



MARIA LOPES MARTINS AVELAR

METODOLOGIAS PARA O CULTIVO *in vitro* DE *Eucalyptus pilularis* Smith VISANDO O RESGATE E A CLONAGEM DE PLANTAS SELECIONADAS

LAVRAS-MG

2022

MARIA LOPES MARTINS AVELAR

**METODOLOGIAS PARA O CULTIVO *in vitro* DE *Eucalyptus pilularis* Smith
VISANDO O RESGATE E A CLONAGEM DE PLANTAS SELECIONADAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Gilvano Ebling Brondani

Orientador

LAVRAS-MG

2022

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

Avelar, Maria Lopes Martins.

Metodologias para o cultivo *in vitro* de *Eucalyptus pilularis*
Smith visando o resgate e a clonagem de plantas selecionadas /
Maria Lopes Martins Avelar. - 2022.

113 p. : il.

Orientador(a): Gilvano Ebling Brondani.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.
Bibliografia.

1. Micropropagação. 2. Clonagem. 3. Melhorias no ambiente de
cultivo *in vitro*. I. Brondani, Gilvano Ebling. II. Título.

MARIA LOPES MARTINS AVELAR

**METODOLOGIAS PARA O CULTIVO *in vitro* DE *Eucalyptus pilularis* Smith
VISANDO O RESGATE E A CLONAGEM DE PLANTAS SELECIONADAS**

**METHODOLOGIES FOR THE *in vitro* CULTURE OF *Eucalyptus pilularis* Smith
AIMING TO RESCUE AND CLONING SELECTED PLANTS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Ciências Florestais, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 29 de setembro de 2022.

Gilvano Ebling Brondani – UFLA

Maristela Machado Araujo – UFSM

Leandro Silva de Oliveira – UFMG

Ezequiel Gasparin – UFSM

Alexandre Alves de Carvalho – UFLA

Prof. Dr. Gilvano Ebling Brondani

Orientador

LAVRAS-MG

2022

A Deus, a minha família, aos meus amigos, aos que orientaram, ensinaram, apoiaram e, que de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade concedida para ter chegado até aqui.

Aos meus pais, Maraise e Júlio Márcio, pelo amor, apoio, incentivo e paciência, por tudo que me proporcionaram no decorrer desta caminhada.

As minhas avós, Marlize e Marisa, pelas orações, pelo amor, pela dedicação que sempre tiveram.

Aos meus tios e tias, Eia, Marcinho, Lúdia e Marcelo, pelas conversas, conselhos e por acreditarem em mim.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciências Florestais (DCF), pela oportunidade concedida para a realização da Pós-Graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brasil (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG), pelo apoio financeiro (número CNPq: 304058/2019-0, 405025/2018-1; número FAPEMIG: CAG-APQ-00273 -16) e bolsas de estudo para os alunos.

Aos professores, técnicos e colegas de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Florestais, pelos ensinamentos transmitidos e pela agradável convivência.

Ao professor Gilvano Ebling Brondani pela orientação, paciência, amizade, dedicação e ensinamentos que foram de grande importância para a realização deste trabalho e para meu crescimento profissional.

RESUMO GERAL

A indução de brotos epicórmicos em galhos podados aliada a técnica de micropropagação podem ser utilizadas para promover o rejuvenescimento/revigoramento de tecidos e resgatar árvores adultas de eucalipto em testes de espécies e procedências com potencial para aplicações industriais. Apesar dos plantios inexpressivos no Brasil, a espécie *Eucalyptus pilularis* apresenta grande potencialidade para serraria e laminação no sudeste do país. A propagação *in vitro* de espécies lenhosas, principalmente com avançada idade ontogenética, ainda apresenta entraves, tornando-se necessária a definição de metodologias que promovam melhorias no ambiente de cultivo *in vitro*. Dessa forma, o objetivo geral do trabalho foi definir metodologias para melhorar as respostas morfofisiológicas no estabelecimento, na multiplicação, no alongamento e no enraizamento *in vitro* de *E. pilularis* com idade cronológica de 44 anos, sendo dividido em quatro capítulos. No capítulo 1, objetivou-se avaliar duas origens de tecidos e quatro métodos de inoculação no estabelecimento *in vitro* da espécie. De acordo com os resultados, somente foi possível estabelecer explantes provenientes de tecidos com menor idade ontogenética, e recomenda-se a utilização de carvão ativado, PVP30 e exposição à luz nessa fase da micropropagação para *E. pilularis*. Para o capítulo 2, o objetivo foi avaliar indução de gemas e brotos epicórmicos, o estabelecimento, a multiplicação por 15 subcultivos, a fidelidade genética e o alongamento *in vitro*, testando duas concentrações de BAP e ANA, de três matrizes da espécie (M1, M2 e M3). Somente foi possível estabelecer, multiplicar e alongar explantes provenientes da M3, sendo recomendada a concentração de 0,10 mg L⁻¹ de BAP combinada com 1,0 mg L⁻¹ de ANA no alongamento *in vitro*. Não houve constatação de polimorfismo após a multiplicação *in vitro*. O objetivo do terceiro capítulo foi avaliar o efeito de fontes de carbono, na multiplicação e no alongamento *in vitro*, e concentrações da melhor fonte de carbono e sistemas de vedação dos frascos no alongamento e no enraizamento *in vitro* da espécie. A utilização de glicose resultou nas melhores respostas na multiplicação e no alongamento *in vitro* de brotações em tubos, e os melhores no alongamento e no enraizamento *in vitro* em frascos contendo tampas com uma membrana porosa, na concentração de 30 g L⁻¹. No capítulo 4, objetivou-se avaliar o efeito da qualidade de luz e de concentrações de glicose na multiplicação e no alongamento *in vitro* da espécie. A utilização da lâmpada fluorescente e das LEDs V:A e a suplementação do meio com 30 g L⁻¹ de glicose resultaram nas maiores médias para as características avaliadas na multiplicação e no alongamento *in vitro*. As metodologias testadas demonstram as melhorias possíveis no cultivo *in vitro* de *E. pilularis* com avançada idade ontogenética e a importância da aplicação da clonagem em larga escala, por meio das técnicas utilizadas para espécies de eucalipto.

Palavras-chave: Micropropagação. Clonagem. Trocas gasosas. Fonte de carbono. Qualidade de luz.

ABSTRACT

The induction of epicormic shoots in pruned branches together with micropropagation can be used to promote tissue rejuvenation/reinvigoration and rescue adult eucalypts trees in tests of species and provenances with potential for industrial applications. Despite the inexpressive plantations in Brazil, the species *Eucalyptus pilularis* has great potential for sawmilling and laminating in the Southeast of the country. *In vitro* propagation of woody species, mainly with advanced ontogenetic age, still presents obstacles, making it necessary to define methodologies that promote improvements in the *in vitro* culture environment. Thus, the general aim of the work was to define methodologies to improve the morphophysiological responses in the establishment, multiplication, elongation and *in vitro* rooting of *E. pilularis* with a chronological age of 44-years-old, being divided into four chapters. In chapter 1, the aim was to evaluate two tissue origins and four inoculation methods in the *in vitro* establishment of the species. According to the results, it was only possible to establish explants from tissues with a lower ontogenetic age, and it is recommended to use activated charcoal, PVP30 and exposure to light in this phase of micropropagation for *E. pilularis*. For chapter 2, the aim was to evaluate induction of buds and epicormic shoots, establishment, multiplication by 15 subcultures, genetic fidelity and *in vitro* elongation, testing two concentrations of BAP and NAA, from three selected trees of the species (M1, M2 and M3). It was only possible to establish, multiply and elongate explants from M3, being recommended the concentration of 0.10 mg L⁻¹ BAP combined with 1.0 mg L⁻¹ NAA for *in vitro* elongation. Polymorphisms were not found after *in vitro* multiplication. The aim of the third chapter was to evaluate the effect of carbon sources on *in vitro* multiplication and elongation, and concentrations of the best carbon source and flask sealing systems on elongation and *in vitro* rooting of the species. The use of glucose promoted the best results on *in vitro* multiplication and elongation of shoots in tubes and the best in elongation and *in vitro* rooting in flasks containing lids with a porous membrane, at a concentration of 30 g L⁻¹. In chapter 4, the objective was to evaluate the effect of light quality and glucose concentrations on the *in vitro* multiplication and elongation of the species. The use of fluorescent lamps and R:B LEDs and supplementation of the medium with 30 g L⁻¹ of glucose resulted in the highest averages for the characteristics evaluated in multiplication and elongation *in vitro*. The methodologies tested demonstrate the possible improvements in the *in vitro* culture of *E. pilularis* with advanced ontogenetic age and the importance of applying cloning on a large scale, through the techniques used for eucalypts species.

Keywords: Micropropagation. Cloning. Gas exchange. Carbon source. Light quality.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| PRIMEIRA PARTE | 9 |
| 1 INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 11 |
| 2.1 <i>Eucalyptus pilularis</i> | 11 |
| 2.2 Resgate de árvores adultas de <i>Eucalyptus</i> | 13 |
| 2.3 Micropropagação de <i>Eucalyptus</i> | 13 |
| 2.4 Fidelidade genética | 14 |
| 2.5 Fontes de carbono | 15 |
| 2.6 Trocas gasosas | 17 |
| 2.7 Qualidade de luz | 18 |
| REFERÊNCIAS | 20 |
| SEGUNDA PARTE – ARTIGOS | 29 |
| ARTIGO 1 – IDADE ONTOGENÉTICA E MÉTODOS DE INOCULAÇÃO PARA O ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Eucalyptus pilularis</i> Smith | 29 |
| ARTIGO 2 – ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO E ALONGAMENTO <i>IN VITRO</i> DE MATRIZES ADULTAS DE <i>Eucalyptus pilularis</i> Smith COM IDADE CRONOLÓGICA DE 44 ANOS | 40 |
| ARTIGO 3 – FONTES DE CARBONO NA MULTIPLICAÇÃO E MIXOTROFISMO NO ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Eucalyptus pilularis</i> Smith | 63 |
| ARTIGO 4 – QUALIDADE DE LUZ E CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE NA MULTIPLICAÇÃO E NO ALONGAMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Eucalyptus pilularis</i> Smith | 92 |

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O sucesso dos povoamentos florestais implantados com espécies do gênero *Eucalyptus* no Brasil destacam-se pelo rápido crescimento, pela produtividade e pela adaptação ambiental nas várias condições edafoclimáticas (COSTA *et al.*, 2019). Muitas destas espécies já são utilizadas comercialmente, gerando múltiplos produtos para diversos fins industriais, como madeira, celulose, papel, energia, óleos essenciais, entre outros (GUERINO *et al.*, 2022; IBÁ, 2021; MONTEIRO *et al.*, 2021; RAMALHO *et al.*, 2020; SÃO TEAGO *et al.*, 2020; TEIXEIRA *et al.*, 2020).

No Brasil, o interesse nas espécies do gênero teve início na década de 1960 com os incentivos fiscais, e se intensificou em meados de 1970, quando foram implantados em testes de espécies e procedências de eucalipto com o intuito de testar espécies potenciais para aplicações industriais, visando à possibilidade de formação de futuros plantios florestais (IPEF, 1984).

A implantação de tais testes foi realizada por meio do Projeto de Desenvolvimento e Pesquisa Florestal (PRODEPEF), juntamente ao Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF) e à EMBRAPA (IPEF, 1984). Um dos últimos testes remanescentes e conservados em termos experimentais está localizado em Lavras, Minas Gerais, no Viveiro Florestal, pertencente ao Departamento de Ciências Florestais da Universidade de Lavras – UFLA (IPEF, 1984).

Dentre as espécies testadas, o *Eucalyptus pilularis* é uma das que tem grande valor na Austrália pelo seu rápido crescimento e sua excelente qualidade da madeira (MOURA, 2001). No Brasil, as áreas plantadas com essa espécie são inexpressivas pela dificuldade de obtenção de híbridos com materiais amplamente utilizados, pela baixa capacidade de rebrota e pela casca volumosa, que não é interessante para algumas finalidades (CASTELLANO *et al.*, 2013). Por outro lado, de acordo com Ferreira e Simões (1994), existem importantes variações genéticas dentro da espécie e há possibilidade de se explorar essa variação para obtenção de materiais superiores e, posteriormente, resgatá-los. É uma espécie com grande potencial para serraria e laminação, principalmente no Sudeste do país (GOMES *et al.*, 1977; GOMES *et al.*, 1981; MENDES *et al.*, 1983; MOURA *et al.*, 1980).

Dessa forma, em alguns casos, como nesse teste de espécies e procedências, algumas técnicas de resgate não podem ser utilizadas pela impossibilidade de realizar o abate ou anelamento de árvores selecionadas para posterior clonagem, visando à conservação do teste.

Assim, a indução de brotações epicórmicas a partir de galhos podados de matrizes selecionadas tem se mostrado uma alternativa para a obtenção de brotações juvenis (AVELAR *et al.*, 2020; BACCARIN *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015; WENDLING; BRONDANI; DUTRA, 2013).

Em árvores adultas, com avançada idade ontogenética, o resgate por brotações epicórmicas e a utilização da micropropagação são formas de promover o rejuvenescimento do material genético. Porém, ainda existem alguns entraves no cultivo *in vitro* de muitas espécies referentes à melhoria no ambiente de cultivo, como o aumento da umidade relativa e concentração de etileno nos frascos, a dificuldade na assimilação de CO₂, a definição da melhor fonte de carboidrato a ser utilizada, da qualidade de luz, da concentração de reguladores de crescimento, o que compromete as respostas morfofisiológicas *in vitro*, principalmente em espécies em que não se tem muitos estudos, como no caso do *Eucalyptus pilularis*. Entraves que podem ser contornados pela possibilidade de trocas gasosas com o uso de membranas porosas e substituição da fonte de carbono ou da fonte de luz.

Outro fator que deve ser considerado é a possibilidade de variação somaclonal no material cultivado *in vitro*, principalmente pelo número de subcultivos realizados a fim de promover o rejuvenescimento. Nesse contexto, é importante a aplicação de testes de fidelidade genética para analisar se e quanto do genótipo da planta matriz foi mantido.

Dessa forma, o trabalho teve como objetivo geral definir metodologias para melhorar as respostas morfofisiológicas no estabelecimento, na multiplicação, no alongamento e no enraizamento *in vitro* de *E. pilularis* com idade cronológica de 44 anos. Quanto aos objetivos específicos, são eles: (i) resgatar árvores adultas de *Eucalyptus pilularis* por meio da indução de brotações epicórmicas e testar a fidelidade genética do material, (ii) avaliar o estabelecimento *in vitro* de *Eucalyptus pilularis*, considerando fontes de origem dos tecidos e métodos de inoculação, (iii) desenvolver as fases da micropropagação para a espécie, analisando fontes de carbono, trocas gasosas e concentração de reguladores de crescimento, (iv) avaliar a multiplicação e o alongamento *in vitro* da espécie, testando fontes de luz e concentrações de glicose.

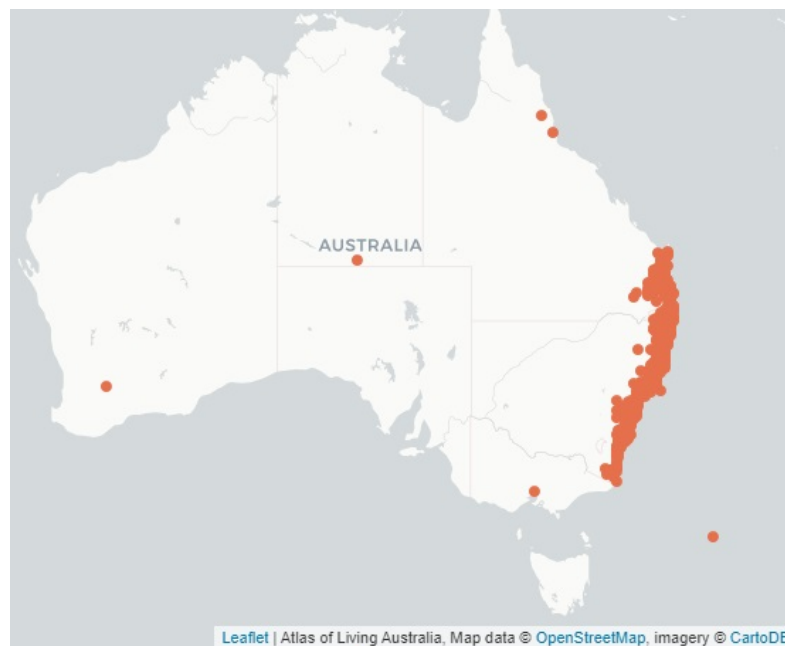
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Eucalyptus pilularis*

O sucesso dos plantios florestais com espécies do gênero *Eucalyptus* no Brasil se deve ao elevado e rápido crescimento volumétrico, à adaptação a diversas condições endofoclimáticas do país e à ampla aceitação no mercado econômico (COSTA *et al.*, 2019). Muitas destas espécies já são utilizadas comercialmente, gerando múltiplos produtos para diversos fins industriais, como madeira, celulose, papel, energia, óleos essenciais, entre outros (IBÁ, 2021; GUERINO *et al.*, 2022; MONTEIRO *et al.*, 2021; RAMALHO *et al.*, 2020; SÃO TEAGO *et al.*, 2020; TEIXEIRA *et al.*, 2020).

No entanto, existem outras espécies de eucaliptos com alto potencial para plantio, como *Eucalyptus pilularis*. Estudos clássicos indicam que a espécie tem bom crescimento e tem amplo potencial para serraria, sendo bastante empregada em construções civis, como postes e dormentes (ALCORN *et al.*, 2008; PASZTOR, 1974; SILVA *et al.*, 2015). *Eucalyptus pilularis* pertence ao subgênero *Eucalyptus*, seção *Renanthera* e ocorre em New Gales do Sul, nas planícies costeiras, áreas montanhosas próximas à costa, estendendo-se para sul de Queensland (FONSECA *et al.*, 2010) (FIGURA 1), muitas vezes como uma única espécie, embora outras vezes em mistura com outros eucaliptos (WEST; RATKOWSKY; SMITH, 2020).

Figura 1 - Distribuição de *Eucalyptus pilularis* Smith em sua área de ocorrência natural.



Fonte: Atlas of Living Australia (2022).

A árvore apresenta grande porte, podendo alcançar 60 m de altura (PASZTOR, 1974). É pouco exigente de fertilidade do solo, típica de regiões acidentadas, sendo encontrada em altitudes desde o nível do mar até 600 m, e precipitação média anual de 900 a 1.500 mm com chuvas predominantemente no verão (PASZTOR, 1974). Segundo Baroni *et al.* (2021), a espécie não é tolerante à geada em ambiente subtropical, com amplitudes térmicas diárias de – 5°C a 28°C. Além disso, é uma espécie de grande valor na Austrália, com grande importância comercial tanto em florestas nativas quanto em plantadas nas áreas subtropicais do leste australiano (WEST; SMITH, 2019; WEST; SMITH, 2020; WEST; RATKOWSKY; SMITH, 2020).

No Brasil, é considerada como uma das espécies de maior potencialidade para a região Sudeste, com grande potencial para serraria e laminação (GOMES *et al.*, 1977; GOMES *et al.*, 1981; MENDES *et al.*, 1983; MOURA *et al.*, 1980), porém apresenta variações em função do local onde é plantada (ALBINO; TOMAZELLO FILHO, 1985). Apresenta o seu melhor desenvolvimento em condições de Cerrado, em altitudes entre 900 e 1.100 m, podendo chegar de 35 a 65 m³ha⁻¹ano⁻¹ de produtividade (MOURA, 2001). Entretanto, nas áreas de Cerrado de baixas altitudes, onde as temperaturas são mais elevadas, não se desenvolve bem, apresentando problemas fisiológicos sérios, como exsudação intensa de "kino" pelo tronco, comumente chamada de "pau preto", como foi evidenciado em experimentos realizados no Distrito Federal (MOURA; ZINN; OLIVEIRA, 1996).

No município de Itatinga - SP, verificou-se um rápido crescimento inicial, alta sobrevivência de mudas de *E. pilularis* e forte controle genético para altura da espécie, o que demonstra bom potencial para a continuidade de programas de melhoramento genético, além de alta resistência das mudas à ferrugem *Austropuccinia psidii* (96,25%) (BARONI *et al.*, 2019). De acordo com Castellano *et al.* (2013), avaliando espécies e procedências de eucaliptos centenários em Rio Claro - SP, *Eucalyptus pilularis* foi uma das espécies que apresentou o maior diâmetro médio (> 80 cm), maiores volumes de madeira e maiores alturas comerciais (> 42 m).

Quanto à variabilidade genética, a espécie, em sua área natural, mostra baixa diferenciação genética regional (SHEPHERD *et al.*, 2010), entretanto há elevada variação genotípica que possibilitará a seleção para futuros programas de melhoramento genético (CARNEGIE; JOHNSON; HENSON, 2004).

2.2 Resgate de árvores adultas de *Eucalyptus*

A clonagem de indivíduos superiores, visando o aumento da homogeneidade, produtividade e qualidade dos povoamentos florestais ou a conservação de espécies envolve etapas que se iniciam com a seleção de genótipos, seguida da definição de técnicas de propagação vegetativa. Na maioria dos casos, essa seleção só é realizada na fase adulta, onde a propagação vegetativa apresenta certas limitações, como a redução da capacidade de enraizamento em estacas devido ao alto grau de maturação dos tecidos da planta, atrelada à idade ontogenética (BACCARIN *et al.*, 2015; WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

Diversas técnicas de propagação são adotadas para promover o rejuvenescimento dos tecidos e/ou a indução de brotações juvenis em plantas adultas, como anelamento (BISOGNIN *et al.*, 2018), estaquia (TRUEMAN; MCMAHON; BRISTOW, 2013), miniestaquia (BRONDANI *et al.*, 2012a), decepa (BISOGNIN *et al.*, 2018; ENGEL *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021), brotos epicórmicos de galhos podados (AVELAR *et al.*, 2020; WENDLING; BRONDANI; DUTRA, 2013) e micropropagação (AVELAR *et al.*, 2020; BRONDANI *et al.*, 2012b; FARIA *et al.*, 2022; SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2021). Tais técnicas podem ser utilizadas para resgate e clonagem de árvores selecionadas (BACCARIN *et al.*, 2015).

