 dias (ALCANTARA; BESPALHOK FILHO; QUOIRIN, 2011), mostrando a melhor capacidade regenerativa de explantes mais jovens.

2.6 Meios de cultura

O sucesso da propagação de plantas através da cultura de tecidos é fortemente influenciado pelo meio de cultura utilizado (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Para um crescimento normal e vigoroso sob condições *in vitro*, uma planta necessita de elementos no meio de cultura como macronutrientes, micronutrientes, reguladores vegetais, vitaminas, aminoácidos, compostos nitrogenados e fontes de carbono (açúcares) (YASEEN et al., 2013).

As exigências em termos de meio de cultura variam de acordo com a espécie, cultivar e explante utilizado, devendo ser experimentalmente definido para cada caso em particular. O meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962),

formulado primeiramente para a cultura de tabaco, é o meio mais utilizado em trabalhos de cultura de tecidos, devido aos ganhos significativos proporcionados no crescimento de tecidos de diversas espécies de plantas. Esse meio possui características específicas como, por exemplo, a alta concentração de nitrogênio, quando comparado a outros meios como WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), desenvolvido para cultura de brotações em plantas lenhosas e amplamente utilizado para propagação de arbustos e árvores em laboratórios comerciais, e o meio JADS (COOREIA et al., 1995), que possui uma composição nutricional de inorgânicos específica à espécie de *Eucalyptus grandis*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Central de Biologia Molecular da Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.

3.2 Material vegetal

Os ápices caulinares utilizados como explantes foram obtidos de brotações do híbrido comercial de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, estabelecidos *ex vitro* e *in vitro*. Os explantes provenientes de brotações *ex vitro* foram desinfestados por meio da exposição à pastilhas de paraformaldeído, durante 50 minutos. Após esse intervalo, os explantes foram levados para câmara de fluxo laminar, onde foram imersos em 50 ml de água autoclavada e adicionado 5 ml de ácido cítrico, para evitar a oxidação das brotações. Os ápices caulinares foram excisados com o auxílio de um bisturi e para o procedimento foi utilizada uma lupa estereomicroscópica (marca - ZEISS, modelo - STEMI 2000). Para os explantes provenientes de brotações *in vitro* essas foram excisadas em fluxo laminar, conforme o procedimento descrito anteriormente para explantes *ex vitro*, levando-se em consideração que as brotações não passaram por um processo de desinfestação.

3.3 Indução de calos de explantes *ex vitro* em meio de cultura com os reguladores ANA e TDZ

Para a indução de calos, os explantes *ex vitro* foram excisados e inoculados em frascos, contendo 30 mL de meio MS com modificações, além de

distintas combinações das concentrações dos reguladores de crescimento ANA (0,009; 0,09 μM) e TDZ (0,5; 1,0; 1,5 μM) e na ausência desses (BATISTA, 2012). Os frascos foram mantidos no escuro por 30 dias, sendo que houve a renovação do meio após 15 dias de cultivo.

Após este período, os calos obtidos foram transferidos para meios de regeneração MS com modificações, acrescidos de 0,68 μM de ANA e 1,1 μM de BAP (BATISTA, 2012). Os frascos foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, a uma intensidade luminosa de 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $26\pm 2^\circ\text{C}$. Após 15 dias, o material foi transferido para um novo meio, mantendo as mesmas condições anteriores, onde permaneceu por mais 15 dias.

Os meios foram acrescidos de 30 g.L^{-1} de sacarose e 4,9 g.L^{-1} de ágar e foram autoclavados a 121°C , durante 20 minutos.

Este experimento consistiu de 7 tratamentos de indução (ausência e diferentes combinações dos reguladores ANA e TDZ), cada tratamento com 7 repetições e cada repetição consistiu de um frasco com 7 explantes.

Os explantes foram avaliados aos 60 dias de cultivo.

3.4 Indução de calos de explantes *ex vitro* e *in vitro* com o regulador TDZ

Este experimento, utilizando explantes *ex vitro* e *in vitro*, foi realizado para verificar se o uso do regulador TDZ isoladamente seria mais vantajoso para a indução de calos e regeneração de brotações.

Para a indução de calos, os explantes foram excisados e inoculados em placas contendo 25mL de meio MS com modificações, além de distintas concentrações do regulador de crescimento TDZ (0,1; 0,5; 2,5; 12,5 μM) e na ausência desse. As placas foram mantidas no escuro por 30 dias, sendo que houve a renovação do meio após 15 dias de cultivo.

Após este período, os calos obtidos foram transferidos para frascos com 25 mL de meio de regeneração MS com modificações, acrescidos de 0,68 μM de ANA e 1,1 μM de BAP (BATISTA, 2012). Os frascos foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, a uma intensidade luminosa de 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $26\pm 2^\circ\text{C}$. Após 15 dias, o material foi transferido para um novo meio, mantendo as mesmas condições anteriores, onde permaneceu por mais 15 dias.

Os meios foram acrescidos de 30 g.L^{-1} de sacarose e 4,9 g.L^{-1} de ágar e foram autoclavados a 121°C , durante 20 minutos.

Este experimento consistiu de 5 tratamentos de indução (ausência e diferentes concentrações de TDZ), cada tratamento com 8 repetições e cada repetição consistiu de um frasco com 8 explantes, tanto para explantes *ex vitro*, como para explantes *in vitro*.

Os explantes provenientes de brotações *in vitro*, após os 60 dias de cultivo, foram transferidos para um novo meio de regeneração com as mesmas concentrações citadas acima dos reguladores ANA e BAP, onde permaneceram por mais 30 dias, sem a renovação do meio. A avaliação foi realizada aos 90 dias. Isso foi feito com o objetivo de se obter um número ainda maior de brotações.

Já os explantes provenientes de brotações *ex vitro* foram avaliados aos 60 dias, pois esses não apresentaram um resultado tão satisfatório comparado aos explantes *in vitro*.

3.5 Otimização das concentrações do meio de indução com TDZ (explantes *in vitro*)

Este experimento foi realizado para verificar se alguma concentração de TDZ, próxima à melhor concentração encontrada no experimento anterior, seria mais vantajosa para a indução de calos e regeneração de plantas.

Para a indução de calos, os explantes foram excisados e inoculados em placas contendo 25 mL de meio MS com modificações, além de distintas concentrações do regulador de crescimento TDZ (0,01; 0,05; 0,1; 0,15; 0,20 μ M), e na ausência desse. As placas foram mantidas no escuro por 30 dias, sendo que houve a renovação do meio, após 15 dias de cultivo.

Após este período, os calos obtidos foram transferidos para frascos com 25 mL de meio de regeneração MS com modificações, acrescidos de 0,68 μ M de ANA e 1,1 μ M de BAP (BATISTA, 2012). Os frascos foram transferidos para um fotoperíodo de 16 horas a uma intensidade luminosa de 45 μ mol.m⁻².s⁻¹ e temperatura de 26 \pm 2°C. Após 15 dias, o material foi transferido para um novo meio, mantendo as mesmas condições anteriores, onde permaneceu por mais 15 dias.

Os meios foram acrescidos de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 4,9 g.L⁻¹ de ágar e foram autoclavados a 121°C, durante 20 minutos.

Este experimento consistiu de 6 tratamentos de indução (ausência e diferentes concentrações TDZ), cada tratamento com 8 repetições e cada repetição consistiu de um frasco com 7 explantes.

Após 60 dias de cultivo, os explantes foram transferidos para um novo meio de regeneração com as mesmas concentrações citadas acima dos reguladores ANA e BAP, onde permaneceram por mais 30 dias, sem a renovação do meio. A avaliação foi feita aos 90 dias. Isso foi feito com o objetivo de se obter um número ainda maior de brotações.

3.6 Meio JADS e WPM (explantes *in vitro*)

Além do meio MS com modificações, foram testados os meios JADS (CORREIA et al., 1995) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), a fim de verificar o melhor meio para a indução de calos e posterior regeneração de brotações.

Para a indução de calos foram utilizados explantes *in vitro*. Esses foram excisados e inoculados em placas contendo 25 mL de meio JADS ou WPM, com 0,1 μM de TDZ. As placas foram mantidas no escuro por 30 dias, sendo que houve a renovação do meio após 15 dias.

Após este período, os calos obtidos foram transferidos para frascos com 25mL de meio de regeneração JADS ou WPM, acrescidos de 0,68 μM de ANA e 1,1 μM de BAP, conforme utilizado por Batista (2012). Os frascos foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, a uma intensidade luminosa de 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $26\pm 2^\circ\text{C}$. Após 15 dias, o material foi transferido para um novo meio, mantendo-se as mesmas condições anteriores, onde permaneceu por mais 15 dias.

Os meios foram acrescidos de 30 g.L^{-1} de sacarose e 4,9 g.L^{-1} de ágar e foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos.

Este experimento consistiu de 2 tratamentos (meio JADS e WPM) com 8 repetições por tratamento e cada repetição consistiu de um frasco com 7 explantes.

Os explantes foram avaliados aos 60 dias de cultivo.

3.7 Gemas apicais e axilares (explantes *in vitro*)

A fim de verificar qual fonte de explante proporcionava melhores resultados na indução de calos e posterior regeneração de brotos, foram testadas gemas apicais e laterais.

Para a indução de calos foram utilizados explantes *in vitro*. Esses foram excisados e inoculados em placas contendo 25 mL de meio JADS, com 0,1 μM de TDZ. As placas foram mantidas no escuro por 30 dias, sendo que houve a renovação do meio após 15 dias.

Após este período, os calos obtidos foram transferidos para frascos com 25 mL de meio de regeneração JADS, acrescidos de 0,68 μM de ANA e 1,1 μM de BAP (BATISTA, 2012). Os frascos foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, a uma intensidade luminosa de 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $26\pm 2^\circ\text{C}$. Após 15 dias, o material foi transferido para um novo meio, mantendo as mesmas condições anteriores, onde permaneceu por mais 15 dias.

Os meios foram acrescidos de 30 g.L^{-1} de sacarose e 4,9 g.L^{-1} de ágar e foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos.

Este experimento consistiu de 2 tratamentos (gemas apicais e axilares) com 10 repetições por tratamento e cada repetição consistiu em um frasco com 8 explantes.

Os explantes foram avaliados aos 60 dias de cultivo.

3.8 Curva de crescimento dos calos

Após o estabelecimento do melhor tratamento para a obtenção de calos organogênicos foi realizado o acompanhamento do crescimento de novos calos, por meio da pesagem e histologia.

Para a confecção das curvas de crescimento dos calos, ápices caulinares foram inoculados em placas com 25 mL de meio JADS, acrescido de 0,1 μM de TDZ. As placas foram mantidas no escuro por 90 dias e os explantes eram transferidos para um novo meio de cultura, a cada intervalo de 15 dias. As avaliações para fins de obtenção da análise de crescimento foram realizadas a

partir do primeiro dia da inoculação (tempo 0) até o 91º dia, com intervalos entre as pesagens de 7 dias, gerando 14 pontos de análise. Para isso, foram inoculados 90 ápices caulinares, sendo que foram feitas 3 repetições para cada ponto de análise, pesando-se 30 ápices em cada repetição. Em cada repetição foram utilizadas 5 placas de Petri com 6 explantes em cada placa. Na pesagem, os calos foram cuidadosamente colocados em placa de Petri estéril, vedada com filme PVC, mantendo-se, assim, a condição asséptica para que eles pudessem retornar, posteriormente, ao meio de cultura. Os calos foram pesados com auxílio de uma balança de precisão, tendo as análises sido realizadas, a partir do peso fresco dos explantes.

Os valores obtidos foram submetidos a teste de regressão, para a confecção de uma curva representativa do crescimento dos calos. O percentual de crescimento dos calos foi verificado segundo a equação determinada por Lameira et al. (1996):

$$\% \text{ crescimento} = \frac{Pf - Pi}{Pf} \times 100$$

Sendo Pi = peso inicial e Pf = peso final de calos. A taxa de crescimento foi calculada de acordo com Teixeira et al. (2004), pela seguinte fórmula:

$$\text{TCM} = \frac{\ln Pf - \ln Pi}{t}$$

Sendo: TCM = taxa de crescimento médio; ln = logaritmo neperiano; Pf = peso final da matéria fresca; Pi = peso inicial da matéria fresca e t = período de cultivo, em dias.

3.9 Análises histológicas

Para as análises histológicas, ápices caulinares foram inoculados em placas com 25 mL de meio JADS, acrescido de 0,1 μM de TDZ. As placas foram mantidas no escuro por 30 dias e os explantes foram transferidos para um novo meio de cultura após um intervalo de 15 dias.

Após este período, os calos obtidos foram transferidos para frascos com 25 mL de meio de regeneração JADS, acrescidos de 0,68 μM de ANA e 1,1 μM de BAP (BATISTA, 2012). Os frascos foram transferidos para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, a uma intensidade luminosa de 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $26\pm 2^\circ\text{C}$. Após 15 dias, os explantes foram transferidos para um novo meio, mantendo-se as mesmas condições anteriores, onde permaneceu por mais 15 dias.

Para as análises histológicas quatro ápices caulinares foram coletados no momento da inoculação. Vinte e quatro explantes foram inoculados no meio de indução de calos e, posteriormente, no meio de regeneração de brotos, dos quais quatro foram coletados a cada 10 dias, totalizando ao final do experimento 7 coletas (uma no momento da inoculação e as outras 6 no decorrer do experimento). Esse material foi fixado em FAA50 (formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico 50%) por 48 horas e, em seguida, conservado em álcool etílico 70%. Em sequência, o material foi desidratado em série etílica (80%-1h, 90%-1h, 100%-1h e 100%-1h) e emblocado em historesina Leica, de acordo com o protocolo do fabricante com ligeiras modificações. Foram feitos cortes com espessura de 3 μm em micrótomo de rotação, os quais foram corados com azul de toluidina na concentração de 0,05% e visualizados em microscópio fotônico, (marca – ZEISS, modelo – AxioScope) na objetiva de 10X.

3.10 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo que o número de repetições e o número de parcelas foi específico para cada experimento realizado, conforme foi descrito acima. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 1999), por meio de ANAVA seguida do teste de médias *Scott - Knott* e para casos específicos foi usado o teste t para comparação de duas médias.

Ao final de cada experimento as seguintes características foram avaliadas visualmente: formação de calos, área do calo coberta por brotações e número de brotações. A avaliação foi feita por 3 avaliadores da seguinte forma:

- a) para formação de calos: contagem dos explantes, que formaram calo e divisão pelo número total de explantes para a obtenção da porcentagem de formação de calos;
- b) para área do calo coberta por brotações: 0%, 25%, 50%, 75% e 100% da área;
- c) número de brotações: contagem do número de brotações em cada calo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Indução de calos de explantes *ex vitro*, em meio de cultura, com os reguladores ANA e TDZ

Não foram obtidos resultados satisfatórios na regeneração de plantas a partir dos experimentos, utilizando ANA e TDZ no cultivo dos explantes *ex vitro*. Em todos os tratamentos, a maioria dos calos demonstrou sinais de oxidação, apresentando coloração escura. Além disso, apresentaram consistência não friável e não foi observada a regeneração de brotos. Foi observado também que o aumento da concentração de auxina de 0,009 μM para 0,09 μM promoveu a formação de calos maiores (Figura 1).

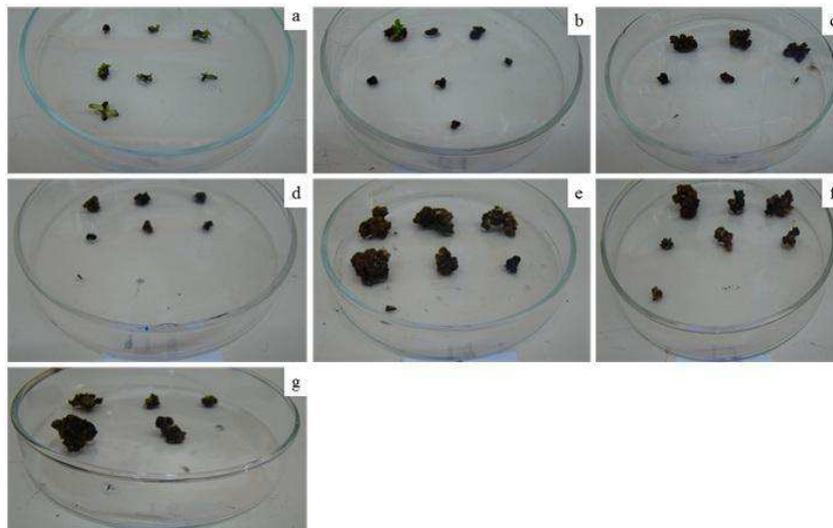


Figura 1 Calos oriundos de ápices caulinares do híbrido de *E. grandis* X *E. urophylla*, submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de ANA e TDZ, com 60 dias de cultivo. a – ausência de reguladores, b – 0,009 μM ANA e 0,5 μM TDZ, c – 0,009 μM ANA e 1,0 μM , d - 0,009 μM ANA e 1,5 μM TDZ, e – 0,09 μM ANA e 0,5 μM TDZ, f – 0,09 μM ANA e 1,0 μM TDZ, g – 0,09 μM ANA e 1,5 μM TDZ

Não houve diferença estatística na interação dos reguladores ANA e TDZ ($Pr = 0,9975$), ao nível de 5% de significância (APÊNDICE A).

Estes resultados demonstram que, embora os reguladores utilizados para indução de calos fossem capazes de induzir os mecanismos envolvidos na aquisição de competência do tecido, para realizar a desdiferenciação celular, a diferenciação e consequente regeneração de brotos pode não ter prosseguido pelo fato de ter ocorrido a oxidação dos calos.

Com o objetivo de obter organogênese indireta, observou-se em explantes foliares de *Eucalyptus benthamii* X *Eucalyptus urophylla*, ao utilizar 0,1 μM de ANA e diferentes concentrações de BAP (0; 0,4; 0,8; 2,2 e 4,4 μM), a oxidação dos calos formados e a não regeneração desses em brotações (CAUDURO, 2013).

Fatores endógenos, como fenóis, podem impedir a diferenciação em gemas adventícias, como foi observado por Cauduro et al. (2014), em explantes foliares de *Eucalyptus benthamii* X *Eucalyptus dunnii*, ao utilizarem 0,1 μM de ANA e 0,5 μM de TDZ para organogênese indireta. Plantas lenhosas acumulam polifenóis e produtos de oxidação como suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície excisada, as quais modificam a composição do meio de cultura e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000).

Outro fator que pode estar associado à capacidade dos explantes regenerarem gemas seria o seu próprio metabolismo hormonal, pois é ele que determinará, em última análise, o balanço hormonal endógeno para indução da organogênese (PERES; KERBAUY, 1999). Um exemplo claro relacionado à essa afirmação é mostrado em explantes com alta atividade da citocinina oxidase, enzima que degrada citocininas, no qual esses explantes podem não chegar a um balanço auxina/citocinina endógeno indutor da formação de gemas, mesmo que sejam adicionadas elevadas concentrações de citocininas ao meio de cultura (PERES, 2002).