Em muitos casos, algumas dessas técnicas se tornam inviáveis pela impossibilidade de abate ou anelamento das matrizes em testes de espécies e procedências. Dessa forma, a indução de brotações epicórmicas a partir de galhos podados de matrizes selecionadas tem se mostrado uma alternativa para se obter brotações juvenis (AVELAR *et al.*, 2020; BACCARIN *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015; WENDLING; BRONDANI; DUTRA, 2013), originadas de gemas axilares latentes, denominadas gemas epicórmicas, com a finalidade de recompor a copa da planta (SEITZ, 1996).

2.3 Micropropagação de *Eucalyptus*

As espécies do gênero *Eucalyptus* estão entre as mais plantadas no mundo, porém a produtividade dos povoamentos tem sido limitada pela baixa capacidade de propagação de algumas espécies por estaquia. Uma alternativa para essa limitação é a utilização da técnica de proliferação de gemas na micropropagação (organogênese direta), a técnica de cultura de tecidos mais difundida na área florestal, a qual tem sido utilizada na conservação de germoplasma, produção de plantas livres de doenças, multiplicação rápida de plantas em

períodos de tempo e espaço físico reduzidos, rejuvenescimento clonal e produção de mudas de clones selecionados (ABRAVESH; ASSAREH; EMAM, 2019; CARDOSO; GERALD; SILVA, 2018; TRUEMAN; HUNG; WENDLING, 2018; XAVIER; WENDLING; DUTRA, 2013).

Os estádios de desenvolvimento da propagação *in vitro* são constituídos por fases que envolvem a seleção de explantes, desinfestação e estabelecimento da cultura nas condições *in vitro* (Fase I); multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio de cultura adequado à propagação e alongamento (Fase II); enraizamento dos propágulos vegetativos obtidos no estágio anterior (Fase III); e aclimatização das plantas obtidas na condição *in vitro* para a condição *ex vitro* (Fase IV) (XAVIER; WENDLING; DUTRA, 2013).

A micropropagação de espécies florestais pode ser realizada via proliferação de gemas axilares, organogênese e embriogênese somática (ABIRI *et al.*, 2020), sendo a micropropagação pela proliferação de gemas axilares provenientes de explantes obtidos tanto de plântulas como de material adulto, e que corresponde ao método mais utilizado na propagação *in vitro* de várias espécies lenhosas (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

Os explantes coletados a partir de árvores adultas devem possuir características juvenis. Para tanto, empregam-se técnicas de indução de rejuvenescimento da matriz doadora (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013). O rejuvenescimento implica em uma reversão da idade ontogenética (isto é, maturação), enquanto o revigoramento refere-se a uma redução na idade fisiológica (isto é, declínio de vigor) (WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014).

Além disso, como as respostas das plantas à técnica são variáveis, alguns fatores influenciam o sucesso da micropropagação, dentre eles o genótipo, o estado fisiológico da planta-mãe, a época de coleta, o tipo do explante, o método de assepsia, o meio de cultura, as concentrações e os tipos de reguladores de crescimento (GEORGE; HALL; KLERK, 2008; WENDLING; DUTRA; GROSSI, 2006; XAVIER; OTONI; PENCHEL, 2007).

2.4 Fidelidade genética

A micropropagação, pelo método da proliferação de gemas axilares, é usada para promover o rejuvenescimento em *Eucalyptus* (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Entretanto, há a possibilidade de ocorrência de variação somaclonal, que é uma variação espontânea entre plantas regeneradas em propagação *in vitro* sendo transmitida sexualmente nesse método (TRIPATHI; MATHISH; GURUMURTHI, 2006; XAVIER; WENDLING; SILVA., 2013).

Essa variação ocorre pelo alto número de subcultivos *in vitro*, alta concentração de reguladores de crescimento (ASADI *et al.*, 2021), mudanças na relação auxina/citocinina (MODGIL *et al.*, 2005) e também pela oxidação, que leva à produção de radicais livres que causam danos no DNA (JACKSON; CHEN; LOEB, 1998). Ela se manifesta pela metilação do DNA, pelo rearranjo dos cromossomos ou por mutações pontuais (PHILLIPS; KAEPLER; OLHOFT, 1994).

Dessa forma, a estabilidade genética é importante na micropropagação de qualquer espécie (CHANDRYKA; RAVUSHANKAR; SAKALESHPUR, 2010) e manter a integridade genética de plantas micropropagadas é imprescindível para obter materiais geneticamente uniformes pela clonagem (BHATIA *et al.*, 2011). A detecção da variação somaclonal e a garantia de fidelidade genética podem ser obtidas por diversas técnicas (MALLÓN; RODRÍGUEZ-OUBIÑA; GONZÁLEZ, 2010; PEREDO; ARROYO-GARCIA; REVILLA, 2009), dentre elas estão os marcadores moleculares, considerados como uma ferramenta útil para assegurar a uniformidade genética de plantas micropropagadas (BINDIYA; KANWAR, 2003; JOSHI; DHAWAN, 2007).

Dentre os marcadores moleculares, o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) é baseado em PCR e é eficiente para caracterização da fidelidade genética (NOGUEIRA; GOMES; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2019). A reação de PCR-ISSR é uma técnica simples, rápida, de baixo custo, eficiente e que não requer informação prévia da sequência de DNA do organismo em estudo (ZIETKIEWICZ; RAJALSKI; LABUDA, 1994).

2.5 Fontes de carbono

O crescimento e o desenvolvimento *in vitro* de diferentes espécies nas fases da micropropagação são afetados por diversos fatores, podendo-se destacar a formulação e tipo e consistência do meio de cultura (FERREIRA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2012), os reguladores de crescimento e suas concentrações (ALKOWNI; SOLYMAN; QAUOD, 2017), o tipo e as concentrações de fonte de carbono (MEMON *et al.*, 2019), o número de subcultivos, bem como o tipo de explante utilizado (AHMAD *et al.*, 2007; ZHANG; GAO, 2012).

Como o cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos não é totalmente autotrófico, é necessária a presença de carboidratos em meios de cultura para manter o potencial osmótico, servir como fonte de energia e carbono para o crescimento das células (GAUCHAN, 2012; GUPTA *et al.*, 2020; FADHALADEEN; TOMA, 2019) e para o desenvolvimento de processos, como a proliferação de brotos, a indução e emissão de raízes, a embriogênese e a organogênese

(YASEEN *et al.*, 2013). Além disso, os tecidos mostram melhor desenvolvimento e proliferação após a adição de uma fonte adequada de carbono no meio de cultivo (MAZINGA *et al.*, 2014).

Embora a sacarose seja o carboidrato comumente utilizado na maioria dos trabalhos em indução e desenvolvimento de brotos *in vitro* em espécies lenhosas, nem sempre é a fonte de carbono mais eficaz para esses fins (MEMON *et al.*, 2019). É um açúcar não-redutor, e esses tipos de açúcares são menos reativos que açúcares redutores (CARVALHO *et al.*, 2013). Além disso, a sacarose, um carboidrato com 12-C, ou seja, que apresenta doze carbonos na sua estrutura química, sendo parcialmente hidrolisada em glicose e frutose, ambas com 6-C, na esterilização do meio de cultura pela autoclavagem e, a presença desses compostos é essencial para o crescimento das plantas, uma vez que a fotossíntese da planta, ou do explante é limitada (BETTERCOURT *et al.*, 2016; CID *et al.*, 2014).

Dessa forma, outros carboidratos podem ser usados com sucesso como fonte de carbono (EMARA *et al.*, 2018; FADHALADEEN; TOMA, 2019; GUPTA *et al.*, 2020), entretanto é variável de espécie para espécie. A glicose, por exemplo, é um açúcar redutor, que pode ser prontamente absorvido pelos explantes, fornecendo uma melhor fonte de carbono por difusão através das superfícies do tecidos excisados e metabolizado pelo cultivo *in vitro* (WELANDER; PAWLICKI, 1994).

Efeitos positivos da glicose como fonte de carbono foram observados em *Eucalyptus cloeziana* para número, comprimento de brotos e redução da oxidação fenólica dos tecidos (TORMEN *et al.*, 2018), em *Moringa oleifera* para número e comprimento de folhas, massa fresca e comprimento da parte aérea das plântulas (OKAFOR *et al.*, 2020) e em *Lonicera caerulea* L. na fase de multiplicação *in vitro*, substituindo a sacarose (ORLOVA; MOLKANOVA; KOROLEVA, 2021).

A frutose é um outro monossacarídeo que apresenta resultados positivos no cultivo *in vitro* de algumas espécies. Preethi, Sridhar e Naidu (2011) observaram que a frutose proporcionou melhores resultados do que sacarose, maltose e glicose na micropropagação de *Stevia rebaudiana*. Além disso, Pitekellabou, Aidam e Kokou (2015) verificaram que a frutose como fonte de carbono para a espécie arbórea *Nauclea diderrichii* favoreceu o aumento do número de raízes por explante na concentração de 30 g L⁻¹. Para espécies de *Prunus*, os melhores resultados no alongamento e no peso fresco foram encontrados em meio de cultura contendo 16 g L⁻¹ de frutose ou glicose ao invés de 30 g L⁻¹ de sacarose (CHEONG; AN, 2015).

2.6 Trocas gasosas

O fotoautotrofismo é o meio natural de nutrição das plantas, entretanto, tal forma de nutrição é suprimida em plantas cultivadas *in vitro* (KAUR, 2015). Tradicionalmente, a propagação *in vitro* de plantas é baseada em um sistema fotoheterotrófico, no qual o meio de cultura é suplementado com uma fonte de carbono (SILVA *et al.*, 2019).

O ambiente de cultivo convencional *in vitro* é diferente do ambiente externo, o que resulta em distúrbios fisiológicos e morfológicos na planta (MENDES *et al.*, 2015), como teores insuficientes de clorofila para realizar fotossíntese de modo a sustentar seu crescimento (KRISANTINI, 2018), distúrbios estomáticos, falta de camada de cutícula sobre a folha, parênquimas anormais, hiperhidricidade, dentre outros (HASSANKHAH *et al.*, 2013; KRISANTINI, 2018; TISARUM *et al.*, 2018).

Tais distúrbios são causados pela forma de vedação convencional no cultivo *in vitro*, em que são utilizadas tampas de polietileno, que atuam como barreiras, restringindo o fluxo de fótons fotossinteticamente ativos e limitando as trocas gasosas, aumentando a umidade relativa dentro do recipiente (KRISANTINI, 2018), elevando a concentração de etileno, reduzindo a concentração de CO₂, diminuindo as taxas de transpiração, dificultando a absorção de água e nutrientes e causando redução no crescimento e desenvolvimento dos explantes (CHANDRA *et al.*, 2010; KOZAI, 2010; XIAO; NIU; KOZAI, 2011), o que leva a altas taxas de mortalidade durante a aclimatização *ex vitro* (JIMENÉZ-PERÉZ *et al.*, 2015; SALDANHA *et al.*, 2012; TISARUM *et al.*, 2018).

Por esses motivos, algumas técnicas e metodologias têm sido desenvolvidas a fim de melhorar o sistema de cultivo *in vitro* em que, mesmo com a adição de uma fonte externa de carbono, forneçam condições ambientais favoráveis que promovam a capacidade fotossintética do material micropropagado, sistema conhecido como fotomixotrófico (SILVA *et al.*, 2019).

Uma das estratégias mais utilizadas para a obtenção deste sistema é a utilização de tampas de polietileno com membranas permeáveis às trocas gasosas para aumentar a ventilação natural (SALDANHA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2019). Nessas condições, a fisiologia *in vitro* assemelha-se a fisiologia *ex vitro*, o que permite uma aclimatização mais rápida e com maiores taxas de sobrevivência (SALDANHA *et al.*, 2014). Além disso, o enriquecimento com CO₂ atmosférico tem demonstrado melhoria no crescimento e na produção de plantas *in vitro* de alta qualidade associadas à aclimatização adequada (KOZAI, 2010; XIAO; NIU; KOZAI, 2011).

Nesse contexto, adaptações morfológicas e fisiológicas, como emissão e desenvolvimento de raízes, prevenção da perda de água por estômatos funcionais (baixa taxa

de transpiração), melhoria na assimilação de CO₂ (alta taxa fotossintética), emissão de novas folhas e aumento da área foliar, aumento de brotos e de biomassa de raízes de plantas aclimatizadas *in vitro* são índices muito importantes para garantir alta sobrevivência e rápido crescimento de plântulas antes da aclimatização *ex vitro* (HOANG *et al.*, 2017).

Batista *et al.* (2017) observaram que plântulas de *Capsicum annuum* cultivadas em frascos com tampas com membranas apresentaram estruturas anatômicas diferenciadas e vigorosas, resultando em plântulas maiores, com mais folhas expandidas, maior número de folhas, maior massa fresca e maior quantidade de pigmentos fotossintéticos. O tipo de vedação influenciou as respostas morfogênicas da espécie, demonstrando que o aumento nas trocas gasosas teve efeito positivo sobre a produção de biomassa e aclimatização das plântulas.

Pelos benefícios que proporciona, a utilização de tampas com membranas porosas em frascos tem promovido o aumento do teor de clorofila *a*, *b* e total, assim como melhorias no sistema fotossintético das plântulas de abacaxizeiro cv. Perolera (MENDES *et al.*, 2015), melhores resultados para comprimento de brotos, número de entrenós e massa secas de brotos foram encontrados em *Tectona grandis* com a utilização de 18 g L⁻¹ de sacarose e de tampas plásticas com filtro (FERNANDES *et al.*, 2013).

Para *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, o uso do sistema de membranas para promover a ventilação natural com um filtro e com dois filtros melhoraram o enraizamento da espécie. Além disso, segmentos apicais devem ser cultivados sob a ventilação natural com um filtro e segmentos nodais devem ser cultivados com dois filtros para garantir melhor crescimento (SILVA *et al.*, 2017).

2.7 Qualidade de luz

As respostas morfofisiológicas de explantes de espécies lenhosas nas fases da propagação *in vitro* são influenciadas por diversos fatores, podendo-se destacar a fonte de luz utilizada no ambiente de cultivo (CARDOSO; GERALD; SILVA, 2018; LERIN *et al.*, 2019; MIRANDA *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2018, 2020a, 2020b; STEFANEL *et al.*, 2020), a qual pode afetar o crescimento e o desenvolvimento das plantas, influenciando a morfogênese, por ser fonte de energia para fotossíntese e para processos fisiológicos (BATISTA *et al.*, 2018; KOZAI *et al.*, 2016).

A fim de otimizar o cultivo *in vitro*, estudos vêm sendo realizados visando a aplicação de diodos emissores de luz (LEDs) como fonte de luz artificial (MILER *et al.*, 2019; PAWOWSKA *et al.*, 2018), buscando criar um ambiente mais favorável para o

desenvolvimento das plantas *in vitro*, para a produção de fotoassimilados, e também como estímulo percebido por fotorreceptores que desencadeiam a fotomorfogênese em plantas (BELLO-BELLO; ESTRADA; VELÁZQUEZ, 2016; GUPTA *et al.*, 2017). As lâmpadas LED possuem alta eficiência na geração de luz com baixa emissão de calor, podem ter sua intensidade controladas e são mais econômicas quando comparadas às lâmpadas fluorescentes convencionais (GUPTA; JATOTHU, 2013; LAZZARINI *et al.*, 2017; MILER *et al.*, 2019).

Dentre os trabalhos com o uso de LEDs, resultados promissores foram encontrados no estabelecimento, na multiplicação e no alongamento *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia* (SOUZA *et al.*, 2018, 2020b, 2020c), no estabelecimento, na multiplicação, no alongamento e no enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* (SOUZA *et al.*, 2020a, 2020d, 2022a), na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus pilularis* em biorreator de imersão temporária (SOUZA *et al.*, 2022b), no estabelecimento *in vitro*, no número de brotos e na contaminação bacteriana de *Eugenia involucrata* (STEFANEL *et al.*, 2020) e no desenvolvimento *in vitro* de microcepas de *Eucalyptus urophylla* (MIRANDA *et al.*, 2020).

REFERÊNCIAS

- ABIRI, R. *et al.* The Prospect of Physiological Events Associated with the Micropropagation of *Eucalyptus* sp. **Forests**, v. 11, n. 11, p. 1-29, 2020.
- ABRAVESH, Z.; ASSAREH, M. H.; EMAM, M. Micropropagation of *Eucalyptus citriodora* H. **Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research**, v. 27, n. 1, p. 86-97, 2019.
- AHMAD, T. *et al.* Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock GF-677. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 4, p. 1269-1275, 2007.
- ALBINO, J. C.; TOMAZELLO FILHO, M. **Evolução do crescimento de 12 espécies/procedências de *Eucalyptus* em três regiões bioclimáticas do Estado de Minas Gerais**. Brasília: EMBRAPA-CPAC, 1985. 46p. (EMBRAPA-CPAC. Boletim Técnico, 25).
- ALCORN, P. J. *et al.* Growth response following green crown pruning in plantation- grown *Eucalyptus pilularis* and *Eucalyptus cloeziana*. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 38, p. 770-781, 2008.
- ALKOWNI, R.; SOLYMAN, E.; QAUOD, H. A. Introducing some of threatened thymus species to *in vitro* tissue culturing as an approach for their conservation. **Pakistan Journal of Botany**, v. 49, n. 1, p. 259-264, 2017.
- ASADI, N. *et al.* Micropropagation and assessment of somaclonal variation in *Galanthus transcaucasicus in vitro* plantlets. **Ornamental Horticulture**, v. 27, n. 4, p. 505-515, 2021.
- ATLAS OF LIVING AUSTRALIA (Website). National Collaborative Research Infrastructure Strategy (NCRIS) and Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO). Disponível em: <https://bie.ala.org.au/species/https://id.biodiversity.org.au/node/apni/2899127>. Acesso em: 10 de maio de 2022.
- AVELAR, M. L. M. *et al.* *In vitro* establishment of *Eucalyptus* and *Corymbia* species from epicormic shoots. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 44, n. 1, p. 1–11, 2020.
- BACCARIN, F. J. B. *et al.* Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, v. 46, p. 465-483, 2015.
- BARONI, G. R. *et al.* Genetic parameters of *Eucalyptus pilularis* resistance to rust in controlled and field conditions. **Australian Plant Pathology**, v. 49, n. 1, p. 1-4, 2019.
- BARONI, G. R. *et al.* Mortality of *Eucalyptus pilularis* progenies and provenances after frost. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 21, n. 3, p. 1-6, 2021.
- BATISTA, D. S. *et al.* Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 3, p. 1-6, 2017.

- BELLO-BELLO, B.B.; ESTRADA, E.M.; VELÁZQUEZ, J.H.C.; Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). **African Journal**, v.15, p.272 – 277, 2016.
- BETTENCOURT, G. M. F. *et al.* Efeito da fonte de carbono na embriogênese somática em *Bactris gasipaes*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 36, n. 86, p. 179-183, abri./jun. 2016.
- BHATIA, R. *et al.* Evaluation of the genetic fidelity of *in vitro* propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 104, n. 1, p. 131-135, 2011.
- BINDIYA, K.; KANWAR, K. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Robinia pseudoacacia* L. **Euphytica**, v. 132, n. 1, p. 41-47, 2003.
- BISOGNIN, D. A. *et al.* Adventitious rooting competence and rescue of adult mate plants by cutting. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 42, n. 3, p. 1-10, 2018.
- BRONDANI, G.E. *et al.* Low temperature, IBA concentrations and optimal time for adventitious rooting of *Eucalyptus benthamii* minicuttings. **Journal of Forestry Research**, v. 23, n. 4, p. 583-592, 2012a.
- BRONDANI, G.E. *et al.* Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 45, n. 5, p. 478-487, 2012b.
- BRONDANI, G. E. *et al.* Mini-incubators improve the adventitious rooting performance of *Corymbia* and *Eucalyptus* microcuttings according to the environment in which they are conditioned. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2017.
- CARDOSO, J. C.; GERALD, L. T. S.; SILVA, J. A. T. Micropropagation in the Twenty-First Century. *In*: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. **Plant Cell Culture Protocols**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Humana Press, 2018. p. 17-46.
- CARNEGIE, A. J.; JOHNSON, I. G.; HENSON, M. Variation among provenances and families of blackbutt (*Eucalyptus pilularis*) in early growth and susceptibility to damage from leaf spot fungi. **Canadian Journal Forest Research**, v. 34, p. 2314-2326, 2004.
- CARVALHO, D.C. *et al.* Fox grape cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) and grapevine cv. Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) cultivated *in vitro* under different carbohydrates, amino acids and 6-Benzylaminopurine levels. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 191-201, 2013.
- CASTELLANO, G. R. *et al.* Crescimento de eucaliptos quase centenários no Horto de Rio Claro. Circular técnica IPEF, n. 206, p. 1-12, jul./2013.
- CHANDRA, S. *et al.* Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1199-1205, 2010.

CHANDRYKA, M; RAVISHANKAR, R.; SAKALESHPUR, T. ISSR marker based analysis of micropropagated plantlets of *Nothapodytes foetida*. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 3, p. 561-565, 2010.

CHEONG, E. J.; AN, C. Effect of carbohydrates on *in vitro* shoot growth of various *Prunus* species. **Korena Journal of Plant Resources**, v. 28, n. 3, p. 357-362, 2015.

CID, L. P. B. *et al.* Cultivo *in vitro* de plantas. 4 ed. Brasilia, DF, Embrapa, 2014, 325p.

COSTA, E. V. S. *et al.* Torrefied briquetes of sugar cane bagasse and *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2019.

EMARA, H. A. *et al.* Evaluation of photomixotrophic technique and several carbohydrate sources as affecting banana micropropagation. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 10, 788-804, 2018.

ENGEL, M. L. *et al.* Indução de brotações em matrizes de *Acacia mearnsii* De Wildeman em relação a idades e quatro estações do ano. **Scientia Forestalis**, v. 47, n. 122, p. 235-244, 2019.

FADHALADEEN, L. H.; TOMA, R. S. Effect of carbon source in woody plant médium with different salt strengths on Oak (*Quercus aegilops* L.) micropropagation. **Journal of Plant Production**, v. 10, n. 9, 751-756, 2019.

FARIA, J. C. T. *et al.* Use of biodegradable polyester-based microvessels for micropropagation of mature *Eucalyptus microcorys*. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v. 52, n. 10, p. 1-13, 2022.