Ao contrário do encontrado neste trabalho, Batista (2012) observou que o uso de 0,009 μM de ANA e 0,5 μM de TDZ para indução de calos foi o tratamento que apresentou os melhores resultados, em relação à presença de calos, presença de brotações e área do calo coberta por brotações, ao estudar um híbrido de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, porém utilizando um clone diferente do estudado aqui.

4.2 Indução de calos de explantes *ex vitro* com o regulador TDZ

O experimento conduzido apenas com o regulador TDZ para a indução de calos nas concentrações 0; 0,1; 0,5; 2,5 e 12,5 μM de TDZ, mostrou que os tratamentos com 0,1 μM e 12,5 μM de TDZ foram os que apresentaram maior formação de calos (Figura 2a). Já para as variáveis área do calo coberta por brotações e número de brotações, foi observado o decréscimo do valor dessas variáveis, em função do aumento da concentração de TDZ (Figuras 2b e 2c).

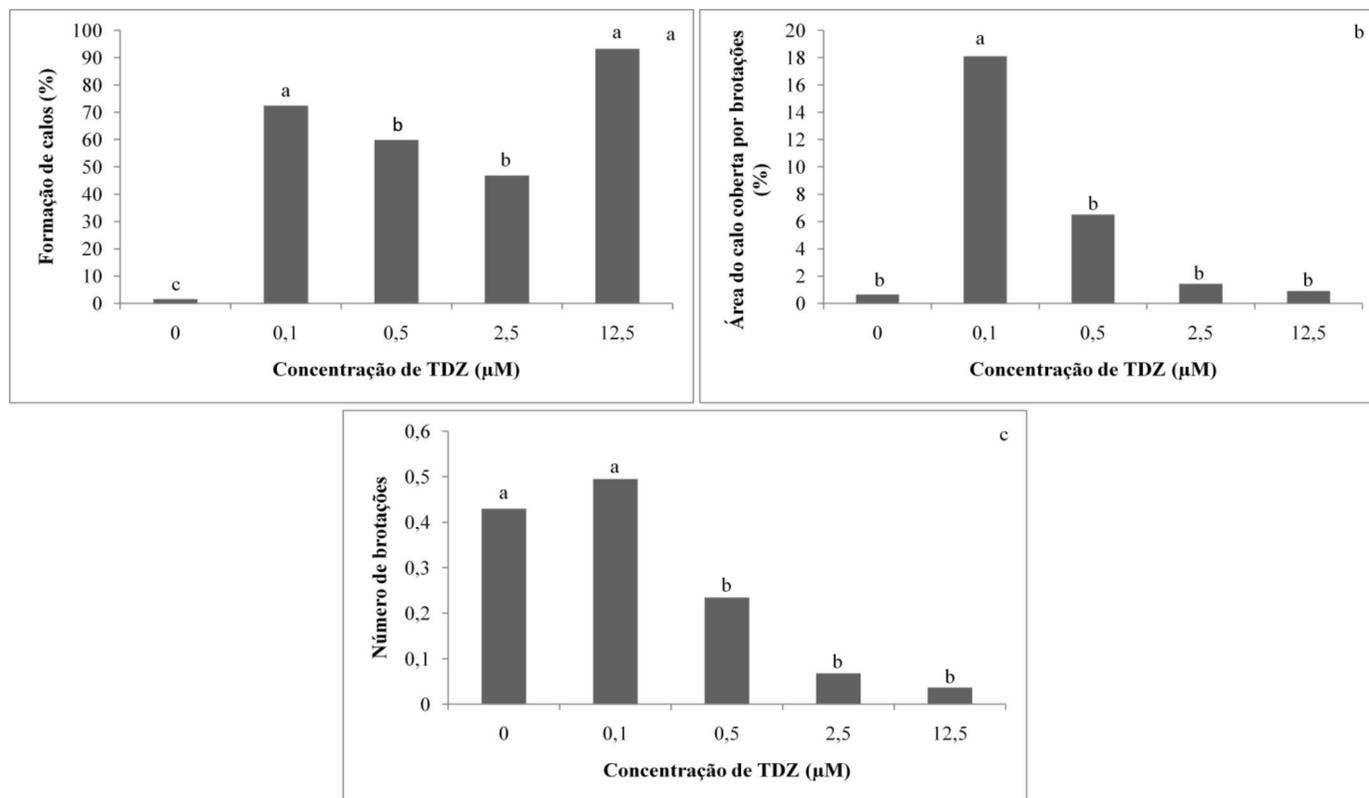


Figura 2 Experimento conduzido com 0; 0,1; 0,5; 2,5 e 12,5 μM de TDZ para a indução de calos, com explantes *ex vitro*, aos 60 dias de cultivo. a – Formação de calos; b – Área do calo coberta por brotações e c – Número de brotações

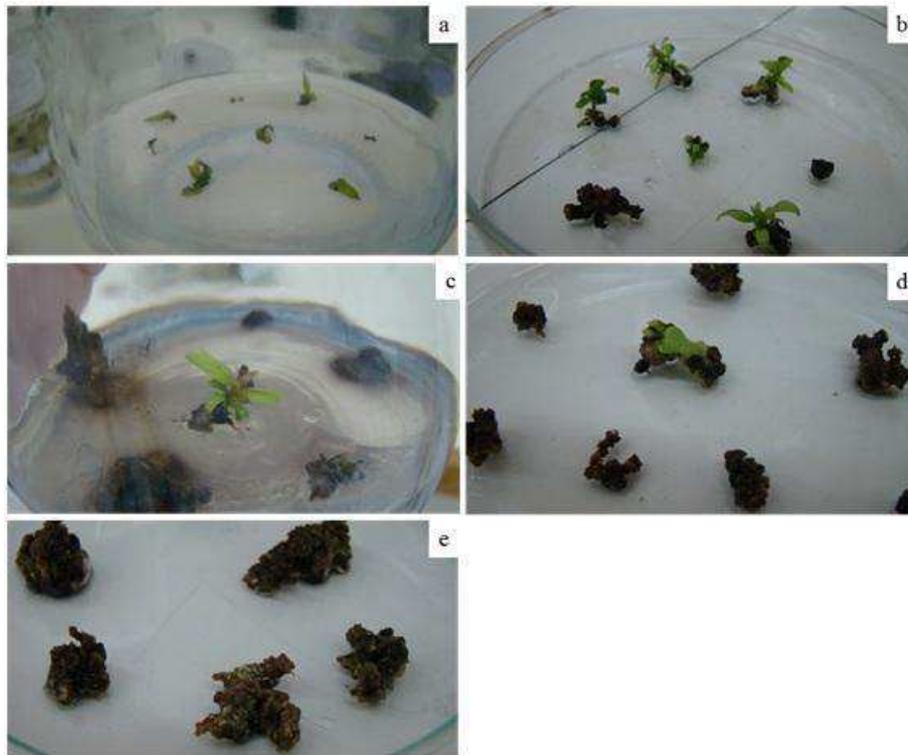


Figura 3 Calos oriundos de ápices caulinares do híbrido de *E. grandis* X *E. urophylla*, de origem *ex vitro*, submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de TDZ com 60 dias de cultivo. a – ausência de reguladores, b – 0,1 μM de TDZ, c – 0,5 μM de TDZ, d – 2,5 μM de TDZ, e – 12,5 μM de TDZ

Arenhart e Zaffari (2008) observaram que o uso isolado de TDZ, promoveu 100% da formação de calos, independente da concentração utilizada (2,3; 4,5 ou 9,1 μM) em explantes foliares e segmentos nodais de *Eucalyptus grandis*. Isso pode estar associado ao fato desse regulador de crescimento apresentar uma melhor atuação na obtenção de calos, em relação à outras citocininas (MURTHY; MURCH; SAXENA, 1998). E pode também estar relacionado a uma maior atividade citocinínica ou a uma forma de ação diferente de outras citocininas, durante os processos de dediferenciação e rediferenciação

celular (KANEDA et al., 1997). A elevada taxa de formação de calos pelo TDZ foi também observada por Alves, Xavier e Otoni (2004), ao utilizarem segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*.

Em relação ao experimento anterior, verificou-se que o uso do regulador TDZ isoladamente, além de promover a calogênese, também possibilitou a regeneração de gemas adventícias, embora em baixas taxas. Isso também foi verificado por Arenhart e Zaffari (2008), que após a indução de calos com o uso do regulador TDZ, utilizaram vários reguladores combinados ou isolados (BAP, ANA, TDZ e GA₃) e observaram as maiores taxas de regeneração de brotos nas combinações dos reguladores ANA e BAP, que foram os reguladores usados no presente estudo para a regeneração de brotações.

4.3 Indução de calos de explantes *in vitro* com o regulador TDZ

No experimento conduzido com o regulador TDZ utilizando as mesmas concentrações do experimento anterior, porém utilizando como explantes ápices caulinares de plantas *in vitro*, foi observada uma tendência de diminuição do número de brotações, em função do aumento da concentração de TDZ (Figura 4) aos 60 dias. E os explantes do tratamento 0,1 µM de TDZ apresentaram um maior número de brotações (Figura 5b), em relação aos demais tratamentos. Aos 90 dias, um número maior ainda de brotações é observado nos explantes do tratamento 0,1 µM de TDZ (Figura 6b). Para o número de brotações avaliado aos 60 dias, os explantes do tratamento 0,1 µM de TDZ apresentaram um valor médio de 3,29 (Figura 4). Para todas as variáveis analisadas, aos 90 dias, os gráficos apresentaram uma tendência de diminuição da variável analisada em função do aumento da concentração de TDZ. Com os explantes do tratamento 0,1 µM de TDZ apresentando uma área coberta por brotações > 60% (Figura 7a)

e um número de brotações próximo a 6 (Figura 7b). A variável formação de calos não apresentou diferença estatística.

Observa-se claramente que os explantes provenientes de plantas *in vitro* possuem um melhor comportamento (maior número de brotações), quando comparado com os explantes provenientes de plantas *ex vitro* (Figuras 3 e 5).

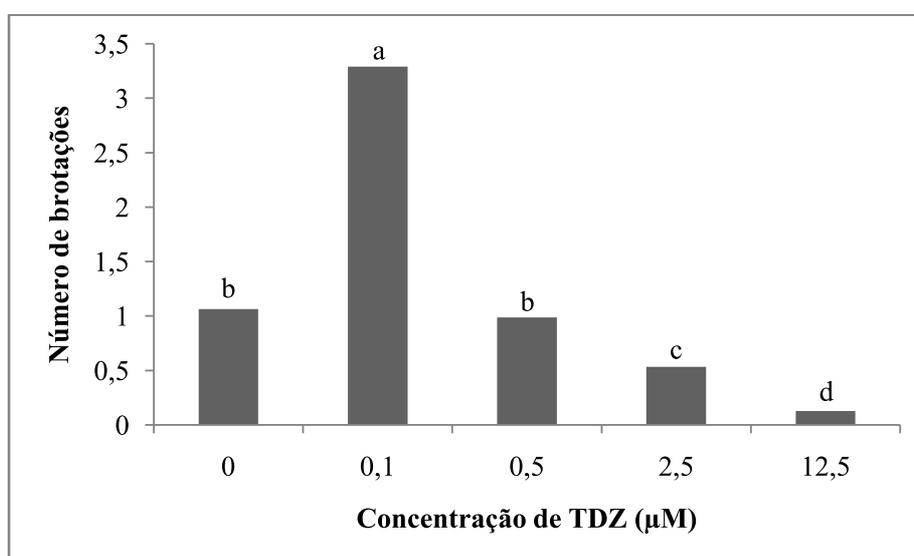


Figura 4 Experimento conduzido com 0; 0,1; 0,5; 2,5 e 12,5 µM de TDZ, com explantes *in vitro*, aos 60 dias de cultivo

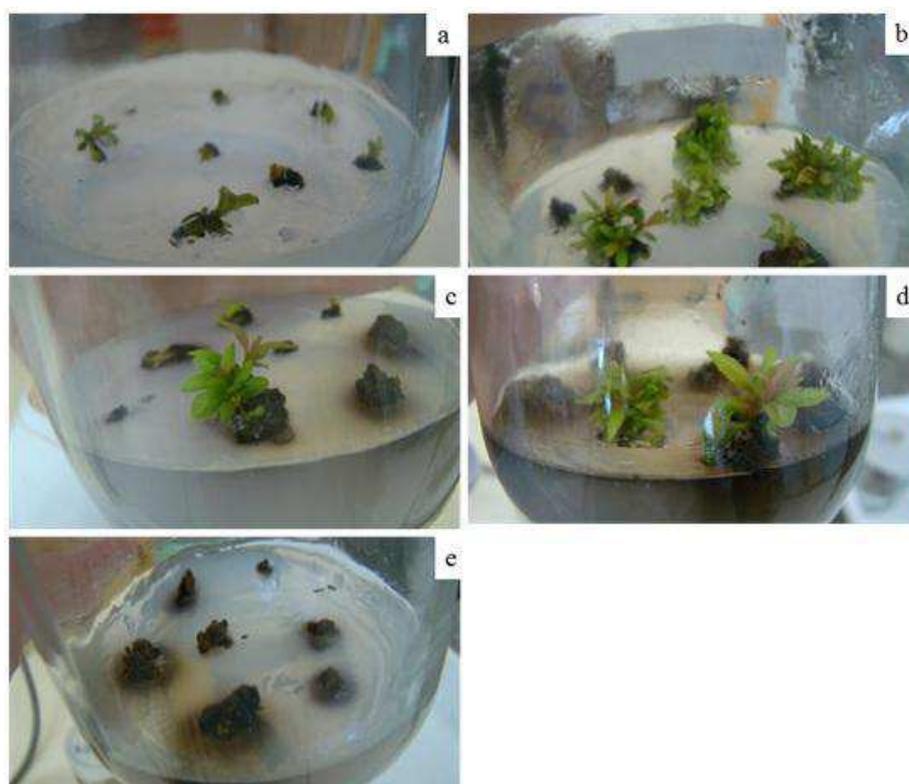


Figura 5 Calos oriundos de ápices caulinares de *E. grandis* X *E. urophylla*, de origem *in vitro*, submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de TDZ com 60 dias de cultivo. a – ausência de reguladores, b – 0,1 μM de TDZ, c – 0,5 μM de TDZ, d – 2,5 μM de TDZ, e – 12,5 μM de TDZ

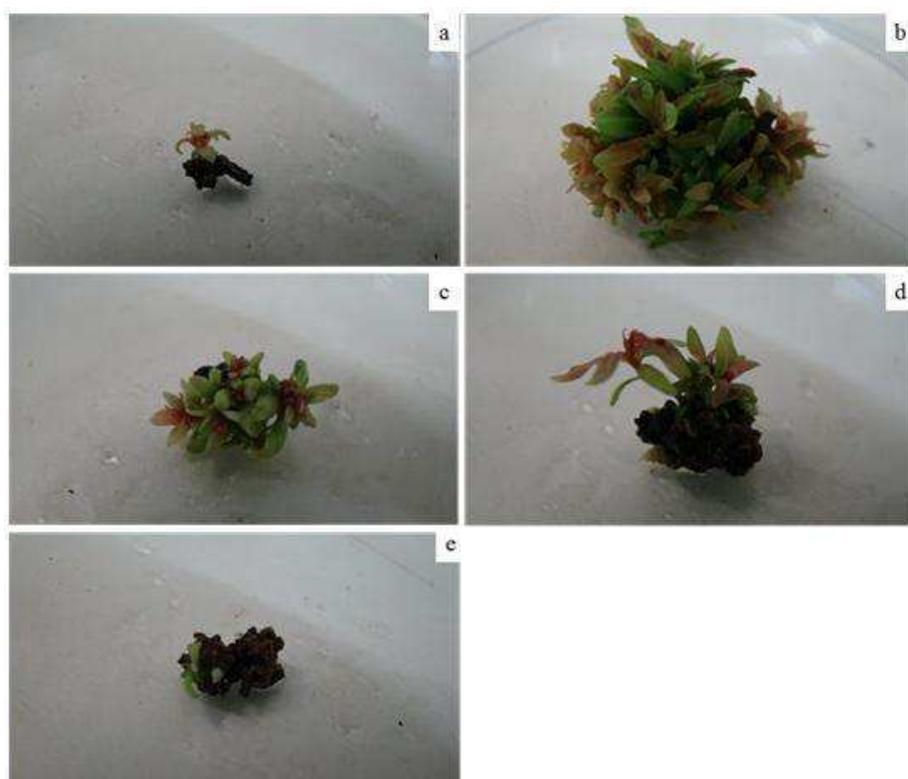


Figura 6 Calos oriundos de ápices caulinares de *E. grandis* X *E. urophylla*, de origem *in vitro*, submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de TDZ com 90 dias de cultivo. a – ausência de reguladores, b – 0,1 μ M de TDZ, c – 0,5 μ M de TDZ, d – 2,5 μ M de TDZ, e – 12,5 μ M de TDZ