FERNANDES, D. A. *et al.* Tipos de vedação e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Tectona grandis* L.f. **Revista de Agricultura**, v. 88, n. 3, p. 218-228, 2013.

FERREIRA, M., SIMÕES, J. Formação de população base de *Eucalyptus pilularis* Smith, visando produção de madeira para usos múltiplos. IPEF, Piracicaba, n.47, p.1-21, 1994.

FERREIRA, W. M. *et al.* Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture medium, sucrose and growth regulators. **Iheringia. Série Botânica**, v. 72, n. 1, p. 57-65, 2017.

FONSECA, A. L. C. *et al.* Rescue and vegetative propagation of *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish in natural stand. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 3, p. 566-574, 2021.

FONSECA, S. M. da *et al.* **Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2010. 200 p.

GAUCHAN, D. Effect of different sugars on shoot regeneration of maize (*Zea mays* L.). Kathmandu University Journal of Science, **Engineering and Technology**, v. 8, n. 1, p. 119-124, 2012.

GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G. J. (Ed.). Plant propagation by tissue

culture: the background. 3rd ed. Dordrecht: **Springer**, v. 1, p. 29-64, 2008.

GOMES, J. M. *et al.* Competição de espécies e procedências de eucalipto na região de Viçosa, Minas Gerais. **Revista Árvore**. Viçosa, v. 1, n. 2, p. 72-88, 1977.

GOMES, J. M. *et al.* Variação do crescimento de espécies e procedências de eucalipto cultivadas na região de Viçosa. Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 5, p. 2, p. 233-49, 1981.

GUERINO, R. M. G. *et al.* Expansão e impactos socioambientais da cultura de *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) no Brasil: um panorama da literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. 1-26, 2022.

GUPTA, N. *et al.* A review on micropropagation culture method. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, v. 8, n. 1, p. 86-93, 2020.

HASSANKHAH, A. *et al.* Effects of ventilation and sucrose concentrations on the growth and plantlet anatomy of micropropagated persian walnut plants. **International Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 1, n. 2, p. 111-120, 2013.

HOANG, N. B. *et al.* A comparative study on growth and morphology of wasabi plantlets under the influence of the micro-environment in shoot and root zones during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 130, n. 2, p. 255-263, 2017.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBÁ). **Relatório Anual IBÁ**. 176 p. 2021. Disponível em: < <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorioiba2021-compactado.pdf>>. Acesso em: 09 de janeiro de 2022.

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS (IPEF). **Procedências de *Eucalyptus* spp. introduzidas no Brasil por diferentes entidades**. Piracicaba, v. 10, n. 29, 259 p., 1984. Disponível em: < http://www.ipef.br/publicacoes/boletim_informativo/bolinf29.pdf>. Acesso em: 03 de maio de 2019.

JACKSON, A. L.; CHEN, R.; LOEB, L. A. Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 95, p. 12468-12473, 1998.

JIMÉNEZ-PÉREZ, M. *et al.* A regime of high CO₂ concentration improves the acclimatization process and increases plant quality and survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, n. 3, p. 547-557, 2015.

JOSHI, P.; DHAWAN, V. Assessment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay. **Biologia Plantarum**, n. 51, p. 22-26, 2007.

KAUR, R. P. Photoautotrophic micropropagation an emerging new vista in micropropagation – A review. **Agricultural Reviews**, v. 36, n. 3, p. 198-207, 2015.

KRISANTINI, N. M. A. W. Photoautotrophic System: A Review and Potential Applications in Plant Micro Propagation. **Journal of Tropical Crop Science**, v. 5, n. 2, p. 73-77, 2018.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 10, p. 188-204, 2010.

LERIN, J. *et al.* Proteomic profile and polyamine contents are modeled by light source to promote *in vitro* shoot development in *Cariniana legalis* (Martius) O. Kuntze (Lecythidaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, n. 2, p. 329-342, 2019.

MALLÓN, R.; RODRÍGUEZ-OUBIÑA, J.; GONZÁLEZ, M. L. *In vitro* propagation of the endangered plant *Centaurea ulreia*: assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, n. 101, p. 31-39, 2010.

MAZINGA, K. M. *et al.* Efeitos do carvão ativo no meio de cultura sobre a indução da rizogênese em híbrido FHIA-01 de bananeira (*Musa AAAB*) em cultura *in vitro*. **Journal of Applied Biosciences**, v. 73, p. 5991-6001, 2014.

MEMON, A. A. *et al.* Efeito de fontes de carbono e suas várias concentrações para otimizar a micropropagação *in vitro* de *Banana musa* (spp.) Basrai. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p.1108-1114, 2019.

MENDES, J. M. *et al.* Comportamento de 29 espécies de *Eucalyptus* em dois locais em Minas Gerais). **Silvicultura**, v. 8, n. 31, p. 467-471, 1983.

MENDES, P. S. *et al.* Cultivo *in vitro* de plântulas de abacaxizeiro com uso de filtros, ventilação artificial e sacarose. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 9, n. 2, p. 202-207, 2015.

MIRANDA, N. A. *et al.* Qualidade e intensidade de luz no desenvolvimento *in vitro* de microestacas de *Eucalyptus urophylla* em sistema fotoautotrófico. **Forest Science**, v. 66, n. 6, p. 754-760, 2020.

MILER, N. *et al.* Aplicação de diodos emissor de luz de espectro amplo na micropropagação de espécies ornamentais: um estudo sobre a qualidade das plantas e redução de custos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 55, n. 1, p. 99-108, 2019.

MODGIL, M. *et al.* Análise molecular da estabilidade genética em micropropagação de porta-enxerto MM106. **Scientia Horticulturae**, n. 104, p. 151-160, 2005.

MONTEIRO, N. F. *et al.* Atividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* no controle de bactérias da cavidade oral. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. 1-12, 2021.

MOURA, V. P. G. **Potencial e uso de espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia* de acordo com locais e uso**. Documentos 68-Embrapa, Brasília, DF, 33 p., dez. 2001.

MOURA, V. P. G. *et al.* **Avaliação de espécies e procedências de *Eucalyptus* em Minas Gerais e Espírito Santo: resultados parciais**. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, 1980. 104 p. (EMBRAPA-CPAC. Boletim de Pesquisa, 1).

- MOURA, V. P. G.; ZINN, Y. L.; OLIVEIRA, J. E. Resistência de procedências de *Eucalyptus pilularis* B formação de kino. no Cerrado. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 8.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL SAVANNAS, 1.. 1996, Brasília, DF. Anais... Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, p .409-416, 1996.
- NOGUEIRA, J. S.; GOMES, H. T.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Micropropagation, plantlets production estimation and ISSR marker-based genetic fidelity analysis of *Guadua magna* and *G. angustifolia*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, p. 1-9, 2019.
- OKAFOR, U. C. *et al.* Comparison of sucrose and glucose as carbon source for *in vitro* growth of *Moringa oleifera* Lam. embryos. **Nigerian Agricultural Journal**, v. 51, n. 3, p. 16-20, 2020.
- OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453, out/dez. 2013.
- OLIVEIRA, L. S. *et al.* Assessment of genetic stability of micropropagated *Eucalyptus globulus* Labill hybrid clones by means of flow cytometry and microsatellites markers. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 41, n. 1, p. 1-10, 2017.
- OLIVEIRA, L. S. *et al.* Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. **Australian Forestry**, v. 78, n. 4, p. 219-231, 2015.
- ORLOVA, N. D.; MOLKANOVA, O. I.; KOROLEVA, O. V. Improvement of clonal micropropagation technique of promising *Lonicera caerulea* L. cultivars. **IOP Conference Series Earth and Environmental Science**, v. 941, n. 1, p. 1-8, 2021.
- PASZTOR, Y. P. C. Teste de procedências de *Eucalyptus pilularis* Sm na região de Mogi-Guaçu. **IPEF**, v. 8, p. 69-93, 1974.
- PEREDO, E. L.; ARROYO-GARCIA, R.; REVILLA, M. A. Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. **Journal Plant Physiology**, v. 166, n. 10, p. 1101-1111, 2009.
- PHILLIPS, R. L.; KAEPLER, S. M.; OLHOFT, P. Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 91, p. 5222-5226, 1994.
- PITEKELABOU, R.; AÏDAM, A. V.; KOKOU, K. Influence of various carbohydrates on the *in vitro* micropropagation of *Nauclea diderrichii* (De Wild & T. Durand) Merrill, an endangered forest species in Togo. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 15, p. 1283-1289, apr./2015.
- PREETHI, D.; SRIDHAR, T. M.; NAIDU, C. V. Carbohydrate concentration influences on *in vitro* plant regeneration in *Stevia rebaudiana*. **Journal of Phytology**, v. 3, n. 5, p. 61-64, 2011.
- RAMALHO, M. A. S. *et al.* Atividade antiaderente de óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus citriodora* contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. 1-15, 2020.

SALDANHA, C. W. *et al.* A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal culture of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012.

SALDANHA, C. W. *et al.* A CO₂-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 49, n. 4, p.433-444, 2013.

SALDANHA, C. W. *et al.* CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p.87-99, 2014.

SANTOS JÚNIOR, C. F. *et al.* Use of micropropagation in the vegetative rescue of adult trees of *Cedrela odorata* L. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 16, n. 4, p. 1-7, 2021.

SÃO TEAGO, G. B. *et al.* Impactos do cultivo misto nas propriedades das madeiras de acácia e eucalipto no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, p. 1-21, 2020.

SEITZ, R. A. **Manual de poda de espécies arbóreas florestais**. Disponível em: <http://www.ipef.br/publicacoes/curso_arborizacao_urbana/cap08.pdf>. Acesso em: 03 de dezembro de 2018.

SHEPHERD, M. *et al.* Geographical and historical determinants of microsatellite variation in *Eucalyptus pilularis*. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 40, p. 1051-1063, 2010.

SILVA, A. L. L. *et al.* Micropropagation of *Nidularium innocentii* Lem. and *Nidularium procerum* Lindm. (Bromeliaceae). **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, n. 3, p. 1095-1101, 2012.

SILVA, P. H. M. *et al.* Use of genetic markers to build a new generation of *Eucalyptus pilularis* breeding population. **Silvae Genetica**, v. 64, n. 4, p. 170-181, 2015.

SILVA, S. T. *et al.* Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 3, p. 501-510, 2017.

SILVA, T. D. *et al.* Morphophysiological *in vitro* performance of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) based on culture medium formulations. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 55, n. 4, p. 1-14, 2019.

SOUZA, D. M. S. C. *et al.* Light quality in the *in vitro* introduction of *Corymbia* hybrid clones. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 42, n. 6, p. 1-9, 2018.

SOUZA, D. M. S. C. *et al.* Light quality in micropropagation of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Forestalis**, v. 48, n. 127, p. 1-13, 2020a.

- SOUZA, D. M. S. C. *et al.* Light quality, 6-benziladenine and number of subcultives for *in vitro* multiplication of hybrid clones of *Corymbia*. **Scientia Forestalis**, v. 48, n. 128, p. 1-10, 2020b.
- SOUZA, D. M. S. C. *et al.* Photomixotrophism on *in vitro* elongation of *Corymbia* hybrid clones. **Scientia Forestalis**, v. 48, n. 128, p. 1-11, 2020c.
- SOUZA, D. M. S. C. *et al.* Spectral quality and temporary immersion bioreactor for *in vitro* multiplication of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **3 Biotech**, v. 10, n. 10, p. 1-11, 2020d.
- SOUZA, D. M. S. C. *et al.* Effect of light intensity on *in vitro* introduction and multiplication of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 58, p. 225-239, 2022a.
- SOUZA, D. M. S. C. *et al.* *In Vitro* Multiplication of *Eucalyptus pilularis* and *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* (Urograndis Eucalypt): Effect of Light Quality in Temporary Immersion Bioreactor. **Mindanao Journal of Science and Technology**, v. 20, n. 1, p. 72-86, 2022b.
- STEFANEL, C. M. *et al.* Diodos emissores de luz (LEDs) usados no cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 40, p. 1-5, 2020.
- TEIXEIRA, E. C. *et al.* Potencial energético da madeira de clones de eucalipto em diferentes espaçamentos. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. 1-16, 2020.
- TISARUM, R. *et al.* *In vitro* photoautotrophic acclimatization, direct transplantation and *ex vitro* adaptation of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 133, n. 2, p. 215-223, 2018.
- TORMEN, G. C. R. *et al.* Carbohydrate sources, alanine and calcium for *in vitro* multiplication of *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, v. 73, n. 3, p. 329-335, dez., 2018.
- TRIPATHI, S. B.; MATHISH, N. V.; GURUMURTHI, K. Use of genetic markers in the management of micropropagated *Eucalyptus* germplasm. **New Forests**, n. 31, p. 361-372, 2006.
- TRUEMAN, S. J.; HUNG, C. D.; WENDLING, I. Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, v. 9, n. 2, p. 1-42, 2018.
- TRUEMAN, S. J.; MCMAHON, T. V.; BRISTOW, M. Production of cuttings in response to stock plant temperatura in the subtropical eucalypts, *Corymbia citriodora* and *Eucalyptus dunnii*. **New Forests**, v. 44, n. 2, p. 265-279, 2013.
- YASEEN, M. *et al.* Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 4, p. 2837- 2849, 2013.

- XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. **Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais**. In: BOREM, A. (Ed.). *Biotecnologia florestal*. Viçosa, MG: Suprema, p. 55-74, 2007.
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, Editora UFV, 279 p., 2013.
- XIAO Y.; NIU G.; KOZAI T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, p. 149-158, 2011.
- WELANDER, M.; PAWLICKI, N. Carbon compounds and their influence on *in vitro* growth and organogenesis. In *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture* (P.J. Lumsden, J.R. Nicholas & W.J. Davies, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 83-89, 1994.
- WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Produção de mudas de espécies lenhosas. Colombo: Embrapa Florestas. 2006. 54 p. (Embrapa Florestas. Documentos, 130).
- WENDLING, I.; BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F. Vegetative propagation of adult *Ilex paraguariensis* trees through epicormic shoots. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 1, p. 117-125, 2013.
- WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, v. 45, p. 473-486, 2014.
- WEST, P. W.; SMITH, R. G. B. Inter-tree competitive processes during growth of an experimental plantation of *Eucalyptus pilularis* in sub-tropical Australia. **Forest Ecology and Management**, v. 451, p. 481-518, 2019.
- WEST, P. W.; SMITH, R. G. B. Effects of tree spacing on branch-size development during early growth of an experimental plantation of *Eucalyptus pilularis* in subtropical Australia. **Australian Forestry**, v. 83, n. 1, p. 39-45, 2020.
- WEST, P. W.; RATKOWSKY, D. A.; SMITH, R. G. B. Factors controlling individual branch development during early growth of an experimental plantation of *Eucalyptus pilularis* in subtropical Australia. **Trees**, n. 35, p. 395-405, 2020.
- ZHANG, J.; GAO, W. Effects of sucrose concentration and exogenous hormones on growth and periplocin accumulation in adventitious roots of *Periploca sepium* Bunge. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 4, p. 1345-1351, 2012.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

**ARTIGO 1 – IDADE ONTOGENÉTICA E MÉTODOS DE INOCULAÇÃO PARA
O ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Eucalyptus pilularis* Smith**

Artigo formatado conforme às Normas da Revista Nativa (versão aceita e/ou publicada)

Ontogenetic age and inoculation methods for the *in vitro* establishment of *Eucalyptus pilularis* Smith

Maria Lopes Martins AVELAR^{1*}, Bruno Alves MOSCARDINI¹, Denys Matheus Santana Costa SOUZA¹,
Letícia Vaz MOLINARI¹, Douglas Santos GONÇALVES¹, Júlio Cezar Tannure FARIA¹,
Gilvano Ebling BRONDANI^{1*}

¹Laboratory of *In Vitro* Culture of Forest Species, Department of Forestry Sciences, Federal University of Lavras, 37200-900,
Lavras, MG, Brazil.

*E-mail: maria.lma@hotmail.com; gilvano.brondani@ufla.br

<https://doi.org/10.31413/nativa.v10i1.12996>

Nativa, v.10, n.1, p.40-46, 2022

(ORCID: 0000-0001-6790-685X; 0000-0002-8223-4905; 0000-0003-4256-7163; 0000-0002-2543-4628; 0000-0003-2580-8463; 0000-0001-7081-3726; 0000-0001-8640-5719)

Recebido em 15/09/2021; Aceito em 14/02/2022; Publicado em 14/03/2022.

ABSTRACT: We aimed to evaluate the *in vitro* establishment of nodal segments of *Eucalyptus pilularis* Smith considering two origins of tissues (Or₁ - epicormic shoots collected from pruned branches of selected adult trees; Or₂ - shoots collected from seminal mini-stumps) and four inoculation methods (Me₁ - culture medium supplemented with 0.5 g L⁻¹ activated charcoal; Me₂ - culture medium supplemented with 800 mg L⁻¹ PVP30; Me₃ - exposure to light for 30 days; Me₄ - exposure to dark for 7 days). At 30 days after the *in vitro* inoculation of tissues, there was no establishment of tissues from epicormic shoots (Or₁). Or₂ resulted in lower percentages of tissue oxidation and contamination by microorganisms, in addition to having presented establishment and formation of shoots. Me₁ resulted in a lower mean tissue oxidation, although it differed statistically only from Me₄. An origin of the tissues of ontogenetic age was a determining factor for the successful *in vitro* establishment of *E. pilularis*. The use of the Or₂ origin and the Me₁, Me₂, and Me₃ methods are recommended to reduce phenolic oxidation of tissues in the *in vitro* establishment.

Keywords: antioxidant agents; exposure to light; epicormic shoots; tissue oxidation.

Idade ontogenética e métodos de inoculação para o estabelecimento *in vitro* de *Eucalyptus pilularis* Smith

RESUMO: Objetivou-se avaliar o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eucalyptus pilularis* considerando duas origens de tecidos (Or₁ - brotos epicórmicos coletados em galhos podados de matrizes adultas e Or₂ - brotos coletados de minicepas seminais) e quatro métodos de inoculação (Me₁ - meio de cultura suplementado com 0,5 g L⁻¹ de carvão ativado, Me₂ - meio de cultura suplementado com 800 mg L⁻¹ de PVP30, Me₃ - exposição à luminosidade por trinta dias e Me₄ - exposição em ambiente com ausência de luminosidade por sete dias). Aos 30 dias após a inoculação *in vitro* dos tecidos, constatou-se que não houve estabelecimento de tecidos oriundos da Or₁. A utilização de segmentos nodais provenientes da Or₂ resultou em menores percentuais de oxidação e de contaminação por

microrganismos, além de ter apresentado estabelecimento e emissão de brotos. O uso do Me₁ resultou em menor média de oxidação, embora tenha diferido estatisticamente somente do Me₄. A origem dos tecidos associada à idade ontogenética foi um fator determinante para o sucesso do estabelecimento *in vitro* de *E. pilularis*. Recomenda-se a utilização da Or₂ e dos métodos Me₁, Me₂ e Me₃ a fim de reduzir a oxidação fenólica dos tecidos durante o estabelecimento *in vitro*.

Palavras-chave: agentes antioxidantes; exposição à luminosidade; brotos epicórmicos; oxidação de tecidos.

1. INTRODUCTION

Eucalyptus pilularis Smith is a tree species that stands out in Australia for its rapid growth and its excellent-quality wood (MOURA, 2001). It is found mainly in the coastal plains and mountainous coastal areas of the state of New South Wales to the south of Queensland (latitudes between 25°50' and 37°50' (FONSECA et al., 2010).

In Brazil, despite the potential that the species has for sawmilling and laminating, especially in the south-eastern region of the country (Moura et al. 1980), there are few planted areas of it (CASTELLANO et al., 2013), and studies on its forestry and vegetative propagation are still scarce. However, genetic variation is observed within the species, so it is possible to explore this variation to obtain superior genotypes and, later, rescue them for cloning in order to create artificial forests (SILVA et al., 2015).

Several techniques have been used for the vegetative propagation of eucalyptus species, including micropropagation, which allows the conservation of germplasm *in vitro*, the acceleration of breeding programmes through mass production of selected genotypes, clonal cleaning, and the possibility of rejuvenating and reinvigorating tissues of selected plants in the adult phase (WENDLING et al., 2014). The success of *in vitro* culture depends on several factors, including those related to the tissue, the degree of juvenility of the vegetative propagule (ontogenetic age), the level of contamination control, and the vigour (physiological age) of the plant from which the tissues originate (WENDLING et al., 2014; BACCARIN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015). *In vitro* establishment is one of the limiting steps of micropropagation, which seeks to obtain contamination-free tissues to continue with the other stages through the induction of new meristems (TRUEMAN et al., 2018). Phenolic oxidation is another recurrent challenge to *in vitro* propagation, especially of woody species, and may reduce growth and

development or even kill the tissue, thus preventing or hindering establishment (OLIVEIRA et al., 2015; BACCARIN et al., 2015).

The use of antioxidants in the culture medium, such as activated charcoal and polyvinylpyrrolidone (PVP), and different incubation conditions regarding lighting are ways to reduce tissue oxidation and contamination by microorganisms, making a successful *in vitro* establishment more likely (FAGUNDES et al., 2017; LENCINA et al.; 2018; GOLLE et al., 2020). However, there is a need to define the ideal asepsis conditions for each species according to the origin of the tissues.

Thus, the objective of the present study was to evaluate the *in vitro* establishment of nodal segments of *Eucalyptus pilularis* considering two tissue origins and four inoculation methods.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study site and experimental material

The experiment was conducted at the Forest Nursery and the Laboratory of *In Vitro* Culture of Forest Species, both belonging to the Department of Forestry Sciences of the Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais, Brazil.

The experimental materials used to obtain the explants (1.5-cm-long nodal segments containing an axillary bud and no leaves) were derived from two tissue sources: Or₁ - epicormic shoots collected from pruned branches of 46-year-old *Eucalyptus pilularis* mother plants (Figure 1A); and Or₂ - shoots collected from 1-year-old seminal mini-stumps established in a mini-garden (Figure 1B), both from a test of *Eucalyptus* and *Corymbia* species, established in 1974, at the UFLA Forest Nursery (IPEF, 1984).

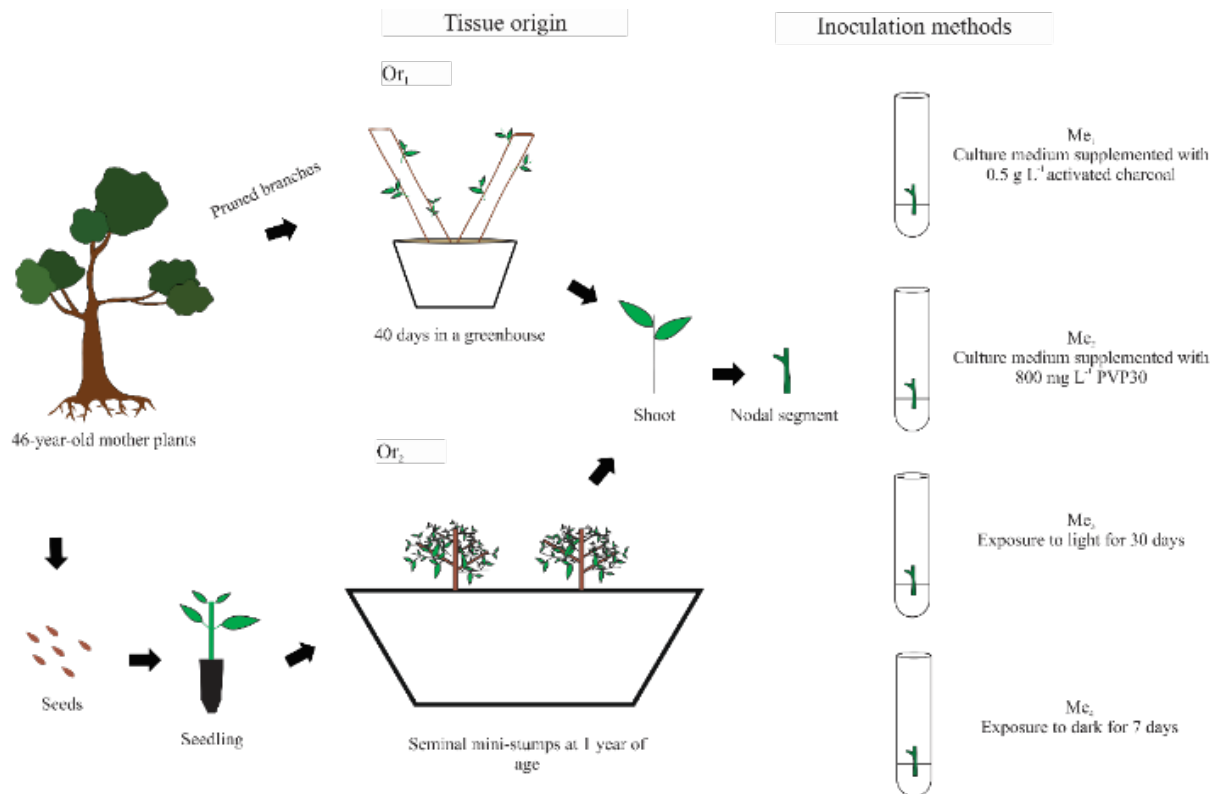


Figure 1. Flowchart of the process for obtaining propagules of different origins, and the different inoculation methods used for the *in vitro* establishment of nodal segments of *Eucalyptus pilularis*.

Figura 1. Fluxograma do processo para obtenção de propágulos de diferentes origens e diferentes métodos de inoculação utilizados para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eucalyptus pilularis*.

2.2. Collection and preparation of branches for inducing the formation of epicormic shoots

The mother plants used for pruning the branches were selected based on visual criteria. We preferred the straightest stem possible, free of pathogen attacks, and with branches located in the lower portion of the canopy to minimize the effects of tissue maturity and facilitate the cutting and collection of branches. At the end of September 2019, the branches were sectioned to 0.50 m length and placed in a climate-controlled greenhouse with relative air humidity higher than 80% and air temperature between 20 °C and 35 °C. The plants were humidified by an intermittent nebulization system with a high-pressure and low-flow nebulizer, automatically controlled by a humidistat. The branches were arranged vertically in polyethylene pots (5 L) that were filled with washed sand, without fertilization, to induce the formation of epicormic shoots (Figure 1A). After 40 days of permanence of the branches in a greenhouse, epicormic shoots of 3 to 5 cm were collected, immersed in autoclaved deionized water, and transported to the laboratory.

2.3. Collection of shoots from seminal mini-stumps

The mini-stumps were obtained from seedlings produced from seeds that were collected from the test of *Eucalyptus* and *Corymbia* species located in the Forest Nursery of the Federal University of Lavras (IPEF, 1984) and were established in a seminal mini-garden under a semi-hydroponic system in raised beds filled with sand at the Forest Nursery of the Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais. Shoots were collected from the mini-stumps and were used to prepare explants for *in vitro* establishment.

The nutrient solution, composed of calcium nitrate (0.920 g L⁻¹), potassium chloride (0.240 g L⁻¹), potassium nitrate (0.140 g L⁻¹), monoammonium phosphate (0.096 g L⁻¹), magnesium sulfate (0.364 g L⁻¹), water-soluble iron (0.040 g L⁻¹), boric acid (2,800 mg L⁻¹), zinc sulfate (0.480 mg L⁻¹), manganese sulfate (1,120 mg L⁻¹), copper sulfate (0.100 mg L⁻¹), and sodium molybdate (0.040 mg L⁻¹), was applied by dripping, four times a day, at a total daily flow rate of 4 L m⁻². The electrical conductivity of the nutrient solution was kept at approximately 2 mS m⁻².

Shoots 10 cm in length were collected from the mini-stumps in a seminal mini-garden (Figure 1B) 15 days after

pruning performed below the terminal meristem, aiming to break the apical dominance and form axillary shoots. Then, they were immersed in autoclaved deionized water and transported to the laboratory.

2.4. *In vitro* establishment

For both the pruned branches and the seminal mini-stumps, 48 h before the collection of shoots, a dimethyl 4,4'- (*o*-phenylene)bis(3-thioallophanate) fungicide was applied at a concentration of 0.5 g L⁻¹. From the shoots collected (Or₁ and Or₂), the nodal segments were standardized to two axillary buds, without leaves and 1.5 cm length. The nodal segments (explants) were washed under running water for 5 min and then immersed in 70% alcohol solution (v/v) for 30 s with constant agitation inside a horizontal laminar flow hood. Then they were immersed in NaOCl solution (1.00-1.25% active chlorine) for 15 min. After each immersion in alcohol or NaOCl, the nodal segments were washed three times with autoclaved deionized water. Then they were immersed in Orthocide 500® fungicide solution (50% captan as the active ingredient; 0.5 g L⁻¹) before inoculation. After asepsis, the explants were inoculated vertically under aseptic conditions in 15 cm × 2.5 cm glass test tubes containing 10 mL of WPM culture medium (LLOYD; MCCOWN, 1981). The time from the collection of shoots under field conditions to inoculation in culture medium was less than 2 hours. During collection, transport, and the intervals between disinfection and inoculation, the explants were kept immersed in autoclaved deionized water to avoid dehydration and preserve the turgidity of the tissues.

The culture medium was supplemented with 20 g L⁻¹ sucrose and 6 g L⁻¹ agar and was prepared using deionized water. The pH of the culture medium was adjusted to 5.8 ± 0.05 with NaOH (0.1 M) and HCl (0.1 M), before autoclaving and adding agar. Autoclaving of the culture medium was performed at a temperature of 127 °C and pressure of 1.5 kgf cm⁻² for 20 min.

After inoculation, the explants were kept in a growth room at 24 °C ± 1 °C under a 16-h photoperiod and 40 μmol m⁻² s⁻¹ irradiance (quantified by a LI-250A Light Metre radiometer, LI-COR®).

2.5. Experimental design and evaluations

The experiment was conducted in a completely randomized design with a 2 × 4 factorial arrangement. Two tissue origins were tested (Or₁ - epicormic shoots collected from pruned branches of 46-year-old mother plants; Or₂ - shoots collected from 1-year-old seminal mini-stumps) and four inoculation methods (Me₁ - culture medium supplemented with 0.5 g L⁻¹ of activated

charcoal; Me₂ - culture medium supplemented with 800 mg L⁻¹ PVP30; Me₃ - exposure to light for 30 days; Me₄ - exposure to dark for 7 days). At 30 days after inoculation, the percentage of tissue oxidation, percentage of unresponsive explants (explants with green colour and no oxidation, but absence bud and shoot formation), rate of fungal and/or bacterial contamination, establishment percentage (explants free of contamination and oxidation and that formed shoots), and the number of shoots formed per explant were calculated (Figure 2A-D).

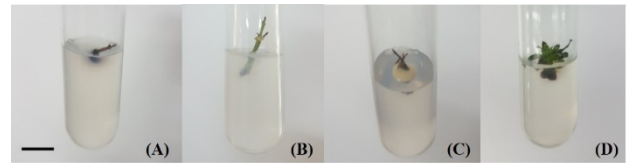


Figure 2. Details of the characteristics evaluated during the *in vitro* establishment of explants (nodal segments) from shoots of *E. pilularis* seminal mini-stumps. A) Explant representing oxidized tissue; B) Unresponsive explant; C) Contaminated explant; D) Explant established *in vitro*. Bar = 1 cm.

Figura 2. Detalhes das características avaliadas durante o estabelecimento *in vitro* de explantes (segmentos nodais) provenientes de brotações de minicepas seminais de *Eucalyptus pilularis*. A) Explante oxidado; B) Explante não-responsivo; C) Explante contaminado; D) Explante estabelecido *in vitro*. Barra = 1 cm.

2.6. Data analysis

The analyses were performed in R Core Team software (2018). The variables that did not have a normal distribution according to the Shapiro-Wilk test ($p > 0.05$) but did not show homogeneity of variances according to the Bartlett test ($p > 0.05$) were arcsin-transformed. The means of the treatments were subjected to analysis of variance (ANOVA, $p < 0.05$) and compared by the Duncan test ($p < 0.05$).

3. RESULTS

The ontogeny of the tissues and the inoculation methods tested in the *in vitro* establishment of nodal segments of *Eucalyptus pilularis* influenced the morphophysiological responses of the tissues in the evaluated characteristics (Figure 3). The two inputs showed no interaction.

Comparing phenolic oxidation between the two tissue origins, the shoots from seminal mini-stumps (Or₂) had the lowest means (27.9%), differing statistically from epicormic shoots (66.2%) (Figure 3A). Regarding the inoculation methods, incubation for 7 days in the dark (Me₄) resulted in significantly higher means of tissue oxidation (67.7%) than the other methods (Figure 3B).

The rate of unresponsive explants (Figure 3C) was affected only by inoculation method. Exposure to the dark for 7 days (Me₄) and the presence of PVP30 in the culture medium (Me₂) resulted in the lowest means (26.5%), differing statistically from Me₃ (55.9%).

The origin of the tissues significantly affected in fungal and/or bacterial contamination, *in vitro*

establishment, and number of shoots per explant. The inoculation of Or₂ shoots resulted in a lower mean contamination rate (54.4%) (Figure 3D) and higher mean establishment percentage (33.8%) (Figure 3E) and mean number of shoots per explant (0.6 shoots) (Figure 3F). It was not possible to establish nodal segments from epicormic shoots with high ontogenetic age (Or₁).

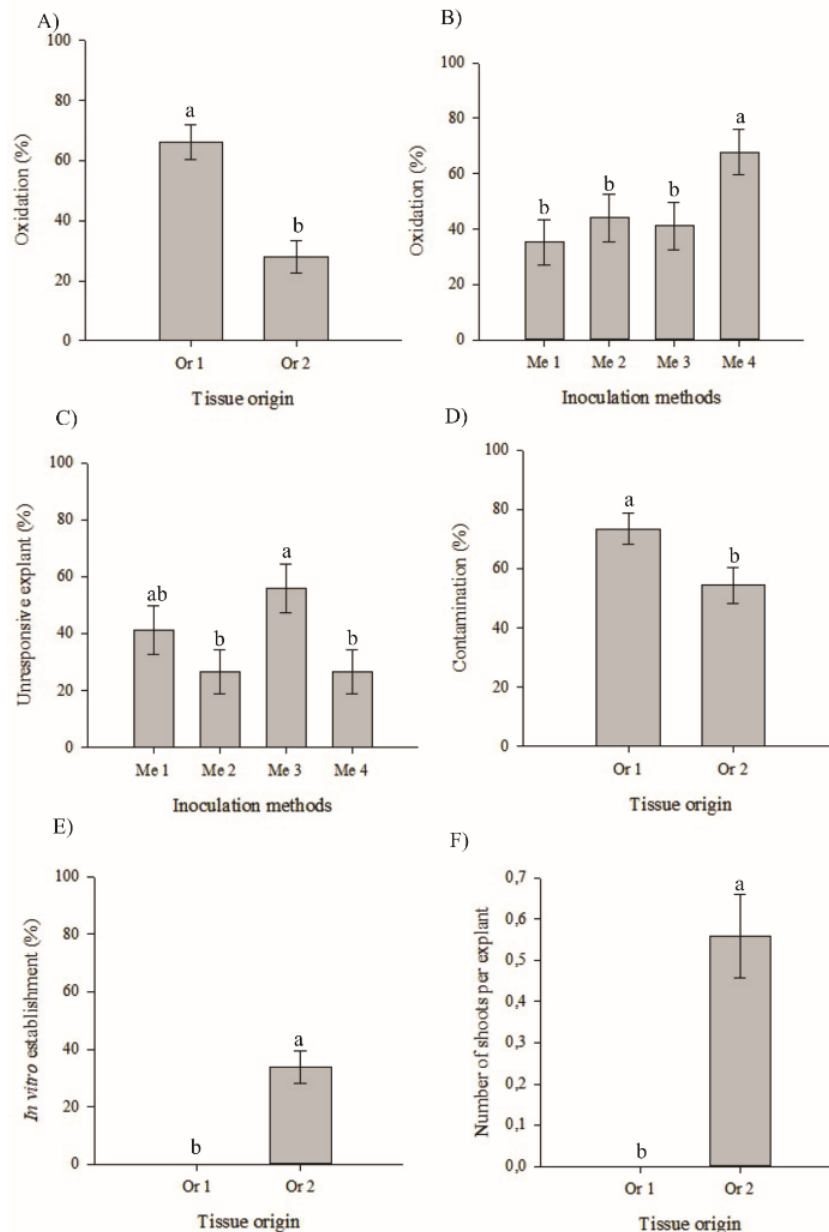


Figure 3. Characteristics evaluated in the *in vitro* establishment of nodal segments of *Eucalyptus pilularis* from two tissue sources (Or₁ and Or₂) and subjected to four inoculation methods (Me₁, Me₂, Me₃, and Me₄). A) Oxidation (%) as a function of the origin of the tissues; B) Oxidation (%) as a function of inoculation method; C) Unresponsive explants (%) as a function of inoculation method; D) Fungal and/or bacterial contamination (%) as a function of tissue origin; E) *In vitro* establishment (%) as a function of tissue origin; F) Number of shoots per explant as a function of the origin of the explants. The lowercase letters (a, b) above the bars represent significant differences between treatments according to the Duncan test at 5% significance.

Figura 3. Características avaliadas no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Eucalyptus pilularis* provenientes de duas origens de tecidos (Or₁ e Or₂) e submetidos a quatro métodos de inoculação (Me₁, Me₂, Me₃, e Me₄). A) Oxidação (%) em função da origem dos tecidos; B) Oxidação (%) em função do método de inoculação; C) Explantes não-responsivos (%) em função do

método de inoculação; D) Contaminação fúngica e/ou bacteriana (%) em função da origem dos tecidos; E) Estabelecimento *in vitro* (%) em função da origem dos tecidos; F) Número de brotos por explante em função da origem dos explantes. As letras minúsculas (a, b) acima das barras representam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Duncan a 5% de significância.

4. DISCUSSION

The use of antioxidants, such as PVP and activated charcoal, is one of the methods indicated for the control of tissue oxidation, especially in woody species (AHMAD et al., 2013). In this context, the use of activated charcoal (Me₁) or PVP30 (Me₂) in the culture medium or exposure to light for 30 days (Me₃) reduced the oxidation of *E. pilularis* tissues. The adsorption of phenolic compounds and toxic substances by activated charcoal during the *in vitro* culture of woody species has the advantage of reducing tissue oxidation, which can improve and regulate plant growth *in vitro* under certain conditions (FAGUNDES et al., 2017; LENCINA et al., 2018), corroborating the results of the present study. However, few studies have reported its effects according to ontogenetic age. Here, tissue with a more advanced ontogenetic age probably exuded more phenolic compounds in the culture medium, which may have favoured oxidation, since younger explants are less prone to oxidation than more mature explants (Paiva; Paiva, 2001).

PVP is a polyamide that prevents oxidation and polymerization of phenolic compounds and is selective for this type of substance (ZHOU et al., 2010). The use of the antioxidant effectively reduced phenolic oxidation in *E. pilularis*, as also observed by Silveira et al. (2016) in *Calophyllum brasiliense* (Cambess.). However, Sartor et al. (2013) observed that the use of PVP as an antioxidant for *Dalbergia nigra* (Vell.) led to greater oxidation of explants. These differences show that the responses found for a given trait are influenced by the antioxidant agent and by the species studied.

Miranda et al. (2019), studying the *in vitro* establishment of *Eremanthus incanus*, observed that PVP and activated charcoal had non-significant effects on the oxidation percentage of the explants, and values of 50-60% were observed, which were higher than those found in the present study for *E. pilularis*. In *Rubus idaeus* L., there was an increase in oxidation in the cultivars as the dose of activated charcoal in the culture medium increased (FAGUNDES et al., 2017). The increase in the concentration of an antioxidant can be harmful by adsorbing other substances from the nutrient medium, causing undesirable effects on *in vitro* culture (GALDIANO-JÚNIOR et al., 2010). Some studies report the efficiency of supplementation of the culture medium with activated charcoal and PVP or the combination of both in reducing phenolic oxidation, as observed in nodal segments of *Eugenia pyriformis* (ASSIS et al., 2017) and *Psidium guajava* (AGUILAR et al., 2016), corroborating the results found for *E. pilularis*.

Alfenas et al. (2009) indicate that, in addition to the use of antioxidants, incubation of explants in the dark for 5-7 days may reduce oxidation. According to Termignoni (2005), plants with high tissue oxidation should be kept in the dark immediately after inoculation in the culture medium, where they should remain for one week before being exposed to light. The absence of light during the culture period of *Eugenia involucrata* DC. reduced phenolic oxidation and favoured the development of callogenic structures (GOLLE et al., 2020). However, the inoculation method of exposure of the tissues to the dark for 7 days (Me₄) was not efficient in reducing the phenolic oxidation in the tissues of nodal segments, resulting in the highest percentage of oxidation (67.6%), corroborating the results observed by Miranda et al. (2019) in *Eremanthus incanus*.

Although Me₄ resulted in the lowest percentages of unresponsive explants (26.5%), i.e., explants that showed green colour, absence of oxidation, but absence of bud and shoot formation, this does not imply that the other explants produced buds and did not oxidize, given that the treatment generated many oxidized explants. Therefore, the high percentages of phenolic oxidation in the group left in the dark for 7 days may have resulted in tissue death *in vitro*.

Regarding the contamination percentages, Fagundes et al. (2017) observed that the largest losses due to fungal contamination in *Rubus idaeus* L. were found in culture medium without the addition of activated charcoal, but the use of antioxidant doses did not promote significant differences. Regarding the number of shoots, in *Apuleia leiocarpa*, activated charcoal increased the length of shoots and the number of microcuttings per shoot and per micro-stump (LENCINA et al., 2018).

Here, in *E. pilularis*, the inoculation method did not influence the *in vitro* responses of contamination, *in vitro* establishment, or number of shoots per explant. However, the differences found between the two tissue origins for these traits may be related to the degree of tissue juvenility, the origin of the explants, and the physiological and phytosanitary state of the mother plant (WENDLING et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015; BACCARIN et al., 2015).

The mother plant exerts great influence on the exudation of phenolic compounds by the *in vitro* tissues, which is dependent on the genotype, the development phase of the plant, and the season of the year in which the tissues are collected (WERNER et al., 2009). The ontogenetic age of the tissues can be altered by *ex vitro* and *in vitro* methods that accelerate or delay maturation or induce juvenility (WENDLING et al., 2014) and the nutritional, water, phytosanitary, and light conditions under which the plants are grown may alter the physiological age of the tissues (WENDLING et al., 2014).

In this context, the complete reversal of maturation that occurs through meiosis, gametogenesis, and formation of the zygotic embryo, induction of juvenility in mature clones by cultural treatments and reduction of ontogenetic age characterize tissue rejuvenation (WENDLING et al., 2014). On the other hand, the reduction in physiological age, i.e., the increase in tissue vigour, characterizes reinvigoration (WENDLING et al., 2014). The ideal management of a mini-garden in terms of mineral nutrition, for example, can make propagules more predisposed to rooting, as observed by Lopes et al. (2016) for *Eucalyptus urophylla*. A plant with a balanced nutritional status generates propagules with carbohydrates, auxins, and metabolic compounds that are essential for the initiation of the rhizogenic process and formation of adventitious roots (CUNHA et al., 2009), components that may also favour *in vitro* establishment.

Explants from seminal mini-stumps have a younger ontogenetic age (higher tissue juvenility) than explants from epicormic shoots of 46-year-old trees (lower tissue juvenility) according to the tissue maturation gradient (ontogenetic age) (BACCARIN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015). In addition, the phytosanitary, nutritional, water, and light conditions (physiological age) to which mini-stumps are subjected can be more easily controlled than the natural conditions, which are a source of microorganisms to which trees in the field are exposed. Thus, the inoculation of explants from mini-stumps can favour the vigour of tissues as linked to physiological age, enabling reinvigoration (WENDLING et al., 2014), a lesser release of phenolic compounds as linked to ontogenetic age, the ability to form shoots, and lower percentages of fungal and/or bacterial contamination, as observed in the present study. For this reason, the *in vitro* establishment of explants from *E. pilularis* epicormic shoots may have been compromised by the high percentages of contamination by microorganisms and tissue oxidation when compared to explants originated from shoots of seminal mini-stumps. This result indicates that the juvenility factor should be considered for *in vitro* establishment when cloning selected trees by micropropagation.