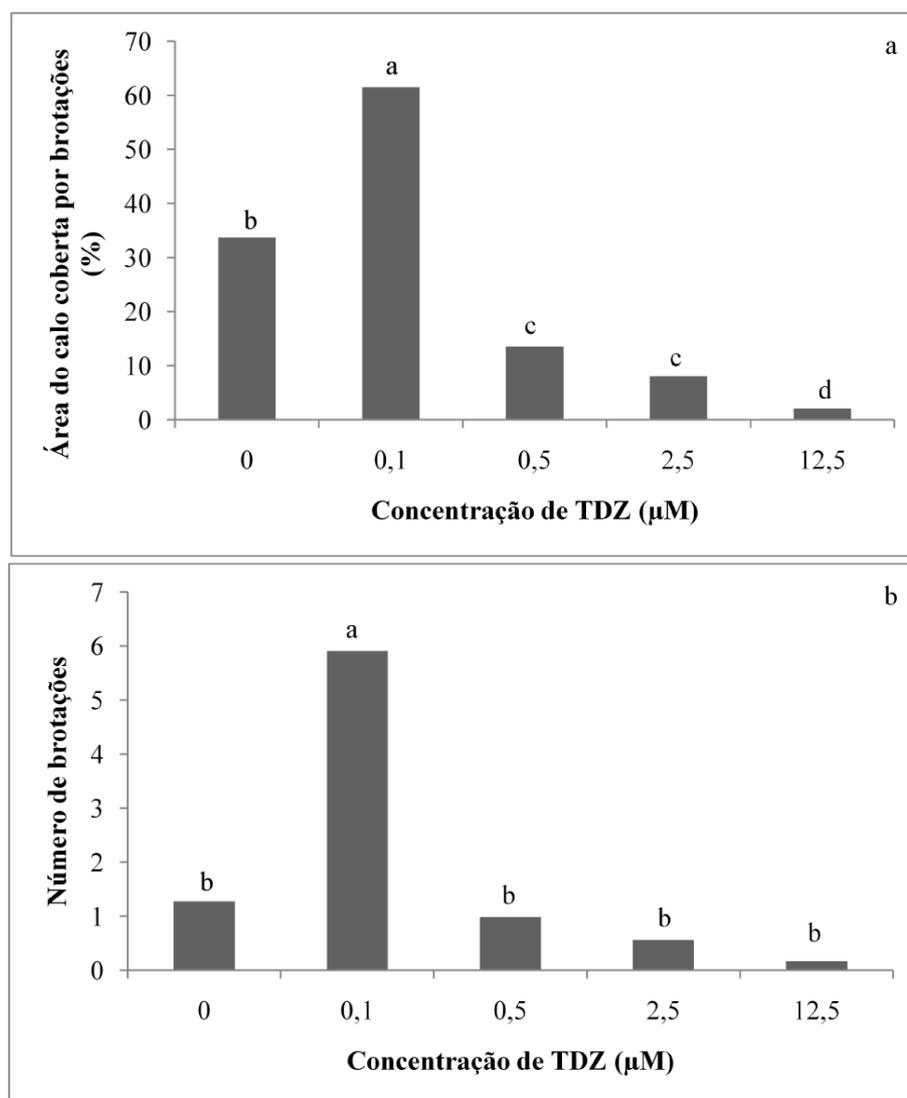


Figura 7 Experimento conduzido com 0; 0,1; 0,5; 2,5 e 12,5 µM de TDZ, com explantes *in vitro*, aos 90 dias de cultivo. a – Área do calo coberta por brotações e b - Número de brotações

Dibax et al. (2010a), ao estudarem a influência de diferentes concentrações de TDZ (1; 1,5; 2 µM) em meio MS, para a indução de calos e

regeneração de brotações, a partir de explantes foliares de *Eucalyptus saligna*, observaram maior formação de calos nas concentrações de 1 e 1,5 μM TDZ (73 e 72% respectivamente) e a maior regeneração de brotações (30%), na concentração de 1 μM de TDZ. O que corrobora com o presente estudo, em que a menor concentração de TDZ testada (0,1 μM) foi a que apresentou a maior regeneração de brotações.

Em folhas de *Eucalyptus benthamii* X *Eucalyptus dunnii*, a calogênese e regeneração de brotos ocorreu no meio com 0,5 μM de TDZ e não ocorreu no meio com 0,1 μM de TDZ, ao contrário do presente estudo, em que 0,1 μM de TDZ apresentou os melhores resultados (CAUDURO et al., 2014).

4.4 Otimização das concentrações do meio de indução com TDZ (explantes *in vitro*)

A fim de verificar se concentrações mais próximas à 0,1 μM de TDZ apresentariam resultados mais satisfatórios em relação às características analisadas anteriormente, um outro experimento foi realizado com o regulador TDZ, em concentrações próximas ao experimento anterior (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,15 e 0,20 μM).

Pode-se observar um maior número de brotações regeneradas no tratamento 0,1 μM de TDZ, em relação aos demais tratamentos (Figura 8d). A maior formação de calos ocorreu nos tratamentos com 0,05; 0,1; 0,15 e 0,20 μM de TDZ (Figura 9a). A maior área coberta por brotações foi observada nos tratamentos com 0,05 e 0,1 μM de TDZ e o maior número de brotações ocorreu no tratamento com 0,1 μM de TDZ (Figuras 9b e 9d). Os explantes do tratamento 0,1 μM de TDZ apresentaram os maiores valores. Sendo que os explantes apresentaram formação de calos de 94% (Gráfico 9a), área coberta por

brotações de 40,18% (Gráfico 4b) e um número de plantas maior que 7 (Gráfico 4d), aos 90 dias.

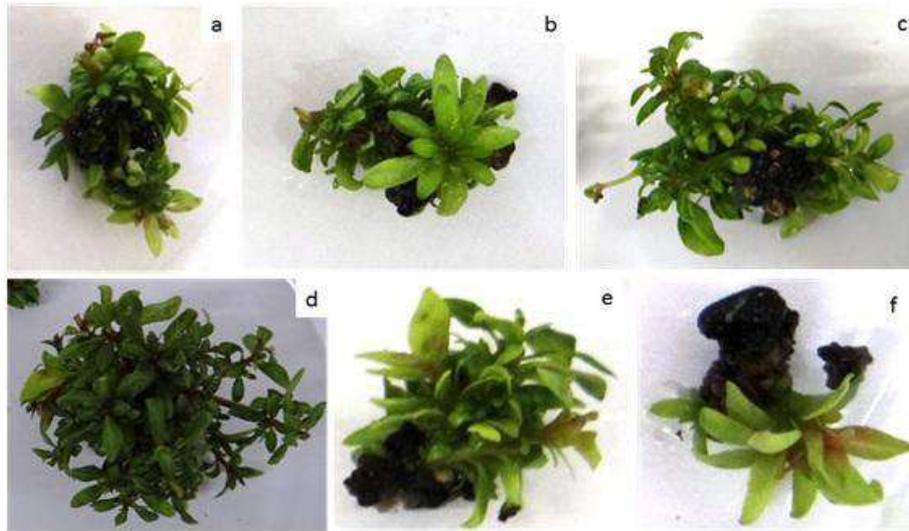


Figura 8 Calos oriundos de ápices caulinares de *E. grandis* X *E. urophylla*, de origem *in vitro*, submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de TDZ com 90 dias de cultivo. a – ausência de reguladores, b – 0,01 µM de TDZ, c – 0,05 µM de TDZ, d – 0,1 µM de TDZ, e – 0,15 µM de TDZ, f – 0,20 µM de TDZ

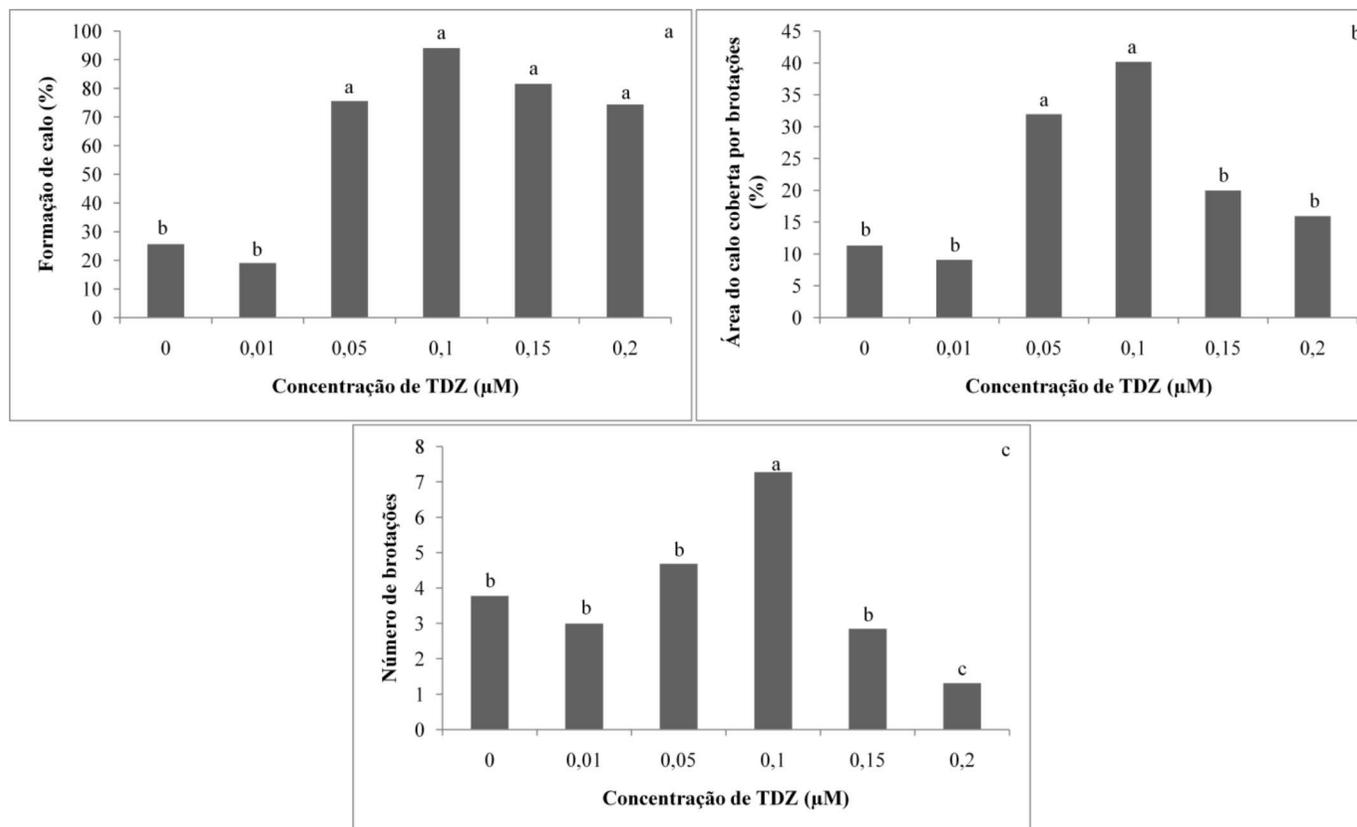


Figura 9 Experimento conduzido com 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,15 e 0,20 μM de TDZ com explantes *in vitro*, aos 90 dias de cultivo. a – Formação de calo; b - Área do calo coberta por brotações e c – Número de brotações

Desta forma foi visto que, entre 0,01 e 0,20 μM de TDZ, a concentração de 0,1 μM continua sendo a que apresenta os melhores resultados para as características avaliadas no presente estudo.

Grande parte dos trabalhos realizados com espécies de *Eucalyptus* relataram o uso do regulador TDZ, em concentrações variando de 0,05 a 2,5 μM . Dibax et al. (2010a) observaram que, para regeneração de brotações em calos, a melhor concentração de TDZ foi 1 μM associada 0,1 μM de ANA em *Eucalyptus saligna*. Nugent et al. (2001) observaram em cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus globulus* Labill., que brotações adventícias foram formadas em alta frequência com 0,05 μM de TDZ em combinação com 0,2 μM de 2,4-D ou 5 μM de ANA. Ao estudarem o efeito do nível do TDZ em *Eucalyptus microtheca* F. Muell foi observado que 2,3 μM de TDZ aumentou a produção de calos e estimulou a produção de gemas adventícias (MAMAGHANI et al., 2009).

4.5 Meio JADS e WPM (explantes *in vitro*)

Podemos observar um maior número de brotações nos calos provenientes do meio JADS (Figura 10a) em relação às brotações dos calos provenientes do meio WPM (Figura 10b).

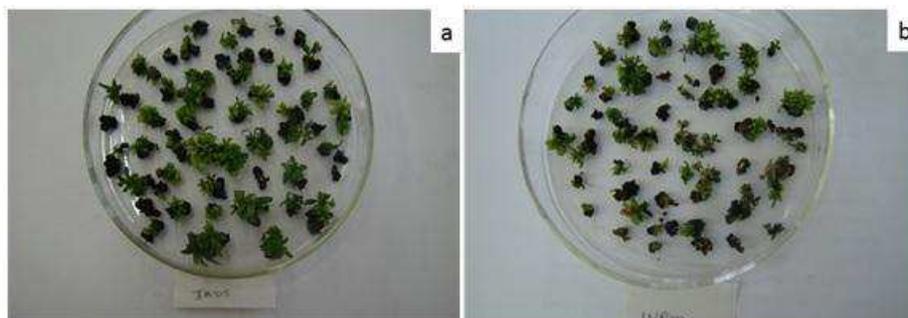


Figura 10 Calos oriundo de ápices caulinares de *E. grandis* X *E. urophylla*, de origem *in vitro*, submetidos aos tratamentos com o meio JADS e WPM com 60 dias de cultivo. a – meio JADS, b – meio WPM

A variável número de brotações foi a única que apresentou diferença estatística, sendo que o tratamento com o meio JADS apresentou um valor médio de 3,93 (Tabela 1).

Tabela 1 Experimento submetido aos tratamentos com os meios JADS e WPM, aos 60 dias de cultivo

Tratamento	Nº de brotações
JADS	3,9286 a
WPM	2,8631 b

Médias seguidas das mesmas letras são iguais a $P \leq 0,05$ de acordo com o teste t.

Um estudo testando os meios MS, WPM e JADS, na organogênese de explantes cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*, combinados com $2,7 \mu\text{M}$ de ANA e $4,4 \mu\text{M}$ de BAP, obteve maior formação de brotações nos meios MS (57,5%) e WPM (55%), enquanto no meio JADS houve apenas 35% da formação de brotações, porém o número de brotações não apresentou diferença estatística entre os diferentes meios, sendo que o valor médio observado foi de 4,17 (DIBAX et al., 2010b).

Ao estudar o efeito dos meios MS, WPM e JADS, adicionados de 1,11 μM de BAP, na multiplicação de *Eucalyptus benthamii* X *Eucalyptus dunnii*, observou-se nos 1º e 2º subcultivos um maior número médio de brotos por explante (9,28 e 9,24 respectivamente), no meio MS, sendo que nos demais meios testados não houve diferença significativa. Já nos demais subcultivos não houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo que o número de brotos médio no 3º subcultivo foi 8 e no 4º subcultivo foi 8,1 (CAUDURO, 2013).

Ao serem testados os meios de cultura MS e JADS, durante a multiplicação de 21 clones de híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e seis clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus*, encontraram-se melhores resultados em meio MS (0,6 a 3,8 brotações médias) do que em meio JADS (0,4 a 3,0 brotações médias), na segunda e terceira introdução *in vitro* (BORGES et al., 2011).

O meio JADS (CORREIA et al., 1995) foi formulado com reduções significantes das concentrações de sais minerais, principalmente de íons potássio, quando comparado ao meio MS, e mostrou resultados positivos para a micropropagação de *Eucalyptus grandis*.

A eficiência da micropropagação de eucalipto é altamente influenciada pelo balanço iônico do meio de cultura. Estudos baseados nas características nutricionais entre diferentes espécies são cruciais para o estabelecimento do meio ideal para a cultura *in vitro* do eucalipto (RODRIGUES; VENDRAME, 2003).

4.6 Gema apicais e axilares (explantes *in vitro*)

Como pode ser observado as gemas apicais apresentaram um maior número de brotações (Figura 11a), em relação às gemas axilares (Figura 11b). Para todas as variáveis analisadas, as gemas apicais apresentaram os maiores

valores (Tabela 2). Apenas para a variável formação de calo, não houve diferença significativa.

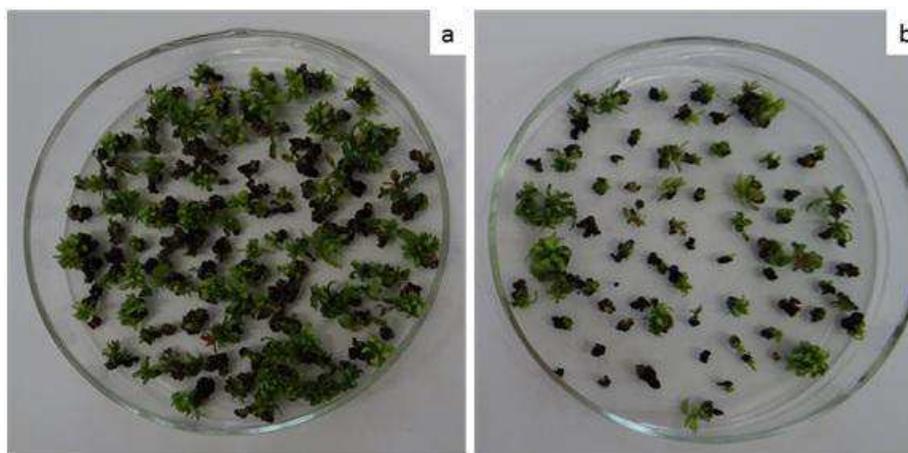


Figura 11 Calos oriundos de ápices caulinares de *E. grandis* X *E. urophylla*, de origem *in vitro*, submetidos aos tratamentos com gemas apicais e axilares com 60 dias de cultivo. a – gemas apicais, b – gemas axilares

Tabela 2 Experimento submetido aos tratamentos com gemas apicais e laterais, aos 60 dias de cultivo

Tratamento	Área do calo coberta por brotações	Número de brotações
Gema apical	46,7708 a	2,9458 a
Gema axilar	23,1101 b	1,4083 b

Médias seguidas das mesmas letras são iguais a $P \leq 0,05$ de acordo com o teste t.

Ao contrário do observado no presente estudo, Schuch, Erig e Silva (2003), ao estudarem o efeito de gemas apicais e axilares para indução de brotações em macieira, não encontraram diferença estatística quanto à indução de brotações, em relação a esses dois explantes, sendo que a média de brotações, por explante, foi de 2,14.

Já Alcantara, Bespalkok Filho e Quoirin (2011), observaram que o uso da porção basal de folhas de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, ao invés da porção apical, promoveu uma maior regeneração de brotos.

4.7 Curva de crescimento dos calos

Os resultados das avaliações de crescimento dos calos podem ser observados nos gráficos abaixo relativo ao peso médio dos calos (Figura 12a), percentual de crescimento (Figura 12b) e taxa de crescimento médio (Figura 12c) e esses referem-se a dados de crescimento reais já que os mesmos calos foram pesados em todos os 14 pontos, durante o experimento.