However, the temperatures and rains accumulated during the pruning of branches and in the collection of epicormic shoots may have influenced the ability to emit shoots and the establishment of tissues *in vitro* (Oliveira et al., 2015). According to Avelar et al. (2020), *Eucalyptus pilularis* emitted the highest number of total epicormic shoots (219) at 45 days in the greenhouse and resulted in one of the highest percentages of *in vitro* establishment (60%). Differences in seasonality at the time of installation of the experiments may have influenced the emission of shoots on the branches and the morphophysiological responses in the *in vitro* establishment, however other combined factors may have induced the results found in the present study.

5. CONCLUSION

The use of nodal segments collected from shoots of *E. pilularis* (Or₂) seminal mini-stumps showed the best results because they had less tissue oxidation and fungal and/or bacterial contamination, in addition to favouring the *in vitro* establishment of tissues. Supplementation of the culture medium with activated charcoal (Me₁) or PVP30 (Me₂) or exposure to light for 30 days (Me₃) was effective at reducing the oxidation of *E. pilularis* tissues.

6. ACKNOWLEDGEMENT

We thank the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) for the financial support and scholarship.

7. REFERENCES

- AGUILAR, L. P.; ESPINO, H. S.; MONTERO, L. L. V.; SEGOVIA, C. P.; BENÍTEZ, S. F. Propagación *in vitro* de guayaba (*Psidium guajava* L.) a partir de segmentos nodales. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, Estado de México, v. 7, n. 2, p. 375-386, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v7i2.351>
- AHMAD, I.; KHAN, T. H.; ASHRAF, I.; NAFEES, M.; MARYAM, M. R.; IQBAL, M. Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 13, n. 4, p. 539-547, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5829/idosi.ajeaes.2013.13.04.1975>
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças de eucalipto**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2009. 500p.

- ASSIS, F. A.; RODRIGUES, F. A.; PASQUAL, M.; ASSOS, G. A.; LUZ, J. M. Q.; JANONI, F.; COSTA, I. J. S.; COSTA, B. N. S.; SOARES, J. S. R. Antioxidants in the control of microorganism contamination and phenol oxidation in *Eugenia pyriformis*. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 1, p. 49-58, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v34n1a2018-36311>
- AVELAR, M. L. M.; SOUZA, D. M. S. C.; MACEDO, E. H.; MOLINARI, L. V.; BRONDANI, G. E. *In vitro* establishment of *Eucalyptus* and *Corymbia* species from epicormic shoots. **Revista Árvore**, v. 44, n. 1, p. 1-11, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1806-908820200000027>
- BACCARIN, F. J. B.; BRONDANI, G. E.; ALMEIDA, L. V.; VIEIRA, I. G.; OLIVEIRA, L. S.; ALMEIDA, M. vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, v. 46, n. 1, p. 465-483, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11056-015-9472-x>
- CASTELLANO, G. R.; CAMARINHO, R. J.; ARTHUR JUNIOR, J. C.; SIXEL, R. M. M.; SILVA, P. H. M. Crescimento de eucaliptos quase centenários no Horto de Rio Claro. **Circular técnica IPEF**, v. 1, n. 206, p. 1-12, 2013.
- CUNHA, A. C. M. C. M.; PAIVA, H. N.; XAVIER, A.; OTONI, W. Papel da nutrição mineral na formação de raízes adventícias em plantas lenhosas. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 58, n. 1, p. 35-47, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.4336/2009.pfb.58.35>
- FAGUNDES, C. M.; MOREIRA, R. M.; RAMM, A.; SCHUCH, M. W.; TOMAZ, Z. F. P. Carvão ativado no estabelecimento *in vitro* de cultivares de framboeseira. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, n. 4, p. 406-413, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.5965/223811711642017406>
- FONSECA, S. M. da; RESENDE, M. D. V. de; ALFENAS, A. C.; GUIMARÃES, L. M. S.; ASSIS, T. F.; GRATTAPAGLIA, D. **Manual prático de melhoramento genético do eucalipto**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2010. 200p.
- GALDIANO-JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; GOMES, E. S.; LEMOS, E. G. M. Morfologia do fruto, semente e propagação *in vitro* de *Caularthron bicornutum* (Orchidaceae). **Revista EPEQ Fafibe**, v. 1, n. 1, p. 64-68, 2010.
- GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; STEFANEL, C. M.; SERROTE, C. M. L.; RABAIOLLI, S. M. dos S.; SILVA, K. B. da. Phyto regulators and lightness in the induction of calli in leaves explants of *Eugenia involucrata* DC. **Ciência Florestal**, v. 30, n. 3, p. 898-906, 2020. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509826987>
- IPEF, 1984. **Procedências de *Eucalyptus* spp. Introduzidas no Brasil por diferentes entidades**. Ipef, Piracicaba; 159 p. <http://www.ipef.br/publicacoes/boletim_informativo/bolinf29.pdf>.
- LENCINA, K. H.; BISOGNIN, D. A.; PIMENTEL, N.; KIELSE, P.; MELLO, U. S. Produtividade de microcepas de grápia (*Apuleia leiocarpa*) mantidas *in vitro*. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 1, p. 150-159, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/1980509831635>
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagation Society**, v. 30, n. 1, p. 421-427, 1980.
- LOPES, A. S.; TSUKAMOTO FILHO, A. A.; BRONDANI, G. E.; MATOS, S. E.; OLIVEIRA, T. M.; BARBOSA FILHO, J.; FONSECA, R. M. C.; NICÁCIO, P. R. Produtividade de minicepas de *Eucalyptus urophylla* S. T Blake em função da solução nutritiva e coleta de brotações. **Nativa**, v. 4, n. 1, p. 44-47, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.14583/2318-7670.v04n01a09>
- MIRANDA, N. A.; TITON, M.; PEREIRA, I. M.; FERNANDES, J. S. C.; SANTOS, M. M. Estabelecimento *in vitro* de *Eremanthus incanus*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 1-7, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.4336/2019.pfb.39e201701525>
- MOURA, V. P. G. **Potencial e uso de espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia* de acordo com locais e uso**. Documentos 68-Embrapa, Brasília-DF, 2001. 33p.
- MOURA, V. P. G.; CASER, R. L.; ALBINO, J. C.; GUIMARAES, D. P.; MELO, J. T.; COMASTRI, S. A. **Avaliação de espécies e procedências de *Eucalyptus* em Minas Gerais e Espírito Santo: resultados parciais**. EMBRAPA-CPAC, 1980. 104p.

- OLIVEIRA, L. S.; BRONDANI, G. E.; BATAGIN-PIOTTO, K. D.; CALSAVARA, R.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. **Australian Forestry**, v. 78, n. 4, p. 219-231, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/00049158.2015.1073211>
- PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. **Cultura de tecidos Textos acadêmicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97p.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018.
- SARTOR, F. R.; ZANOTTI, R. F.; PÓSSA, K. F.; PILON, A.M.; FUKUSHIMA, C. H. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do jacaranda da Bahia. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.
- SILVA, P. H. M. da; SHEPHERD, M.; GRATTAPAGLIA, D.; SEBBENN, A. Use of genetic markers to build a new generation of *Eucalyptus pilularis* breeding population. **Silvae Genetica**, v. 64, n. 1, p. 170- 181, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1515/sg-2015-0016>
- SILVEIRA, S. S.; CORDEIRO-SILVA, R.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; QUOIRIN, M. Micropropagation of *Calophyllum Brasiliense* (Cambess.) from nodal segments. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 3, p. 656-663, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.23714>
- TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2005. 182 p.
- TRUEMAN, S. J.; HUNG, C. D.; WENDLING, I. Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, v. 9, n. 2, p. 1-42, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/f9020084>
- WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry - part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, v. 45, n. 1, p. 473-486, 2014.
- WERNER, E. T.; CUZZUOL, G. R. F.; PESSOTTI, K. V.; LOPES, F. P.; ROGER, J. A. 2009. *In vitro* calogenesis control of pau-brasil. **Revista Árvore**, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622009000600001>
- ZHOU, B.; WEI, X.; WANG, R.; JIA, J. Quantification of the enzymatic browning and secondary metabolites in the callus culture system of *Nigella glandulifera* Freyn et Sint. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 5, n. 1, p. 109-116, 2010.

ARTIGO 2 – ESTABELECIMENTO, MULTIPLICAÇÃO E ALONGAMENTO *IN VITRO* DE MATRIZES ADULTAS DE *Eucalyptus pilularis* Smith COM IDADE CRONOLÓGICA DE 44 ANOS

Artigo formatado conforme a NBR 6022 (ABNT 2018) e adaptado as exigências do Manual de Normalização de Trabalhos Acadêmicos da UFLA.

RESUMO

A definição de técnicas de propagação vegetativa para promover o rejuvenescimento/revigoração de tecidos é essencial para o resgate de árvores adultas do gênero *Eucalyptus* que se encontram em testes de espécies e procedências. O objetivo do trabalho foi avaliar a indução de gemas e brotos epicórmicos em galhos podados, o estabelecimento, a multiplicação, o alongamento *in vitro* e a fidelidade genética de três matrizes de *Eucalyptus pilularis* (M1, M2 e M3) com 44 anos de idade. A matriz M1 apresentou os melhores resultados para número de gemas e brotos epicórmicos, para a oxidação e para explantes não responsivos. Para contaminação, número e comprimento de brotos no estabelecimento, as maiores médias foram observadas em M3. Na multiplicação *in vitro*, o maior vigor e comprimento de brotos foram observados no 15º subcultivo. A oxidação fenólica teve seu maior valor no 12º subcultivo, reduzindo a partir do 13º. O maior número de brotos foi observado no 11º subcultivo. Não foi observado polimorfismo entre a matriz e as plantas obtidas no 15º subcultivo. No alongamento, a utilização de meio de cultura contendo 0,10 mg L⁻¹ de BAP e 1,00 mg L⁻¹ de ANA proporcionaram as menores médias para oxidação, e as maiores para o vigor, o número e comprimento de brotos por explante. Foi observada a emissão de raízes adventícias, demonstrando que, por meio da micropropagação, foi possível induzir a competência ao enraizamento do material, mesmo com avançada idade ontogenética, e a importância da aplicação da clonagem em larga escala para espécies de eucalipto.

Palavras-chave: Clonagem. Enraizamento adventício. Fidelidade genética. Propagação *in vitro*. Rejuvenescimento.

ABSTRACT

Establishing vegetative propagation techniques to promote the rejuvenation/reinvigoration of genotypes is essential for the rescue of adult trees of the *Eucalyptus* genus used in species and provenance tests. The aim of this study was to evaluate the induction of epicormic buds and shoots in pruned branches and the *in vitro* establishment, multiplication, genetic fidelity and elongation of three 44-year-old *Eucalyptus pilularis* selected plants (M1, M2 and M3). The selected plant M1 was the best in terms of number of epicormic buds, number of shoots, oxidation, and non-responsive explants. In the establishment phase, M3 was the best in contamination, number of shoots, and shoot length. In the multiplication phase, the highest vigour and shoot length values of were found in the 15th subculture. Phenolic oxidation had its highest value in the 12th subculture, decreasing from the 13th. The highest value for number of shoots was found in the 11th subculture. No polymorphism was observed between the selected plants and the clonal plants obtained in the 15th subculture. In elongation, the use of culture medium containing 0.10 mg L⁻¹ BAP and 1.00 mg L⁻¹ NAA provided the lowest means for oxidation, and the highest for vigor, number and length of shoots per explant. The emission of adventitious roots was observed, demonstrating that, through micropropagation, it was possible to induce the competence to root the material, even at an advanced ontogenetic age.

Keywords: Cloning. Adventitious rooting. Genetic fidelity. *In vitro* propagation. Rejuvenation.

1 INTRODUÇÃO

O sucesso dos povoamentos florestais implantados com espécies do gênero *Eucalyptus* no Brasil destacam-se pelo rápido crescimento, pela produtividade e pela adaptação ambiental nas várias condições edafoclimáticas (COSTA *et al.*, 2019). O interesse nas espécies do gênero no país teve início na década de 1960 com os incentivos fiscais, e se intensificou em meados de 1970, quando foram implantados testes de espécies e procedências de eucalipto com o intuito de testar espécies potenciais para aplicações industriais, visando à possibilidade de formação de futuros plantios florestais (IPEF, 1984).

A implantação de tais testes foi realizada por meio do Projeto de Desenvolvimento e Pesquisa Florestal (PRODEPEF), juntamente ao Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF) e à EMBRAPA (IPEF, 1984). Um dos últimos testes remanescentes e conservados em termos experimentais está localizado em Lavras, Minas Gerais, no Viveiro Florestal, pertencente ao Departamento de Ciências Florestais (DCF) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (IPEF, 1984).

Dentre as espécies testadas, *Eucalyptus pilularis* Smith é uma das que apresenta grande valor na Austrália pelo seu rápido crescimento e por sua excelente qualidade da madeira (MOURA, 2001), sendo encontrada principalmente nas planícies litorâneas e zonas montanhosas do litoral do estado de Nova Gales do Sul até o sul de Queensland (latitudes entre 25°50' e 37°50' (FONSECA *et al.*, 2010).

No Brasil, as áreas plantadas com a espécie são inexpressivas pela dificuldade de obtenção de híbridos com materiais amplamente utilizados, pela baixa capacidade de rebrota e pela casca volumosa (CASTELLANO *et al.*, 2013). Por outro lado, de acordo com Silva *et al.* (2015), existem importantes variações genéticas dentro da espécie *Eucalyptus pilularis* e há possibilidade de se explorar essa variação para obtenção de materiais superiores e, posteriormente, resgatá-los. É uma espécie com grande potencial para serraria e laminação, principalmente no Sudeste do país (GOMES *et al.*, 1977; GOMES *et al.*, 1981; MENDES *et al.*, 1983; MOURA *et al.*, 1980).

Algumas técnicas de resgate e propagação de matrizes não podem ser utilizadas pela impossibilidade de realizar o abate ou anelamento de árvores selecionadas para posterior clonagem, visando à conservação do povoamento. Assim, a indução de brotações epicórmicas a partir de galhos podados de matrizes selecionadas tem se mostrado como uma alternativa para a obtenção de brotações juvenis sem a necessidade de abater a árvore selecionada (AVELAR,

et al., 2020; BACCARIN *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015; WENDLING; BRONDANI; DUTRA, 2013).

Em árvores adultas, com avançada idade ontogenética, o resgate por brotações epicórmicas e a utilização da micropropagação são formas de promover o rejuvenescimento dos tecidos. No entanto, a utilização da técnica implica na possibilidade de variação somaclonal no material cultivado *in vitro*, principalmente pelo número de subcultivos realizados a fim de promover o rejuvenescimento. Nesse contexto, é importante a aplicação de testes de fidelidade genética para confirmar a clonagem.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a indução de gemas e brotos epicórmicos em galhos podados, o estabelecimento, a multiplicação *in vitro*, a fidelidade genética e o alongamento *in vitro* de três matrizes de *Eucalyptus pilularis* com idade cronológica de 44 anos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização do estudo e material experimental

Os experimentos foram conduzidos no Viveiro Florestal e no Laboratório de Cultivo *In Vitro* de Espécies Florestais, pertencentes ao Departamento de Ciências Florestais (DCF) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizado no município de Lavras, Minas Gerais (21°14'S de latitude; 44°59'W de longitude e 919 m de altitude).

O material experimental utilizado para obtenção dos explantes foi proveniente de brotações epicórmicas de galhos podados, em setembro de 2018, de três matrizes (M1, M2 e M3) com 44 anos de idade de *E. pilularis*, localizadas em um teste de espécies e procedências de *Eucalyptus* e *Corymbia*, instalado em 1974 no Viveiro Florestal (IPEF, 1984) (TABELA 1).

Tabela 1 - Procedências e localização das matrizes de *Eucalyptus pilularis* selecionadas no teste de espécies e procedências.

| Matriz | Identificação | Procedência | Latitude (S) | Longitude (E) | Altitude (m) |
|--------|---------------|-------------------------------|--------------|---------------|--------------|
| M1 | 9492 | Gallangowan QLD | 26°30' | 152°20' | 580 |
| M2 | 6183 | Mte. Glorius – W Brisbane QLD | 27°15' | 152°40' | 600 |
| M3 | 9463 | SW Casino NSW | 28°52' | 153°03' | 549 |

Fonte: Da Autora (2022).

2.2 Coleta e preparo dos galhos para a indução de brotações epicórmicas

As matrizes foram selecionadas de acordo com o critério visual, considerando o fuste mais retilíneo, livre de ataques de patógenos, e com galhos localizados na porção mais baixa da copa, com o intuito de minimizar os efeitos da idade ontogenética (ALMEIDA; XAVIER; DIAS, 2007) e facilitar o corte e a coleta dos galhos.

Os galhos, com diâmetros médios variando de 3,0 a 6,3 cm (três medições em cada galho: porção superior, intermediária e inferior), foram seccionados com 0,50 m de comprimento e acondicionados em casa de vegetação com umidade relativa do ar superior a 80%, temperatura entre 20 e 35°C e sistema de nebulização intermitente com bicos de alta pressão e baixa vazão, controlados automaticamente por umidostato. Os galhos foram dispostos na posição vertical dentro de vasos de polietileno (5 L), preenchidos com areia lavada, sem adubação, visando à indução de brotações epicórmicas (FIGURA 1B).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo testadas três matrizes (M1, M2 e M3) com três repetições, contendo dois galhos por vaso. Aos 45 dias em casa de vegetação, avaliou-se a capacidade de emissão de gemas e brotos epicórmicos dos galhos das três matrizes.

2.3 Estabelecimento *in vitro*

As brotações epicórmicas foram coletadas aos 45 dias após a aplicação de fungicida (dimethyl 4,4'- (o-phenylene) bis (3-thioallophanate)), na concentração de 0,5 g L⁻¹, 48 h antes da coleta. Brotações de 4 a 5 cm de comprimento foram coletadas, imersas em água deionizada autoclavada e transportadas para o Laboratório de Cultivo *In Vitro* de Espécies Florestais.

Os segmentos nodais, utilizados como explantes, foram padronizados com duas gemas axilares, isentos de folhas e com 2 a 3 cm de comprimento (FIGURA 2A). Visando à desinfestação, os explantes foram lavados em água corrente durante 5 min e imersos em solução de álcool a 70 % (v/v) por 30 s com agitação constante, dentro da câmara de fluxo laminar horizontal.

Posteriormente, foram imersos em solução de NaOCl (1,00 - 1,50% de cloro ativo) durante 10 min. Os segmentos nodais foram lavados em água deionizada autoclavada por três vezes após a imersão em álcool e NaOCl. Os explantes foram inoculados verticalmente, sob condições assépticas, em tubos de ensaio de 25 mm × 150 mm, contendo 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Durante todo o processo, os equipamentos utilizados foram desinfestados com solução de álcool 70 % (v/v).

O período decorrido desde a coleta dos explantes até a inoculação em meio de cultura foi inferior a duas horas. Durante a coleta, o transporte e os intervalos entre a desinfestação e inoculação, os explantes foram mantidos imersos em água deionizada e autoclavada para evitar a desidratação.

O meio de cultura foi suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar, e o pH ajustado para 5,8 ± 0,05 com NaOH (0,1 M) e HCl (0,1 M), antes da autoclavagem e da adição do ágar. A autoclavagem do meio de cultura foi realizada à temperatura de 127°C e pressão de 1,5 kgf cm⁻², durante 20 min.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 24 ± 1°C por um fotoperíodo de 16 h de luz e irradiância de 40 μmol m⁻² s⁻¹, quantificada por radiômetro (LICOR®, LI-250A Light Meter).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo testadas três matrizes (M1, M2 e M3) com trinta repetições, compostas por um explante cada. Aos 30 dias (FIGURA 1E) após a inoculação, foram avaliadas a porcentagem média de oxidação, de contaminação, de explantes não responsivos, de estabelecimento *in vitro*, o número e o comprimento de brotos por explante.

2.4 Multiplicação *in vitro*

Brotações padronizadas com 0,5 cm de comprimento, obtidas na fase de estabelecimento *in vitro*, foram transferidas para tubos de ensaio de vidro (25 mm × 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,05 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), 20 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar.

Foram realizados 15 subcultivos, a cada 30 dias (FIGURA 1F), nos quais foram avaliados a oxidação e o vigor, mediante escala de notas proposta por Oliveira *et al.* (2016), o número e o comprimento de brotações por explante. Após a obtenção dos dados, foram realizadas curvas de regressão, relacionando os subcultivos e as características avaliadas.

2.5 Fidelidade genética

A fidelidade genética do material experimental proveniente do 5 e do 15º subcultivos foi testada em comparação à respectiva matriz. Para isso, extrações de DNA foram realizadas de acordo com protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1990). Amostras contendo 20 a 50 mg de tecido foliar das plantas matrizes e das plantas micropropagadas foram coletadas, colocadas em microtubos e maceradas, utilizando nitrogênio líquido. Foram adicionadas 700 μL de tampão

de extração CTAB 2% e, então, as amostras foram submetidas à agitação vigorosa e incubadas por 30 minutos em banho seco, com agitação manual periódica (a cada 10 minutos).

Após este período, foram adicionados às amostras 650 μL de clorofórmio álcool isoamílico (24:1), e foram submetidas novamente à agitação vigorosa, seguida por centrifugação a 12.000 rpm durante 7 minutos. Foram transferidos 500 μL do sobrenadante para novos tubos contendo 500 μL de isopropanol, deixando-os no freezer por 15 minutos, para então serem, mais uma vez, centrifugadas a 12.000 rpm por 7 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 500 μL de etanol 95%, sendo novamente centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram deixados na bancada para a secagem à temperatura ambiente. Finalmente, as amostras foram ressuspendidas em tampão tris-EDTA pH 8,0.

As amostras foram avaliadas quanto à qualidade em gel de agarose 1,0%, corado com GelRed™ (Uniscience), diluído a 0,2% em relação à concentração original do fabricante. Posteriormente, foram quantificadas e avaliadas qualitativamente conforme razão de absorvância entre os comprimentos de onda A260 e A280, utilizando o espectrofotômetro NanoVue Plus™ (Biochrom).