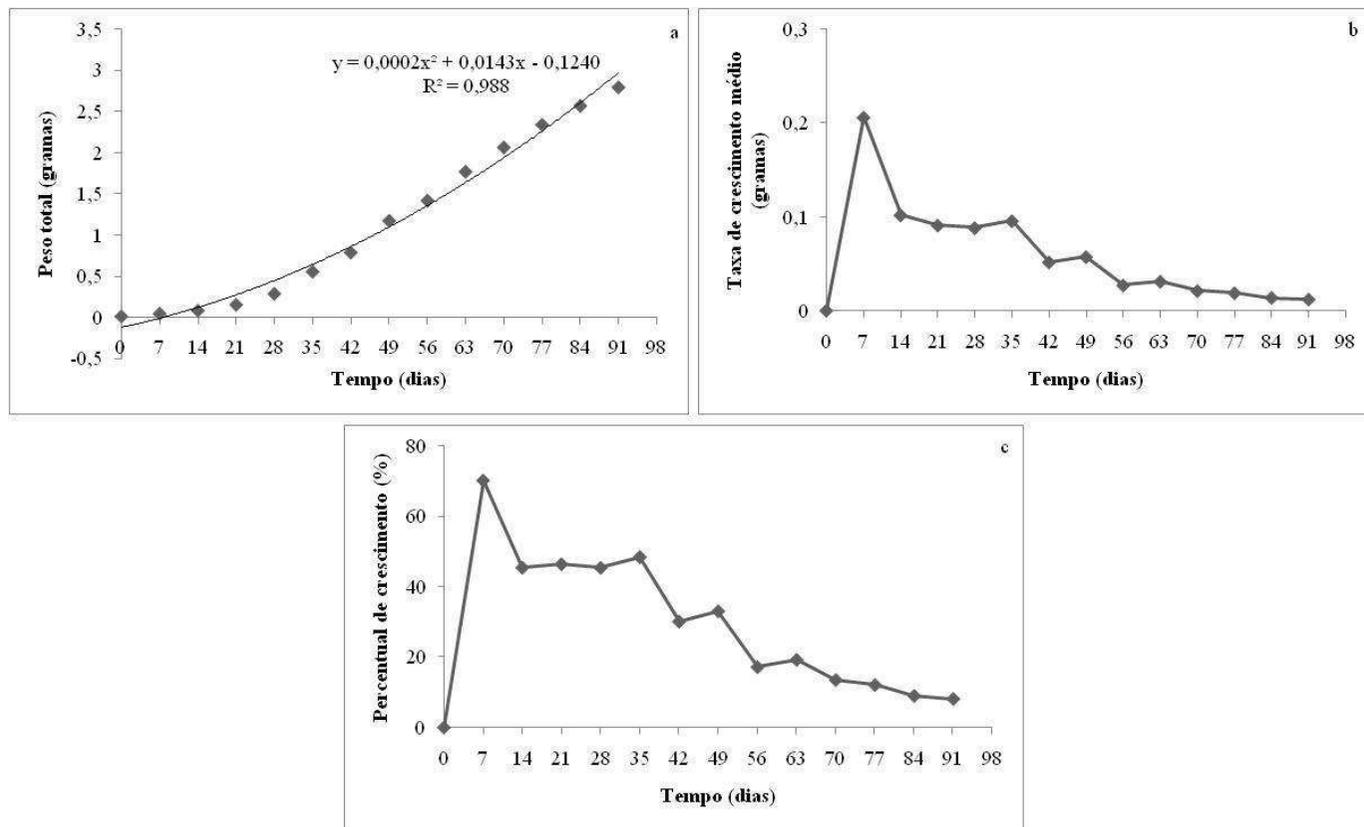


Figura 12 Acompanhamento do crescimento dos calos de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. a – Peso médio dos calos (gramas/dia); b – Taxa de crescimento médio (gramas/dia); c – Percentagem de crescimento (%/dia)

A curva de crescimento dos calos apresentou um padrão do tipo sigmóide, com tendência de ganho de matéria fresca, em função do aumento do tempo de cultivo. No período analisado (91 dias de cultivo), quatro diferentes fases de crescimento foram observadas - lag, exponencial, linear, e desaceleração, não sendo detectadas as fases estacionária e de declínio.

A fase lag, em que as células se preparam para a divisão celular, acumulando biomassa, ocorreu de 0 a 7 dias, período em que foi observada a maior taxa de crescimento (0,21 g/dia) e o maior percentual de crescimento (70,24%). Estudos têm demonstrado que a fase lag varia de acordo com a espécie estudada. Mendonça et al. (2012) observaram a ocorrência da fase lag no período de 0 a 9 dias em *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Já em pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), a fase lag ocorreu de 0 a 15 dias (FEITOSA et al., 2013).

A fase exponencial, em que se tem a máxima divisão celular, ocorreu no período de 7 a 35 dias, com uma taxa de crescimento médio de 0,12 g/dia e percentual de crescimento de 51,86%. Batista (2012) observou essa fase do 7º ao 49º dia de crescimento dos calos no híbrido *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, porém utilizando um clone diferente do estudado aqui. Mendonça et al. (2012) observaram essa fase em *Eucalyptus camaldulensis* Dehn do 9º ao 36º dia.

O crescimento linear, período em que ocorre diminuição da divisão e aumento da área celular, foi observado entre 35 e 63 dias de cultivo, apresentando uma taxa de crescimento médio de 0,05 g/dia e percentual de crescimento de 29,6%. Em outro clone de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, Batista (2012) observou a ocorrência desse período entre 49 e 64 dias, porém com uma taxa de crescimento médio de 0,04g/dia e um percentual de crescimento de 23,21%. Já Mendonça et al. (2012) observaram a ocorrência dessa fase entre 36º e 81º dias de cultivo, com uma taxa de crescimento médio de 0,08 g/dia e um percentual de crescimento de 17%. Feitosa et al. (2013)

observaram essa fase entre 40 e 45 dias, após a inoculação de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.).

A fase de desaceleração, fase em que ocorre provavelmente uma redução da divisão celular, ocorreu no intervalo de 63 a 91 dias com uma taxa de crescimento médio de 0,02 g/dia e um percentual de crescimento de 12,39%. Mendonça et al. (2012) observaram essa fase entre 81 e 90 dias, com uma taxa de crescimento médio de 0,07 g/dia e um percentual de crescimento de 2%.

4.8 Análises histológicas

As análises histológicas corroboram com a curva de ganho de peso dos calos, com uma intensa proliferação de células ocorrendo até os 40 dias após a inoculação dos explantes, o que concorda com o crescimento exponencial que ocorre entre o 7° e 35° dia. Após esse período, tem-se a desdiferenciação de células em estruturas referentes às brotações, o que ocorre juntamente com a fase de crescimento linear dos calos (Figura 13f e 13g).

Na Figura 8^a, observa-se o explante inicial inoculado, composto pelo meristema apical, primórdios foliares e folhas. A Figura 13b representa o início da formação de calos, ou seja, o começo da desdiferenciação celular do ápice caulinar depois de 10 dias da inoculação.

Aos 20 e 30 dias de inoculação, observam-se os calos formados, estruturas em formato globular com células do parênquima de transfusão e começo da formação da protoderme, e há também um aumento da densidade celular devido ao aumento das divisões celulares (Figuras 13c e 13d).

Aos 40 dias, a protoderme encontra-se em um estágio mais avançado e tem-se a diferenciação do procâmbio (Figura 13e). Aos 50 e aos 60 dias, tem-se um estágio de diferenciação mais avançado, podendo ser observado pela presença do meristema apical, início da formação de feixes vasculares e

primórdios foliares (Figuras 13f e 13g). Aos 50 dias, também se observa claramente que a brotação se origina do calo pré-formado (Figura 13f).

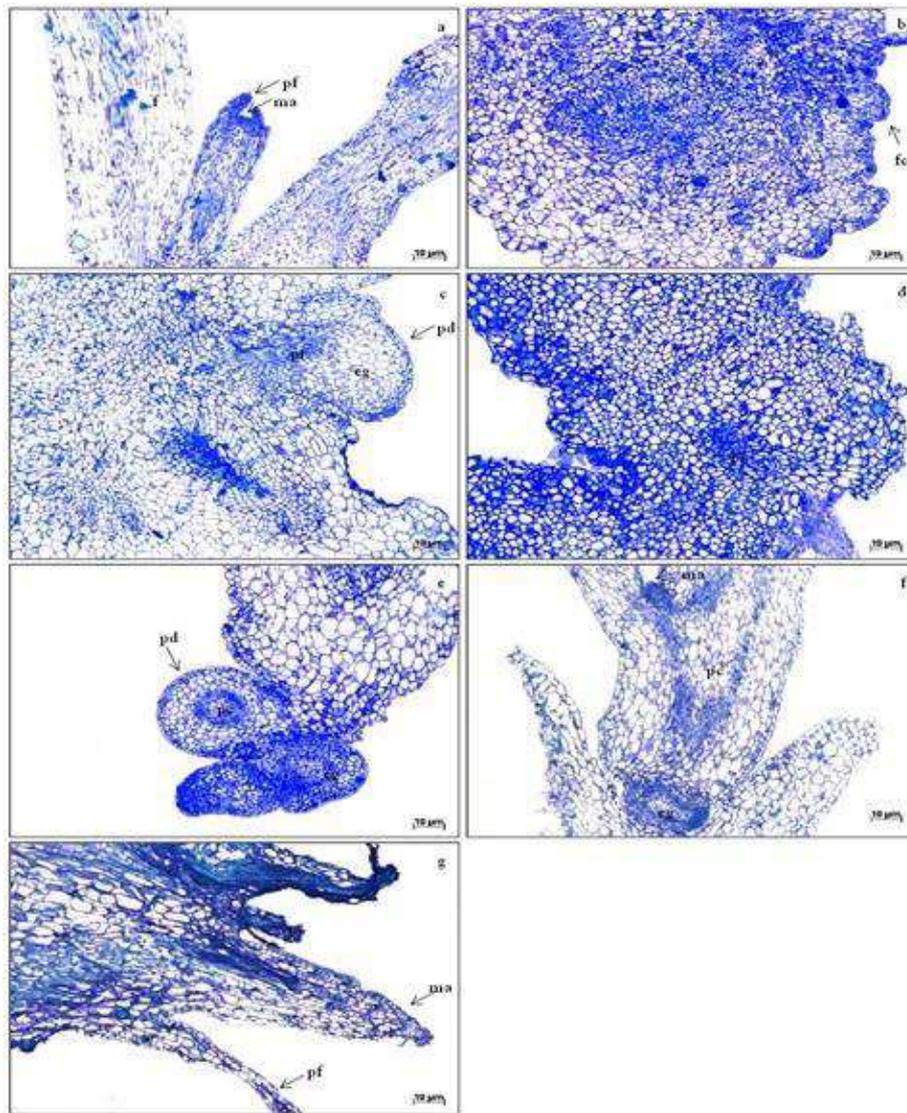


Figura 13 Cortes histológicos corados com azul de toluidina do explante inicial e calos oriundos de ápices caulinares de *E. grandis* X *E. urophylla*, de origem *in vitro*, inoculados em meio JADS. a – no momento da inoculação, b- 10 dias, c – 20 dias, d - 30 dias, e – 40 dias, f – 50 dias e g- 60 dias após a inoculação. f- folha, ma- meristema apical, pf- primórdio foliar, fc- formação de calo, pt- parênquima de transfusão, pd- protoderme, eg – estrutura globular, pc- procâmbio

Análises histológicas em estudos de organogênese *in vitro* são importantes para confirmar a origem ontogênica das brotações diferenciadas (AGGARWAL; KUMAR; REDDY, 2010).