Para avaliar a fidelidade dos materiais genéticos, foram utilizados *primers* universais (Becky, John e UBC127), conforme reportado por Teixeira *et al.* (2020) para outras espécies do gênero *Eucalyptus*. As reações de ISSR foram preparadas em microplacas (PCR-96-Axygen Scientific), sendo que em cada *well* foram colocados 3 μL de DNA (padronizado a 20 ng μL^{-1} para todas as amostras) e 10 μL de mix de reação [1,5 mM de tampão de PCR (50 mM de Tris-HCl pH 8,4; 0,25 mg mL^{-1} de BSA; 20 mM de KCl; 0,1% Ficol; 20 mM de Tartrazine; 0,1 mM de MgCl_2), 1,5 mM de dNTP, 1 U de Taq polimerase Phoeutria (5 U μL^{-1}), Taq diluente (à base de BSA e Tris HCl) e 0,2 mM do *primer*, completando o volume final com água ultrapura (3,25 μL).

As ampliações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700, nas seguintes condições: 2 minutos a 94°C para desnaturação inicial; 37 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 s a 42°C e 1 minuto a 72°C; e extensão final por 7 minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5% e corado com GelRed™ (Uniscience).

Para interpretação dos géis e análises estatísticas, os fragmentos amplificados foram comparados com marcador de peso molecular conhecido Ladder 1Kb Plus. Foram utilizadas apenas bandas bem definidas, sendo avaliado o polimorfismo existente em cada banda. Para isso, foi gerada uma matriz de dados binária, onde 1 indica a presença e 0 a ausência no

indivíduo e, a partir dela, foi calculada a frequência de cada banda e o seu conteúdo de informação polimórfica (PIC). Para cálculo de PIC foi utilizada a equação (1), onde p_i indica a frequência da banda i em cada *primer* (WEILER et al., 2010).

$$PIC = 1 - \sum p_i^2 \quad (1)$$

Com base na matriz binária, foi obtida uma matriz de distância euclidiana entre indivíduos, a partir da qual foram realizadas duas análises. Primeiro, análise de ordenação multivariada através de análise de coordenadas principais (PCoA) (GOWER, 1966; PALMER, 2017) com o objetivo de avaliar a existência de variação entre as plantas matrizes e as plantas micropropagadas. Posteriormente, uma análise de classificação multivariada por agrupamento (*clustering*) utilizando o método de ligação por médias não ponderadas (UPGMA) (EVERITT et al., 2011), com a obtenção do dendrograma correspondente, para avaliar o agrupamento dos indivíduos segundo o critério estabelecido. Para as duas análises foi utilizado o programa “Past” v 3.14 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

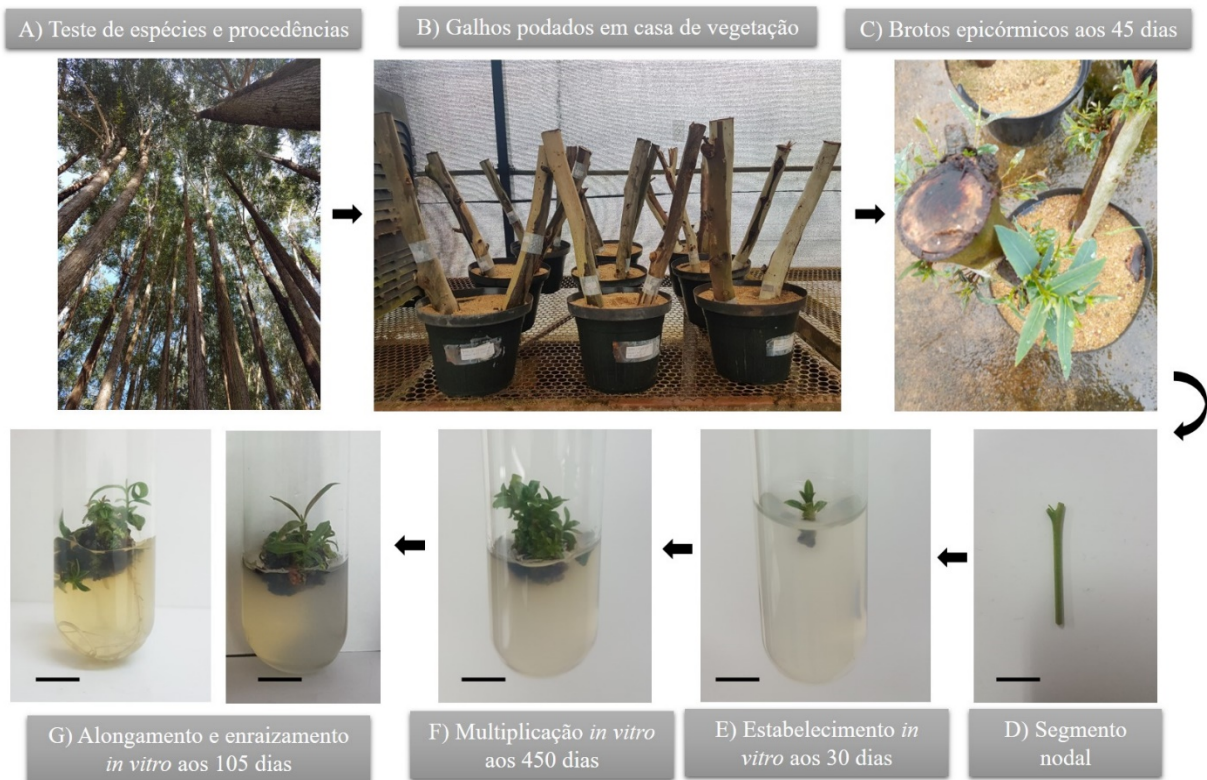
2.6 Alongamento *in vitro*

Brotações padronizadas com 0,5 cm de comprimento, obtidas na fase de multiplicação *in vitro*, foram transferidas para tubos de ensaio de vidro (25 mm × 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado 20 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações de BAP e de ANA.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 × 2, sendo testadas duas concentrações de BAP (0,05 mg L⁻¹ e 0,10 mg L⁻¹) e duas concentrações de ANA (0,5 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹), com quinze repetições, compostas por um explante cada.

Foram realizados três subcultivos, a cada 35 dias (FIGURA 1G), nos quais foram avaliados a oxidação e o vigor, mediante escala de notas proposta por Oliveira et al. (2016), o número, o comprimento de brotações por explante e o enraizamento *in vitro*.

Figura 1 – Fluxograma com as etapas desde a poda dos galhos das matrizes seleccionadas de *Eucalyptus pilularis* até o alongamento e enraizamento *in vitro*.



Fonte: Da Autora (2022).

2.7 Análise de dados

As análises foram processadas no software R, versão 3.0.3 (R CORE TEAM, 2018), com auxílio do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013). As médias dos tratamentos foram utilizadas para a realização das análises estatísticas e ajustes das equações de regressão. As variáveis que não apresentaram distribuição normal perante o teste de Shapiro-Wilk a 5% de significância foram transformadas em arcsen. Para as variáveis significativas foi realizado o teste de comparação de médias de Tukey a 5% de significância.

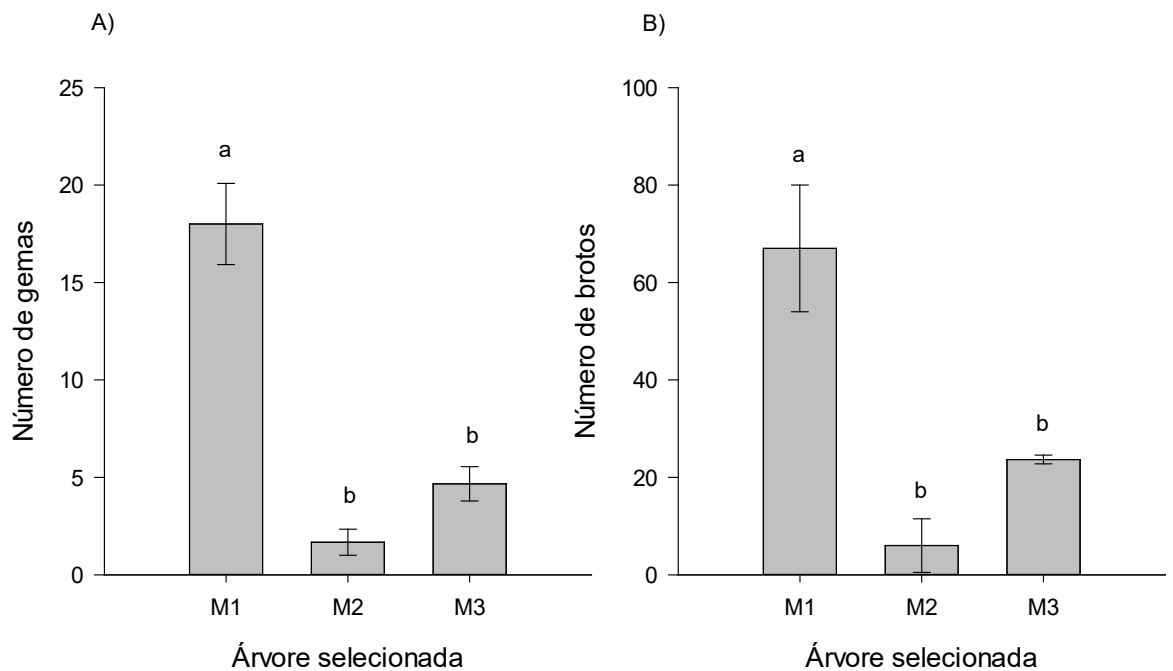
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indução de gemas e brotações epicórmicas

Para as características avaliadas na indução de gemas e brotações epicórmicas nos galhos podados (FIGURA 2), foram observadas diferenças significativas entre as três matrizes de *E. pilularis*, além de ter sido considerada uma técnica viável, uma vez que todas as matrizes emitiram brotos. Apesar das árvores da espécie apresentarem uma casca volumosa no tronco, o mesmo não foi observado nos galhos.

Quanto ao número de gemas observadas aos 45 dias, as maiores médias foram verificadas para M1 (18,0 gemas), a qual diferiu-se estatisticamente de M2 (1,7 gemas) e M3 (4,7 gemas) a 5% de significância (Figura 2A). Em relação ao número de brotos epicórmicos, M1 também apresentou os maiores valores (67,0 brotos) com diferença significativa para M3 (23,7 brotos) e M2 (6,0 brotos) (FIGURAS 2B).

Figura 2 - Características avaliadas aos 45 dias em casa de vegetação nos galhos das três matrizes de *Eucalyptus pilularis* (M1, M2 e M3). A) Número de gemas epicórmicas; B) Número de brotos epicórmicos. As letras minúsculas (a, b) acima das barras representam diferenças estatísticas entre os tratamentos (matrizes) de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. Dados apresentados como média \pm erro padrão.



Fonte: Da Autora (2022).

Diversos trabalhos utilizaram a técnica e confirmaram sucesso na emissão de brotos epicórmicos em galhos podados e na propagação vegetativa de árvores adultas de espécies florestais, como observado em espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia* aos 44 anos de idade (AVELAR *et al.*, 2020), *Eucalyptus cloeziana* aos 26 anos (OLIVEIRA *et al.*, 2015a), *Araucaria angustifolia* aos 20 anos (WENDLING *et al.*, 2009), *Ilex paraguariensis* aos 19 anos de idade (WENDLING; BRONDANI; DUTRA, 2013) e *Eucalyptus benthamii* aos 13 anos de idade (BACCARIN *et al.*, 2015).

O uso dessa técnica é importante principalmente para a conservação de germoplasma e para a seleção de indivíduos superiores, na qual o resgate é feito normalmente na fase adulta, onde a propagação pode ser limitada devido à idade ontogenética (OLIVEIRA *et al.*, 2015b; PIRES; WENDLING; BRONDANI, 2013; WENDLING; BRONDANI; DUTRA, 2013).

O princípio fisiológico que leva à indução de gemas e brotações epicórmicas em galhos podados está relacionado com a alteração do equilíbrio entre auxinas e citocininas favorecendo a emergência da parte aérea (WENDLING; BRONDANI; DUTRA, 2013).

Além disso, as espécies apresentam diferenças anatômicas e morfofisiológicas no meristema e nos tecidos relacionados, nos quais se desenvolveram as brotações epicórmicas (BURROWS *et al.*, 2008). Dessa forma, até mesmo em matrizes de uma mesma espécie, podem ser encontradas diferenças que interfiram no número de brotos induzidos, como observado por Oliveira *et al.* (2015b) em *Eucalyptus cloeziana*.

3.2 Estabelecimento *in vitro*

As variáveis resposta avaliadas (porcentagem de oxidação, de contaminação, de explantes não responsivos, de estabelecimento *in vitro*, número e comprimento de brotos por explante) no estabelecimento *in vitro* apresentaram diferenças significativas entre as matrizes estudadas (FIGURA 3).

Para a oxidação, M1 apresentou os melhores resultados (0,0%), demonstrando diferença significativa em relação à M2 (33,3%) (FIGURA 3A). Em relação à contaminação por fungos e bactérias, as menores médias foram encontradas para M3 (50,0%), a qual se mostrou estatisticamente diferente das demais (FIGURA 3B).

A oxidação de compostos fenólicos, além de promover o escurecimento do meio de cultura, pode levar à morte do explante (AHMAD *et al.*, 2013), e tem sido observada principalmente em espécies lenhosas, nas quais representa um problema associado ao cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Eucalyptus* (BACCARIN *et al.*, 2015; NAVROSKI *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015a).

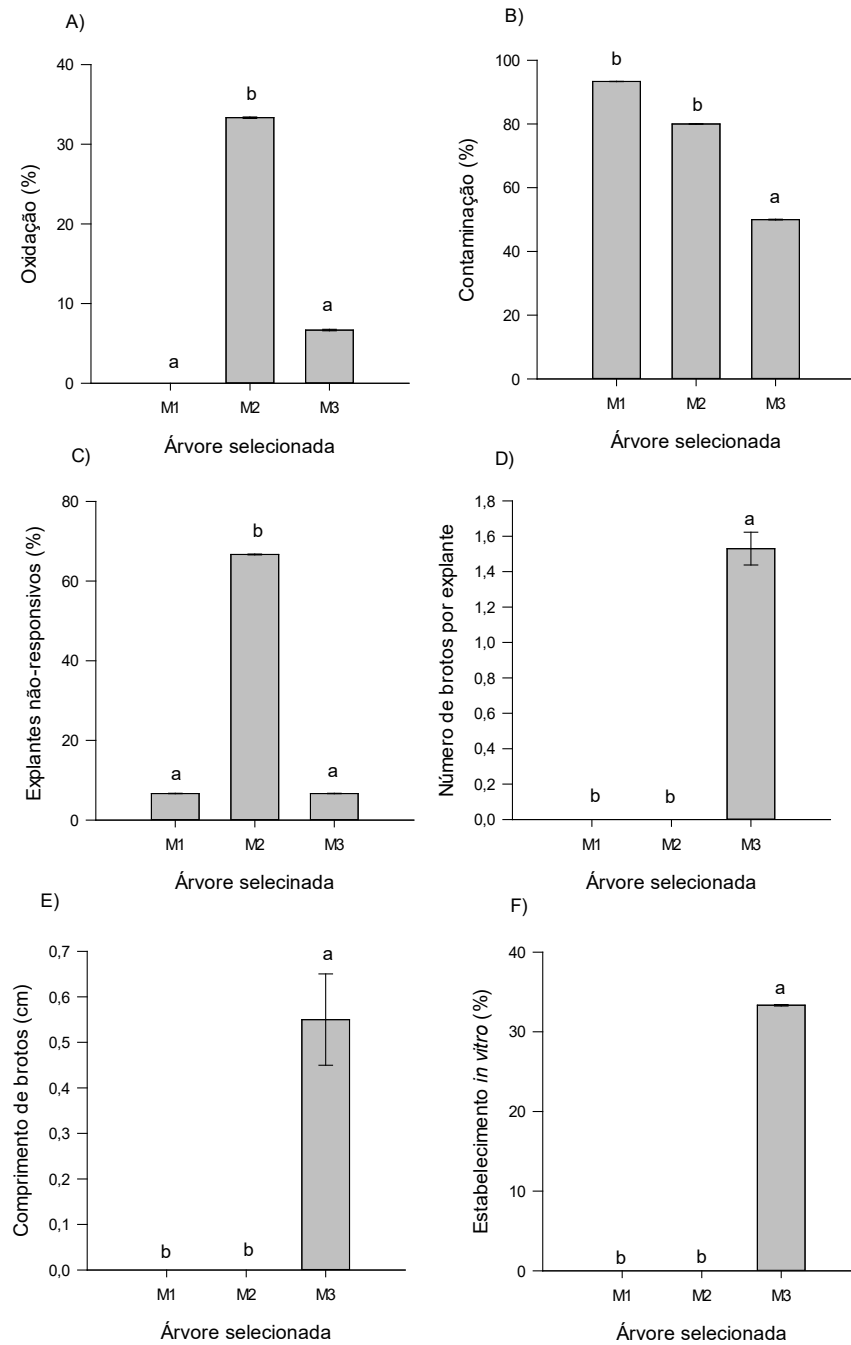
Nesse contexto, os valores observados em explantes provenientes da M1 corroboram com os apresentados por Baccarin *et al.* (2015), estudando a oxidação no estabelecimento *in vitro* de explantes provenientes de brotações epicórmicas induzidas em galhos de matrizes de *Eucalyptus benthamii* (0,0%). Navroski *et al.* (2014) também verificaram diferenças nos percentuais de oxidação entre diferentes genótipos de *Eucalyptus dunnii*, variando de 13,3 a 73,3%.

Segundo Trueman, Hung e Wendling (2018), para garantir o sucesso na micropropagação, é necessário que apenas alguns explantes emitam brotações isentas de contaminação, uma vez que essa fase inicial é a mais limitante da propagação *in vitro*. Os diferentes percentuais de contaminação das matrizes estudadas demonstram que a via metabólica dos microrganismos pode ser regulada pelo genótipo do material vegetal, por meio da expressão genética diferencial, influenciando a biossíntese de carotenóides e a agregação de hifas (POSTEMSKY; CURVETTO, 2016).

Os altos percentuais de contaminação (FIGURA 3B) dos explantes provenientes da M1 e os altos percentuais de oxidação e contaminação (FIGURAS 3A e 3B) em explantes da M2 podem ter causado a morte dos tecidos *in vitro*, impossibilitando o estabelecimento. Em *Eucalyptus cloeziana*, Oliveira *et al.* (2015a) observaram diferenças no estabelecimento *in vitro* de explantes provenientes de brotos epicórmicos emitidos em galhos podados em dezembro de diferentes matrizes com 26 anos de idade, variando de 26,4 a 51,2%.

Quanto à porcentagem de explantes não responsivos, as menores médias foram verificadas para M3 e M1, ambas com 6,7%, enquanto em M2 foi observado 66,7% (Figura 3C). Além disso, os melhores resultados observados para número e comprimento de brotos foram encontrados em M3 (1,5 brotos por explante e 0,6 cm, respectivamente) (FIGURAS 3D e 3E). Em relação ao estabelecimento *in vitro*, M3 foi a única matriz estabelecida (33,3%) (FIGURA 3F).

Figura 3 - Características avaliadas no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais provenientes das árvores selecionadas de *Eucalyptus pilularis* (M1, M2 e M3). A) Oxidação das brotações (%); B) Contaminação por fungos e bactérias (%); C) Explantes não responsivos (%); D) Número de brotos/explante; E) Comprimento de brotos (cm); F) Estabelecimento *in vitro* (%). As letras minúsculas (a, b) acima das barras representam diferenças estatísticas entre os tratamentos (matrizes) de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. Dados apresentados como média \pm erro padrão.

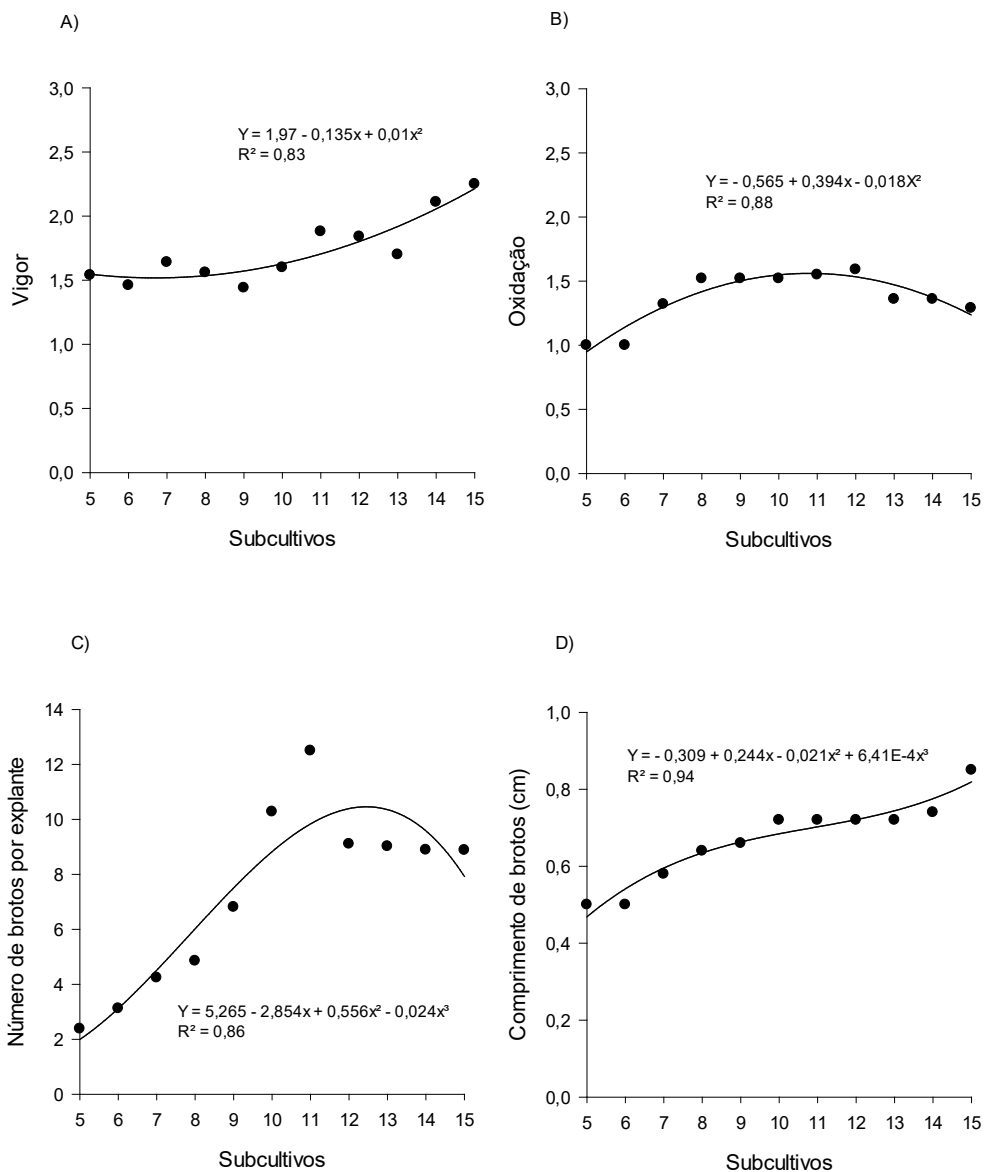


Fonte: Da Autora (2022)

3.3 Multiplicação *in vitro*

A partir das curvas polinomiais de regressão de segundo e terceiro graus ao longo dos 15 subcultivos, verificou-se que o vigor dos explantes foi crescente até o 11º subcultivo (1,9), apresentando uma queda nos dois subcultivos posteriores (1,8 e 1,7), e voltando a crescer a partir do 14º subcultivo (2,1), atingindo o maior valor no 15º subcultivo (2,3) (FIGURA 4A).

Figura 4 - Curvas de regressão de segundo e terceiro grau das características avaliadas na multiplicação *in vitro* da M3 de *Eucalyptus pilularis* ao longo dos subcultivos, realizados a cada 30 dias. A) Vigor das brotações mediante escala de notas; B) Oxidação das brotações mediante escala de notas; C) Número de brotos por explante; D) Comprimento de brotos (cm).



Fonte: Da Autora (2022).

Quanto à oxidação, houve um aumento da liberação de compostos fenólicos no meio de cultura até o 12º subcultivo (1,6), com redução a partir do 13º (FIGURA 4B).

Em relação ao número de brotos, no 11º subcultivo foi observado o maior número de brotos emitidos por explante (12,5 brotos), havendo uma queda no 12º (9,1 brotos) e estabilizando até o 15º (8,8 brotos) (Figura 4C). Para o comprimento de brotos, verificou-se que o maior valor foi encontrado no 15º subcultivo (0,9 cm) (FIGURA 4D).

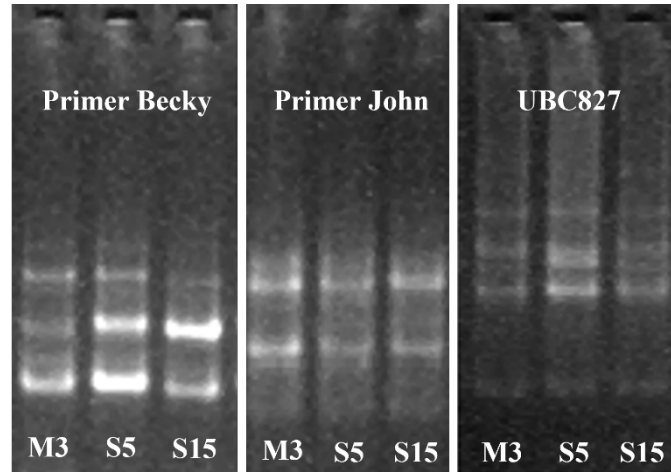
Na multiplicação *in vitro* de explantes provenientes de árvores matrizes de *Eucalyptus cloeziana* aos 26 anos de idade, cujo material vegetal foi subcultivado mensalmente por 19 meses, as concentrações de 1,03 mg L⁻¹ de BAP e 0,06 mg L⁻¹ de ANA resultaram na maior proliferação de brotos para uma das matrizes (OLIVEIRA *et al.*, 2015a), concentrações próximas das que foram utilizadas para *E. pilularis*.

A redução do vigor e do número de brotos emitidos por explante no 12º e no 13º subcultivos pode ter ocorrido devido ao aumento da oxidação fenólica no 11º e também no 12º, o qual resultou em maior valor para esta característica avaliada (1,6) (FIGURA 4B).

3.4 Fidelidade genética

Nas análises de fidelidade genética, foram observados amplicons para todos os primers ISSR utilizados. Não foi observado polimorfismo entre a matriz e as plantas obtidas no 15º subcultivo da fase de multiplicação *in vitro*, ao contrário do que foi observado por Teixeira *et al.* (2020) ao testar a fidelidade genética em populações de *Eucalyptus urophylla* e de *Eucalyptus microcorys*, utilizando o mesmo protocolo. Esses resultados demonstram que os protocolos utilizados não afetaram a estabilidade genética do material e, conseqüentemente, mostraram-se fiéis à planta matriz (FIGURA 5).

Figura 5 - Géis de agarose e primers utilizados (Becky, John e UBC827) no teste de fidelidade genética de *Eucalyptus pilularis* comparando a matriz M3, o 5º e o 15º subcultivos (S5 e S15).



Fonte: Da Autora (2022).

3.5 Alongamento *in vitro*

As variáveis resposta (oxidação e vigor, mediante escala de notas, número e comprimento de brotos por explante) no alongamento *in vitro* apresentaram interação significativa diante das concentrações de ANA e de BAP (TABELA 2). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos para o enraizamento *in vitro*.

Tabela 2 - Características avaliadas (oxidação, vigor, número de brotos por explante e comprimento de brotos) no alongamento *in vitro* de *Eucalyptus pilularis* em função das concentrações de BAP e ANA.

| BAP (mg L ⁻¹) | Oxidação | | Vigor | |
|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-------------|
| | ANA (mg L ⁻¹) | | ANA (mg L ⁻¹) | |
| | 0,50 | 1,00 | 0,50 | 1,00 |
| 0,05 | 1,6 Aa±0,19 | 1,7 Aa±0,15 | 1,6 Aa±0,16 | 1,2 Ab±0,11 |
| 0,10 | 1,5 Aa±0,17 | 1,0 Bb±0,00 | 1,7 Aa±0,18 | 2,1 Aa±0,19 |
| BAP (mg L ⁻¹) | NB | | CB (cm) | |
| | ANA (mg L ⁻¹) | | ANA (mg L ⁻¹) | |
| | 0,50 | 1,00 | 0,50 | 1,00 |
| 0,05 | 5,8 Aa±0,62 | 3,6 Bb±0,21 | 0,6 Aa±0,03 | 0,5 Ab±0,01 |
| 0,10 | 5,6 Ba±0,79 | 8,0 Aa±0,72 | 0,7 Ba±0,06 | 1,0 Aa±0,11 |

Dados apresentados com média ± erro padrão. As letras (A, a, B, b) representam diferenças estatísticas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. Letras maiúsculas (na linha) representam as diferenças das concentrações de ANA dentro da concentração de BAP. Letras minúsculas (na coluna) representam as diferenças das concentrações de BAP dentro da concentração de ANA. Em que: NB = número de brotos por explante e CB = comprimento de brotos.

A utilização de 0,10 mg L⁻¹ combinada com 1,0 mg L⁻¹ de ANA resultou nas menores médias para oxidação (1,0) e nas maiores para vigor (2,1), número (8,0 brotos) e comprimento de brotos por explante (1,0 cm) (TABELA 2).

O sucesso da micropropagação está em função de diversos fatores, dentre eles as concentrações de reguladores de crescimento, uma vez que são os principais responsáveis pelos estímulos de respostas para diferenciação, crescimento e alongamento celular (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Dentre os fitorreguladores mais utilizados na cultura de tecidos, as citocininas promovem a divisão celular e estão ligadas à diferenciação celular no processo de formação das partes aéreas e raízes (TAIZ; ZEIGER, 2009.). As auxinas, por sua vez, controlam o crescimento e alongamento celular, principalmente na promoção de raízes laterais e adventícias (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A 6-benzilaminopurina (BAP) é a citocinina mais utilizada, pois tem se mostrado mais eficaz na multiplicação de diversas espécies lenhosas, além de proporcionar o menor custo de aquisição (ARAGÃO; ALOUFA; COSTA, 2011). Quanto às auxinas, o ácido naftalenoacético (ANA) tem sido utilizado em variadas concentrações de acordo com a espécie e/ou cultivar, combinado com citocininas para estimular a indução, o alongamento de brotos e o enraizamento em várias espécies vegetais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), corroborando com os resultados encontrados para *E. pilularis*.

Entretanto, os reguladores de crescimento e as células vegetais interagem de forma complexa e, se o tecido não estiver responsivo, não responderá devidamente à aplicação exógena desses componentes, independente das concentrações e combinações utilizadas (NAVROSKI; REINIGER; PEREIRA, 2015). Diversos trabalhos mostram diferentes combinações utilizadas no alongamento *in vitro* de diferentes espécies vegetais (BRONDANI *et al.*, 2009; NAVROSKI; REINIGER; PEREIRA, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016). Navroski, Reiniger e Pereira (2015) observaram que a utilização de 0,5 mg L⁻¹ de ANA no alongamento *in vitro* de explantes de *Eucalyptus dunnii*, obtidos a partir de brotações provenientes do abate de árvores de três anos de idade, resultou nas maiores médias para número e comprimento de brotos aos 30 dias de cultivo *in vitro*.

Para um clone de *Eucalyptus benthamii* × *E. dunnii*, provenientes de minicepas conduzidas em minijardim clonal, as concentrações entre 0,25 e 0,75 mg L⁻¹ de ANA promoveram maior número de brotações alongadas aos 60 dias de cultivo e a utilização de 1,0 mg L⁻¹ de ANA resultou em efeito negativo para o alongamento, promovendo a indução de calos (BRONDANI *et al.*, 2009), o que não foi observado para *E. pilularis*.

Em *Eucalyptus cloeziana*, aos 26 anos de idade, o número de brotações alongadas foi maior em tratamentos em que o regulador de crescimento ANA não foi adicionado no meio de cultura, independente da concentração de BAP (OLIVEIRA *et al.*, 2015a), diferindo também dos resultados encontrados para *E. pilularis*.

As diferentes respostas morfológicas observadas em relação à aplicação de reguladores de crescimento podem estar atreladas ao genótipo e à idade ontogenética do material vegetal utilizado.

3.6 Enraizamento adventício *in vitro*

A média geral para o enraizamento *in vitro* foi de 3,4%, embora não tenha apresentado diferenças significativas entre os fatores estudados, demonstrando que, por meio da micropropagação, foi possível induzir a competência ao enraizamento do material, mesmo com idade ontogenética avançada (FIGURA 6).

Figura 6 - Emissão de raízes adventícias em brotações alongadas de *Eucalyptus pilularis* em meio de cultura contendo 0,05 mg L⁻¹ de BAP e 0,5 mg L⁻¹ de ANA, aos 105 dias. Barra = 1 cm.



Fonte: Da Autora (2022).

4 CONCLUSÃO

O estabelecimento *in vitro* foi viável a partir de explantes provenientes da matriz M3.

Na multiplicação *in vitro*, o maior valor para número de brotos foi encontrado no 11º subcultivo, e os maiores valores para vigor e comprimento de brotos foram observados no 15º subcultivo. Não houve polimorfismo entre a planta matriz e o 15º subcultivo da fase de multiplicação *in vitro*, demonstrando estabilidade genética do material vegetal.

Na fase de alongamento *in vitro*, a utilização de 0,10 mg L⁻¹ de BAP combinada com 1,0 mg L⁻¹ de ANA resultou nas menores médias para oxidação e nas maiores para vigor, número e comprimento de brotos por explante.

Por meio da micropropagação, foi possível induzir a competência ao enraizamento *in vitro*, mesmo apresentando avançada idade ontogenética.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I. *et al.* Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 13, n. 4, p. 539-547, 2013. <http://dx.doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2013.13.04.1975>.
- ALMEIDA, F. D.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. Propagação vegetativa de árvores selecionadas de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell por estaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 445-453, 2007.
- ARAGÃO, A. K. O.; ALOUFA, M. A. I.; COSTA, I. do A. Efeito do BAP (6-Benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. **Cerne**, Lavras, v. 17, p. 339-345, 2011.
- AVELAR, M. L. M. *et al.* *In vitro* establishment of *Eucalyptus* and *Corymbia* species from epicormic shoots. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 44, p. 1-11, 2020.
- BACCARIN, F. J. B. *et al.* Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, v. 46, p. 465-483, 2015.
- BRONDANI, G. E. *et al.* Establishment, multiplication and elongation *in vitro* of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.
- BURROWS, G. E. *et al.* Leaf axil anatomy and bud reserves in 21 Myrtaceae species from northern Australia. **International Journal of Plant Science**, v. 169, n. 9, p. 1174-1186, 2008.
- CASTELLANO, G. R. *et al.* Crescimento de eucaliptos quase centenários no Horto de Rio Claro. Circular técnica IPEF, n. 206, p. 1-12, jul./2013.
- COSTA, E. V. S. *et al.* Torrefied briquetes of sugar cane bagasse and *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2019.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.
- EVERITT, B. S. *et al.* Hierarchical clustering. In: SHEWHART, W. A.; WILKS, S. S. (Eds.) **Cluster Analysis**, John Wiley & Sons, p. 71-110, 2011.

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

FONSECA, S. M. da. *et al.* Manual Prático de Melhoramento Genético do Eucalipto. Viçosa, MG: Editora UFV, 2010. 200 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A.; Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Org.). Cultura de Tecidos e Transformação de Genética de Plantas. 1. Ed. Brasília: SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.

GOMES, J. M. *et al.* Competição de espécies e procedências de eucalipto na região de Viçosa, Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 1, n. 2, p. 72-88, 1977.

GOMES, J. M. *et al.* Variação do crescimento de espécies e procedências de eucalipto cultivadas na região de Viçosa. Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 5, p. 2, p. 233-49, 1981.

GOWER J. C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, v. 53, n. 3/4, p.325–338, 1966.

HARTMANN, H. T. *et al.* **Plant propagation: principles and practices**, 8th ed. Prentice-Hall, São Paulo, 915 p., 2011.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistic software package for education and data analysis. **Paleontologia Eletrônica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001. http://palaeoelectronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm [Accessed: 31/03/ 2020]

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS (IPEF). **Procedências de *Eucalyptus* spp. introduzidas no Brasil por diferentes entidades**. Piracicaba, v. 10, n. 29, 259 p., 1984. Disponível em: <
http://www.ipef.br/publicacoes/boletim_informativo/bolinf29.pdf>. Acesso em: 03 de maio de 2019.

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

MENDES, J. M. *et al.* Comportamento de 29 espécies de *Eucalyptus* lat two sites in Minas Gerais). **Silvicultura**, v. 8, n. 31, p. 467-471, 1983.

MOURA, V. P. G. Potencial e uso de espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia* de acordo com locais e uso. Documentos 68-Embrapa, Brasília, DF, 33 p., dez. 2001.

MOURA, V. P. G. *et al.* **Avaliação de espécies e procedências de *Eucalyptus* em Minas Gerais e Espírito Santo: resultados parciais**. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, 1980. 104 p. (EMBRAPA-CPAC. Boletim de Pesquisa, 1).

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

- NAVROSKI, M. C. *et al.* *In vitro* establishment and multiplication of genotypes of *Eucalyptus dunnii* MAIDEN. **Cerne**, Lavras, v. 20, n. 1, p. 139-146, jan./mar. 2014.
- NAVROSKI, M. C.; REINIGER, L. R. S.; PEREIRA, M. O. Alongamento *in vitro* de rebentos de *Eucalyptus dunnii* em função de diferentes genótipos e concentrações de ácido 1-naftil-acético (ANA). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, p. 79-86, 2015.
- OLIVEIRA, L. S. de. *et al.* Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. **Australian Forestry**, v. 78, n. 4, p. 219-231, 2015a.
- OLIVEIRA, L. S. de. *et al.* Resgate e estabelecimento de germoplasma *in vitro* de matrizes de *Eucalyptus cloeziana* F. MUELL. **Ciencia e Investigación Forestal**, Chile, v. 21, n. 3, p. 43-52, dez./2015b.
- OLIVEIRA, L. S. *et al.* Multiplicação e alongamento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 235-247, 2016. DOI: [10.5902/198050982524](https://doi.org/10.5902/198050982524).
- PALMER, M. **Ordination methods for ecologists**. Disponível em: <<http://ordination.okstate.edu/>>. Acesso em: 20 de maio de 2019.
- PIRES, P.P.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. Indol-butyric acid and orthotropism in minicutting of *Araucaria angustifolia*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.37, p. 393-399, 2013.
- POSTEMSKY, P. D; CURVETTO, N. R. Curvetto. *In vitro* studies of secondary metabolite-related responses in some species of genus *Grifola* (Agaricomycetes) from Argentina. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 18, n. 4, p. 355-363, 2016. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i4.90.
- R CORE TEAM. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- SILVA, P. H. M. da. *et al.* Use of genetic markers to build a new generation of *Eucalyptus pilularis* breeding population. **Silvae Genetica**, v. 64, n. 1-6, p. 170-181, jan. 2015. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/sg-2015-0016>
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 4. Ed, Trad. De E. R. Santarém. Porto Alegre: Artmed, 2009. 720 p.
- TEIXEIRA, G. C. *et al.* Genetic diversity analysis of two *Eucalyptus* species using ISSR markers. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 270-278, jan./mar. 2020.
- TRUEMAN, S. J.; HUNG, C. D.; WENDLING, I. Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, v. 9, n. 2, p. 1-42, 2018.
- WEILER, R. L. *et al.* Caracterização molecular de uma progênie de tangerineira 'Clementina Fina' e 'Montenegrina'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1523-1529, 2010.
- WENDLING, I. *et al.* Indução de brotações epicórmicas ortotrópicas para a propagação vegetativa de árvores adultas de *Araucaria angustifolia*. **Agronomía Costarricense**, v. 33, n. 2, p. 309-319, 2009.

WENDLING, I.; BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F. Vegetative propagation of adult *Ilex paraguariensis* trees through epicormic shoots. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 1, p. 117-125, 2013.

**ARTIGO 3 – FONTES DE CARBONO NA MULTIPLICAÇÃO E
MIXOTROFISMO NO ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE
Eucalyptus pilularis Smith**

**Artigo formatado conforme a NBR 6022 (ABNT 2018) e adaptado as exigências do Manual de
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da UFLA.**

RESUMO

A utilização de fontes de carbono e de membranas porosas influenciam o crescimento e o desenvolvimento *in vitro* de diferentes espécies nas fases da propagação *in vitro*, uma vez que estão relacionadas à necessidade de energia e de trocas gasosas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o uso de fontes de carbono (glicose, sacarose, frutose e galactose) na multiplicação e no alongamento *in vitro*, e o efeito da concentração da fonte de carbono e dos sistemas de vedação (SM – ausência de membrana e 1M – presença de uma membrana permitindo trocas gasosas) no alongamento e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus pilularis*. A glicose (20 g L⁻¹) proporcionou os melhores resultados na multiplicação aos 120 dias de cultivo e no alongamento *in vitro* aos 110 dias de cultivo. A utilização da sacarose resultou nos maiores teores de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e clorofila total: *a* + *b*). A interação entre 20 g L⁻¹ de glicose em frascos e tampas contendo 1M promoveu os maiores valores de comprimento de brotos no alongamento *in vitro*. O percentual de enraizamento *in vitro* não foi influenciado pelas concentrações de glicose nem pelos sistemas de vedação, entretanto, o uso de 20 g L⁻¹ de glicose e o uso de 1M resultaram nas maiores médias para comprimento de raízes. Dessa forma, recomenda-se a utilização de 20 g L⁻¹ de glicose como fonte de carbono na multiplicação *in vitro* em tubos de ensaio, no alongamento e no enraizamento *in vitro* em frascos, juntamente a um sistema de vedação com tampas contendo 1M.

Palavras-chave: Glicose. Sacarose. Frutose. Galactose. Trocas gasosas

ABSTRACT

The use of carbon sources and porous membranes influence the *in vitro* growth and development of different species in the *in vitro* propagation phases, since they are related to the need for energy and gas exchange. The aim of the present work was to evaluate the use of carbon sources (glucose, sucrose, fructose and galactose) in the *in vitro* multiplication and elongation, and the effect of the concentration of the carbon source and of the systems of sealing (SM – absence of membrane and 1M – presence of a membrane allowing gas exchange) on *in vitro* elongation and rooting of *Eucalyptus pilularis*. Glucose (20 g L^{-1}) provided the best results in multiplication and elongation *in vitro*. The use of sucrose resulted in the highest levels of photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, carotenoids and total chlorophyll: *a* + *b*). The interaction between 20 g L^{-1} of glucose in flasks and lids containing 1M promoted the highest values of shoot length in *in vitro* elongation. *In vitro* rooting percentage was not influenced by glucose concentrations or by sealing systems, however, the use of 20 g L^{-1} of glucose and the use of 1M resulted in the highest averages for root length. Thus, it is recommended to use 20 g L^{-1} of glucose as a carbon source in *in vitro* multiplication in test tubes, in *in vitro* elongation and rooting in flasks, together with a sealing system with lids containing 1M.

Keywords: Glucose. Sucrose. Fructose. Galactose. Gas exchange

1 INTRODUÇÃO

A micropropagação fotoautotrófica corresponde à propagação e ao crescimento *in vitro* de explantes sob condições assépticas em meio de cultura sem a suplementação de compostos orgânicos, como nutrientes (NGUYEN; XIAO; KOZAI, 2020), correspondendo ao modo natural de nutrição das plantas. Por outro lado, o controle de fatores ambientais, como o uso do fotomixotrofismo, é considerado importante para as respostas morfogênicas *in vitro* (HERINGER *et al.*, 2017), e refere-se ao emprego de fontes de carboidratos endógenos e exógenos para obter energia na presença de enriquecimento com CO₂ (EMARA *et al.*, 2018).

O ambiente de cultivo convencional *in vitro* é diferente do ambiente externo, o que resulta em distúrbios fisiológicos e morfológicos na planta (MENDES *et al.*, 2015), como teores insuficientes de clorofila para realizar fotossíntese de modo a sustentar seu crescimento (GEORGE; HALL; KLERK, 2008), distúrbios nos estômatos, falta de camada de cutícula sobre a folha, parênquimas anormais, hiperhidricidade, dentre outros (HASSANKHAH *et al.*, 2013; TISARUM *et al.*, 2018).