Os estudos histológicos realizados neste trabalho mostram que as brotações se diferenciaram das camadas superficiais dos calos (Figura 13f). A atividade meristemática foi observada nas células dos calos, as quais posteriormente se diferenciaram em brotações. Mostrando dessa forma a conexão vascular entre os brotos formados e os tecidos que os deu origem.

Hervé et al. (2001) destacam ainda a importância de se conhecer o exato local em que ocorrem as divisões antes da formação do calo, para estudos de transformação genética, o que vai indicar a origem dos brotos adventícios. Fato que irá possibilitar estabelecer protocolos de infecção em estudos de transformação genética.

5 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um protocolo de organogênese para o híbrido de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*, utilizando-se a concentração de 0,1 μ M de TDZ, o explante gema apical e o meio JADS, para a indução dos calos e posterior regeneração de brotos.

Através das análises de crescimento dos calos e histologia, o protocolo estabelecido mantém o material em alto potencial de desenvolvimento por um longo período. Através do protocolo estabelecido, seu uso torna-se viável para trabalhos de transformação genética.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Shoot organogenesis in elite clones of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 152, n. 1, p. 45-52, July 2010.

ALCANTARA, G. B.; BESPALHOK FILHO, J. C.; QUOIRIN, M. Organogenesis e transient genetic transformation of the hybrid *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.68, n.2, p. 246-251, 2011.

ALVES, E. C. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese *in vitro* a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden X *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 28, n. 5, p. 643-653, set./out. 2004.

ANDRADE, M. W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p.174-180, jan./fev. 2000.

ANDRADE, W. F. **Atuação de “pulse” na organogênese de *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro***. 2006. 55 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2006.

ARENHART, R. A.; ZAFFARI, G. R. Otimização do protocolo de micropropagação por organogênese indireta de *Eucalyptus grandis*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.7, n.1, p.16-22, 2008.

ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Híbridação e clonagem. In: BOREM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 93-121.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS. Glossário de cultura de tecidos de plantas. **Plant Cell Culture e Micropropagation**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 1-60, 2011.

BARRUETO CID, L. P.; ILLG, R. D.; PIEDRABUENA, A. E. Regeneration of garlic plants (*Allium sativum* L., cv “Chonan”) via cell culture in liquid medium. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, Wallingford, v. 30, n. 3, p. 150-155, July 1994.

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2010. p.18-31.

BATISTA, T. R. **Organogênese e embriogênese somática de híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla***. 2012. 74 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

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.

CAUDURO, Y. O. **Organogênese indireta em *Eucalyptus benthamii* X *Eucalyptus dunnii* e transformação genética de *Eucalyptus saligna* e *Nicotiana tabacum***. 2013. 154 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

CAUDURO, Y. O. et al. Organogênese indireta a partir de explantes foliares e multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus benthamii* X *Eucalyptus dunnii*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 2, p. 347-355, abr./jun. 2014.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. **Guia do eucalipto: oportunidades para um desenvolvimento sustentável**. Disponível em: <http://cib.org.br/wpcontent/uploads/2011/10/Guia_do_Eucalipto_junho_2008.pdf>. Acesso em: 27 out. 2013.

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.

DHAR,U.; JOSHI, M. Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew (Asteraceae): effect of explants type, age, and plant growth regulators. **Plant Cell Reports**, New York, v. 24, n. 4, p. 195-200, June2005.

DIBAX, R. et al. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with *P5CS* gene. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 54, n. 1, p. 6-12, 2010a.

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, Mar./Apr. 2010b.

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

ECHEVERRIGARAY, S. et al. Cultura de tecidos e micropropagação de plantas aromáticas e medicinais. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001. p. 257-276.

FAMIANI, F. et al. Effect of leaf excision time and age, BA concentration and dark treatments on *in vitro* shoot regeneration of M.26 apple rootstock. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v.69, n. 4, p. 679-685, 1994.

FEITOSA, L. S. et al. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 370-377, mar./abr. 2013.

FERREIRA, D. F. **Sisvar 4.3**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 1999. Software.

GEORGE, E. F.; HALL, M. H.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3rd ed. Berlin: Springer, 2008. v. 1, 501 p.

GIRI, C. C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, Berlin, v. 18, n. 2, p. 115-135, Mar. 2004.

GIRIJASHANKAR, V. Genetic transformation of eucalyptus. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New York, v. 17, n. 1, p.9-2, 2011.

GOLLEL, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R. Melhoria florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1606-1613, 2009.

HERVÉ, P. et al. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative. **Phytology Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 4, p. 645-653, Sept. 2001.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. **IBÁ 2014, ano base 2013**. Disponível em: <http://www.bracelpa.org.br/shared/iba_2014_pt.pdf>. Acesso em: 10fev. 2015.

KANEDA, Y. et al. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.17, n. 1, p.8-12, Nov. 1997.

KOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, New York, v. 54, p. 118-130, 1957.

LAINÉ, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, n. 8, p. 473-476, May 1994.

LAMEIRA, A. O. et al. Estabelecimento da curva de crescimento em calos de Erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.). **Horticultura Brasileira**, Campinas, v. 4, n. 1, p. 92-93, 1996.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Bellefonte, v. 30, p. 421-427, 1980.

LONGUE JÚNIOR, D.; COLODETTE, J. L. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 429-438, 2013.

MAMAGHANI, M. S. et al. The effect of thidiazuron level on *in vitro* regeneration type and peroxidase profile in *Eucalyptus microtheca* F. Muell. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 59, n. 3, p. 199-205, Dec. 2009.

MENDONÇA, E. G. et al. Growth curve and development of the internal calli structure of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.55, n. 6, p.887-896, Nov./Dec. 2012.

MORA, A. L.; GARCIA, C. H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2002. 114 p.

MORALEJO, M. et al. Generation of transgenic *Eucalyptus globules* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 25, n. 2, p. 207-212, 1998.

MOTTE, H. et al. The molecular path to *in vitro* shoot regeneration. **Biotechnology Advances**, New York, v. 32, n. 1, p. 107-121, Jan./Feb. 2014.

MOURA, V. P.; GUIMARÃES, D. P. **Produção de mudas de *Eucalyptus* para o estabelecimento de plantios florestais**. Brasília: CENARGEM, 2003. 9 p. (Comunicado Técnico, 85).

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

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Development Biology- Plant**, Wallingford, v.34, n. 4, p.267- 275, Oct./Dec. 1998.

NUGENT, G. et al. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus* Labill. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 37, p. 388-391, May/June 2001.

PERES, L. E. P. As bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*: um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 25, p. 44-48, 2002.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 18, n. 12, p. 1002-1006, 1999.

PINTO, G. **Regeneração de plantas de *Eucalyptus globulus* por embriogênese somática**. 1997. 89 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 1997.

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

RIBEIRO, S. R. **Regeneração e transformação em *Eucalyptus grandis***. 2012. 54 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2012.

RODRIGUES, A. P. M.; VENDRAME, W. A. Micropropagation of tropical woody species. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 153-179.

SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; CORDER, M. P. M. Genetic transformation: strategies for forest species breeding. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 861-871, maio/jun. 2008.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C.; SILVA, L. C. Indução de brotações em gema apical e axilar do porta-enxerto de macieira 'EM-9' cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n.2, p. 361-362, 2003.

SU, Y. H.; LIU, Y. B.; ZHANG, X. S. Auxin-citokinin interaction regulates meristem development. **Molecular Plant**, Saint Paul, v. 4, n. 4, p. 616-625, 2011.

TEIXEIRA, J. B. et al. **Multiplicação clonal de café (*Coffea arabica* L.) via embriogênese somática**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 39 p. (Documentos, 121).

THORPE, T. A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 37, n. 2, p. 169-180, Oct. 2007.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. 864 p.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v.1, p.133-145.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 272p.

YASEEN, M. et al. Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 40, n. 4, p. 2837-2849, Apr. 2013.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Análise de variância dos dados submetidos à regressão polinomial, do experimento submetido às diferentes concentrações de ANA e TDZ combinados, aos 60 dias de cultivo.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ANA	2	0,3448	0,1724	1,5970	0,2146 ^{ns}
TDZ	3	0,6568	0,2189	2,0280	0,1246 ^{ns}
ANA*TDZ	1	-0,0905227	-9,0523E-02	-0,838	0,9975 ^{ns}
Erro	42	4,534918	0,107974		
Total corrigido	48	5,44972			

^{ns} não significativo ao nível de 5% de probabilidade.