Tais distúrbios podem ser causados pela forma de vedação convencional no cultivo *in vitro*, em que são utilizadas tampas de polietileno. Estas atuam como barreiras, restringindo o fluxo de fótons fotossinteticamente ativos e limitando as trocas gasosas, aumentando a umidade relativa dentro do recipiente, elevando a concentração de etileno, reduzindo a concentração de CO₂, diminuindo as taxas de transpiração, dificultando a absorção de água e nutrientes e causando redução no crescimento e desenvolvimento dos explantes (SOUZA *et al.*, 2020a), o que leva a altas taxas de mortalidade durante a aclimatização *ex vitro* (JIMENÉZ-PERÉZ *et al.*, 2015; SALDANHA *et al.*, 2012; TISARUM *et al.*, 2018).

Além disso, sob baixo fluxo de fótons, o ATP produzido é insuficiente para permitir a fixação de carbono e a biossíntese de carboidratos, o que também contribui para a redução do crescimento das plantas *in vitro*. Por isso motivo, os tecidos mostram melhor desenvolvimento e proliferação após a adição de uma fonte adequada de carbono no meio de cultivo (MAZINGA *et al.*, 2014; SAEZ *et al.*, 2016).

Algumas técnicas têm sido desenvolvidas a fim de fornecer condições ambientais que promovam a capacidade fotossintética do material micropropagado (SOUZA *et al.*, 2020a), como o uso de tampas com filtros permeáveis a gases ou frascos de cultivo com propriedades de ventilação para aumentar a ventilação natural (LOBO *et al.*, 2015; SALDANHA *et al.*, 2013; PITEKELABOU; AIDAM; KOKOU, 2015), e de carboidratos que servem como fonte de carbono e energia para desempenhar funções essenciais no metabolismo das plantas, como

proliferação de brotos, indução e emissão de raízes, embriogênese e organogênese (CHEONG; AN, 2015; PITEKELABOU; AIDAM; KOKOU, 2015; TORMEN *et al.*, 2018).

Adaptações morfológicas e fisiológicas, como emissão e desenvolvimento de raízes, prevenção da perda de água por estômatos funcionais (baixa taxa de transpiração), melhoria na assimilação de CO₂ (alta taxa fotossintética), emissão de novas folhas e aumento da área foliar, aumento de brotos e de biomassa de raízes de plantas aclimatizadas *in vitro* são índices muito importantes para garantir alta sobrevivência e rápido crescimento de plântulas antes da aclimatização *ex vitro* (HOANG *et al.*, 2017).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o uso de fontes de carbono (glicose, sacarose, frutose e galactose) na multiplicação e no alongamento *in vitro*, e o efeito da concentração da fonte de carbono e dos sistemas de vedação (SM – ausência de membrana e 1M – presença de uma membrana permitindo trocas gasosas) no alongamento e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus pilularis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização do estudo e material experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultivo *In Vitro* de Espécies Florestais, pertencente ao Departamento de Ciências Florestais (DCF) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (21°22'75" S, 44°96'98" W) em Lavras, Minas Gerais, Brasil.

O material experimental utilizado como explante foi proveniente de sucessivos subcultivos da multiplicação *in vitro* de brotações. Essas brotações foram originadas de segmentos nodais confeccionados a partir de brotos epicórmicos de galhos podados de uma matriz de *Eucalyptus pilularis* com 44 anos de idade, localizada em um teste de espécies e procedências de espécies do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia* no Viveiro Florestal da UFLA (IPEF, 1984).

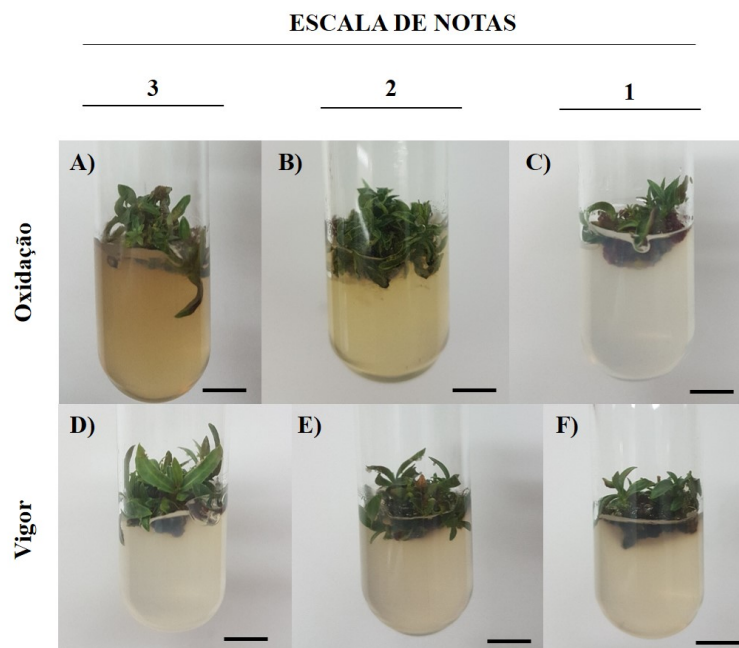
2.2 Multiplicação *in vitro*

Brotações padronizadas com 0,5 cm de comprimento foram inoculadas sob condições assépticas em tubos de ensaio de vidro (25 mm × 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980). O meio foi suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 0,05 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético), 6 g L⁻¹ de ágar e 20 g L⁻¹ de fonte de carbono.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, no qual foram testadas quatro fontes de carbono (frutose, galactose, glicose e sacarose) com trinta e seis repetições, contendo um explante por tubo de ensaio cada.

Aos 120 dias de cultivo na fase de multiplicação *in vitro*, foram avaliados a oxidação e o vigor, mediante escala de notas, o número e o comprimento de brotações (> 0,5 cm) por explante (FIGURA 1) e os teores de clorofila *a*, *b*, carotenoides, *a/b* e total (pigmentos fotossintéticos) em cada tratamento.

Figura 1 – Escala de notas para as avaliações de oxidação e vigor de número e comprimento de brotações de *Eucalyptus pilularis* em resposta à fonte de carbono. A, B e C) Oxidação das brotações (1 = Nula: sem oxidação; 2 = Média: reduzida oxidação na base dos explantes; 3 = Alta: oxidação completa das brotações; D, E e F) Vigor das brotações (1 = Baixo: ausência de indução de brotações e, ou, senescência e morte; 2 = Bom: indução de brotações, porém com folhas de tamanho reduzido; 3 = Ótimo: indução de brotações com crescimento ativo, sem deficiência nutricional; C) Brotações em meio de cultura com sacarose; D) Brotações em meio de cultura com glicose; E) Brotações em meio de cultura com frutose; F) Brotações em meio de cultura com galactose. Barra = 1 cm.



Fonte: Da Autora (2022).

2.3 Pigmentos fotossintéticos

Ao final da multiplicação *in vitro* foram analisadas as concentrações de pigmentos fotossintéticos da clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides, razão entre *a/b* e clorofila total (*a + b*). A extração foi realizada conforme metodologia adaptada de Lichtenthaler (1987). Em ambiente

parcialmente escuro, foi coletado 25 mg de matéria fresca de folhas de três plântulas e colocadas em tubos Eppendorf de 5 mL. Em seguida, pipetou-se em cada amostra um volume de 2,5 mL da solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenadas em local escuro por 48 horas.

Com o pigmento extraído das folhas foi realizada a leitura da absorbância (A) à 480 nm, 649 nm, 665 nm no espectrofotômetro KASUAKI. Para cada tratamento e espécie estudada, as leituras foram realizadas em triplicatas. As concentrações de clorofila e carotenoides foram calculadas seguindo as equações descritas por Wellburn (1994): clorofila $a = [(12,19 \times A_{665}) - (3,45 \times A_{649})]$; clorofila $b = [(21,99 \times A_{649}) - (5,32 \times A_{665})]$ e carotenoides = $(1000 \times A_{480} - 2,14 \times Ca - 70,16 \times Cb)/220$, sendo os resultados expressos em μg de pigmento por mg^{-1} de matéria fresca de tecido foliar ($\mu\text{g mg}^{-1}$ MF).

2.4 Alongamento *in vitro*

Brotações obtidas na fase de multiplicação *in vitro* foram padronizadas com 0,5 cm de comprimento e inoculadas sob condições assépticas em tubos de ensaio de vidro (25 mm \times 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN 1980). O meio foi suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético), 0,05 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 6 g L⁻¹ de ágar e 20 g L⁻¹ de fonte de carbono.

O experimento foi esquematizado em delineamento inteiramente casualizado, no qual foram testadas quatro fontes de carbono (frutose, galactose, glicose e sacarose) com trinta repetições, contendo um explante por tubo de ensaio cada.

Aos 110 dias de cultivo na fase de alongamento *in vitro*, após quatro subcultivos, foram avaliados a oxidação e o vigor, mediante escala de notas, o número e o comprimento de brotações (> 0,5 cm) por explante (FIGURA 1). Após as avaliações, determinou-se a melhor fonte de carbono com base nos melhores resultados para comprimento de brotos.

Em seguida, as brotações parcialmente alongadas (conjunto de brotações > 1,0 cm) foram transferidas para frascos de vidro (250 mL), contendo 40 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético), 0,05 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 6 g L⁻¹ de ágar e 0, 10 ou 20 g L⁻¹ da melhor fonte de carbono para comprimento de brotos, a fim de dar continuidade ao alongamento do material experimental.

O experimento foi esquematizado em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 \times 2, sendo testadas três concentrações da melhor fonte de carbono (0, 10 e 20 g L⁻¹) e dois sistemas de vedação dos frascos (tampas rígidas de polipropileno sem membrana (SM) e

tampas de polipropileno com um orifício de 1,0 cm de diâmetro coberto com uma membrana de 1 cm² (1M) com oito repetições, contendo dois explantes (conjunto de brotações) por frasco.

Aos 150 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados a oxidação e o vigor, mediante escala de notas proposta por Oliveira et al. (2016), número e comprimento de brotações (> 0,5 cm).

Os meios de cultura foram submetidos ao ajuste de pH para $5,8 \pm 0,05$ com NaOH (0,1 M) e HCl (0,1 M), antes da autoclavagem e da adição do ágar. A autoclavagem do meio de cultura foi realizada à temperatura de 127°C e pressão de 1,5 kgf cm⁻², durante 20 min. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 16 h de luz e irradiância de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ quantificada por radiômetro, LICOR®, LI-250A Light Meter).

2.5 Enraizamento *in vitro*

Brotações parcialmente alongadas (conjunto de brotações > 1,0 cm) foram transferidas para frascos de vidro (250 mL), contendo 40 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado com 0,2 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético), 0,2 mg L⁻¹ de AIB (ácido indolbutírico) e 0,05 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina), 6 g L⁻¹ de ágar e 0, 10 ou 20 g L⁻¹ da melhor fonte de carbono para comprimento de brotos, a fim de promover o enraizamento *in vitro* do material experimental.

O experimento foi esquematizado em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3 × 2, sendo testadas três concentrações da melhor fonte de carbono (0, 10 e 20 g L⁻¹) e dois sistemas de vedação dos frascos [tampas rígidas de polipropileno sem membrana (SM) e tampas de polipropileno com um orifício de 1,0 cm de diâmetro coberto com uma membrana, confeccionada com fita microporosa, de 1 cm² (1M)] com oito repetições, contendo dois explantes (conjunto de brotações) por frasco.

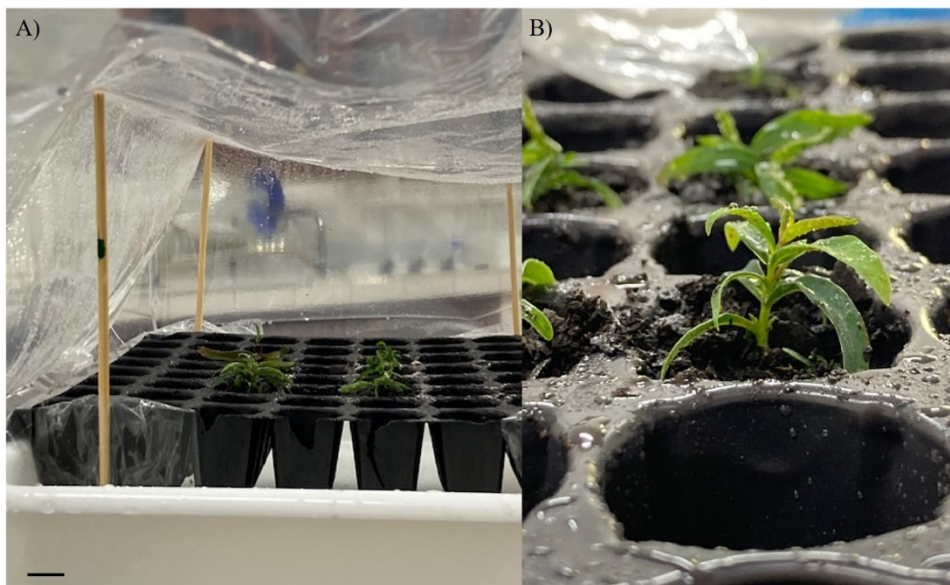
Aos 120 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados a oxidação e o vigor, mediante escala de notas proposta por Oliveira *et al.* (2016), número e comprimento de brotações e de raízes (> 0,5 cm) e o percentual de enraizamento *in vitro*.

Os meios de cultura foram submetidos ao ajuste de pH para $5,8 \pm 0,05$ com NaOH (0,1 M) e HCl (0,1 M), antes da autoclavagem e da adição do ágar. A autoclavagem do meio de cultura foi realizada à temperatura de 127°C e pressão de 1,5 kgf cm⁻², durante 20 min. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 16 h de luz e irradiância de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ quantificada por radiômetro, LICOR®, LI-250A Light Meter).

Miniestufim

Brotações alongadas (> 3,0 cm) foram transferidas para um miniestufim visando o enraizamento e o início da aclimatização (FIGURA 2). O miniestufim foi confeccionado com uma bandeja plástica como suporte para uma bandeja de hortaliças, onde as brotações foram inseridas em substrato composto por vermiculita de granulometria média e substrato comercial, na proporção de (1:1), e mantidas em sala de crescimento. A vedação foi realizada com um saco plástico transparente. Para manter a umidade, borrifações com água foram realizadas sempre que o substrato estivesse seco. Ao longo do tempo, foi realizada a abertura gradual do saco plástico com a finalidade de aclimatização, porém aos 35 dias, houve mortalidade total das brotações.

Figura 2 – Brotações alongadas de *Eucalyptus pilularis* em miniestufim aos 20 dias de aclimatização. A) Detalhe da estrutura do miniestufim; B) Detalhe da brotação alongada inserida no substrato das bandejas do miniestufim. Barra = 1 cm.



Fonte: Da Autora (2022).

Análise de dados

As análises foram processadas no software R, versão 3.0.3 (R CORE TEAM, 2021), com auxílio do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013). As médias dos tratamentos foram utilizadas para a realização das análises estatísticas. As variáveis que não apresentaram distribuição normal perante o teste de Shapiro-Wilk a 5%

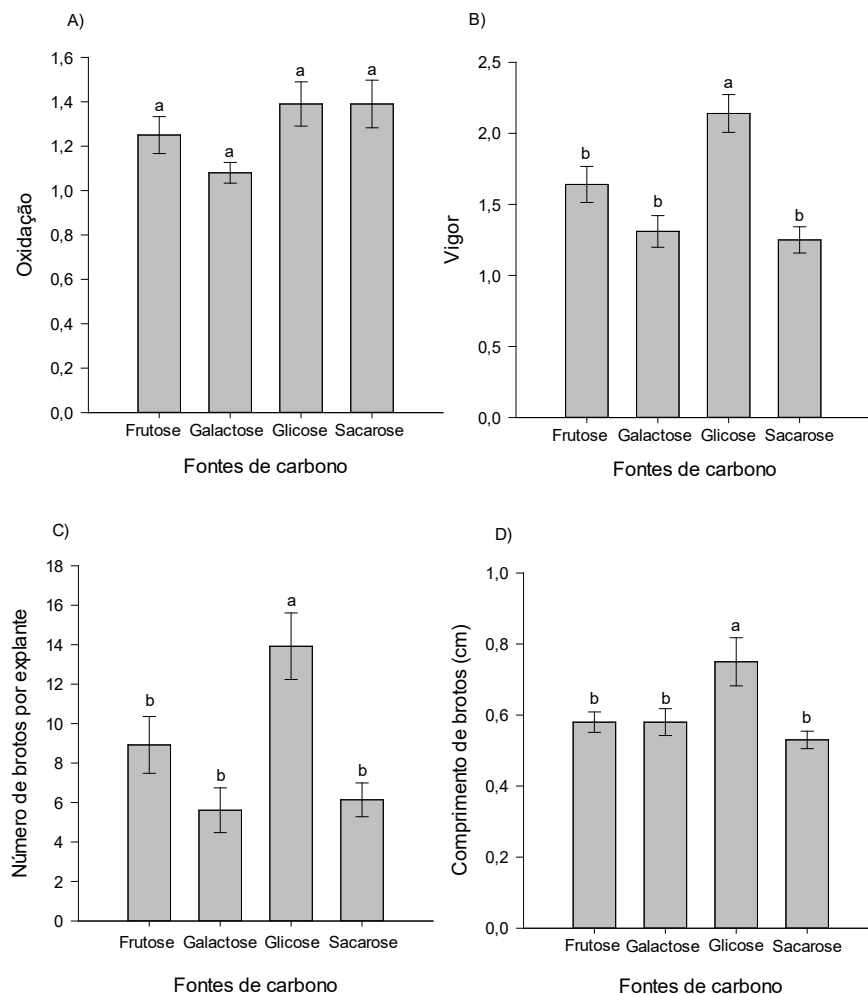
de significância foram transformadas em arcsen. Para as variáveis significativas foi realizado o teste de comparação de médias de Tukey a 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito das fontes de carbono na multiplicação *in vitro*

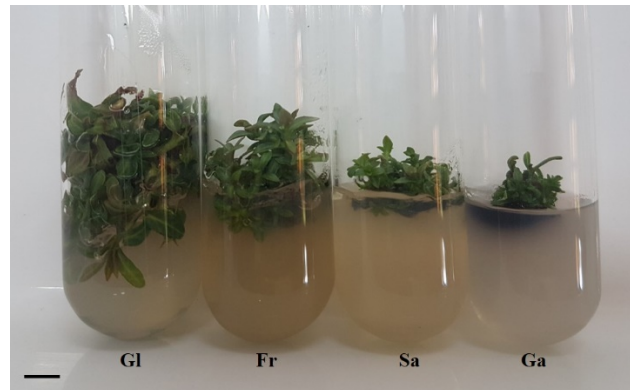
Foram observadas diferenças significativas nas respostas morfofisiológicas mediante às diferentes fontes de carbono utilizadas na multiplicação *in vitro* de *E. pilularis* aos 120 dias de cultivo para a maioria das características avaliadas, exceto para oxidação (FIGURAS 3 e 4).

Figura 3 - Características avaliadas na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pilularis* em função das fontes de carbono (Frutose, Galactose, Glicose e Sacarose). A) Oxidação das brotações; B) Vigor das brotações; C) Número de brotos por explante; D) Comprimento de brotos (cm). As letras minúsculas (a, b) acima das barras representam diferenças estatísticas entre os tratamentos (fontes de carbono) de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. Dados apresentados como média \pm erro padrão.



Fonte: Da Autora (2022).

Figura 4 - Brotações de *Eucalyptus pilularis* aos 120 dias na multiplicação *in vitro* em meios de cultura contendo diferentes fontes de carbono. Gl = glicose; Fr = frutose; Sa = sacarose e Ga = galactose. Barra = 1 cm.



Fonte: Da Autora (2022).

A utilização da glicose como fonte de carbono resultou nas maiores médias para o vigor das brotações (2,14) (FIGURA 3B), para o número de brotos por explante (13,92) (FIGURA 3C) e para o comprimento de brotos (0,75 cm) (FIGURA 3D), diferindo-se estatisticamente das demais fontes.

Entretanto, a sacarose apresentou as menores médias em relação ao vigor (1,25) (FIGURA 3B) e ao comprimento de brotos (0,53 cm) (FIGURA 3D), enquanto a utilização da galactose proporcionou as menores médias quanto ao número de brotos por explante (FIGURA 3C), as quais apenas diferiram estatisticamente da glicose a 5% de significância.

O crescimento e o desenvolvimento *in vitro* de diferentes espécies nas fases da micropropagação são afetados por diversos fatores, podendo-se destacar o tipo e as concentrações de fonte de carbono (EMARA; HAMZA; FEKRY, 2017; TORMEN *et al.*, 2018), as trocas gasosas e os sistemas de vedação (BATISTA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2019).

A presença de carboidratos em meios de cultura tem a finalidade de manter o potencial osmótico, servir como fonte de energia e carbono para o crescimento das células e para o desenvolvimento de processos, como a proliferação de brotos, a indução e emissão de raízes, a embriogênese e a organogênese, sendo dependente do genótipo e do estágio de crescimento (EMARA *et al.*, 2018; YASEEN *et al.*, 2013). Além disso, os tecidos mostram melhor desenvolvimento e proliferação após a adição de uma fonte adequada de carbono no meio de cultivo (MAZINGA *et al.*, 2014).

Embora a sacarose seja o carboidrato comumente utilizado na maioria dos trabalhos em indução e desenvolvimento de brotos *in vitro* em espécies lenhosas, nem sempre é a fonte de carbono mais eficaz para esses fins (CHEONG; AN, 2015; MORADNEZHAD *et al.*, 2017). É um açúcar não-redutor, e esses tipos de açúcares são menos reativos que açúcares redutores (CARVALHO *et al.*, 2013), apresentando no presente estudo as menores médias para vigor, número e comprimento de brotos.

Além disso, a sacarose, um carboidrato com 12-C, ou seja, que apresenta doze carbonos na sua estrutura química, é parcialmente hidrolisada em glicose e frutose, ambas com 6-C, na esterilização do meio de cultura pela autoclavagem (BETTERCOURT *et al.*, 2016). A presença desses compostos é essencial para o crescimento das plantas, uma vez que a fotossíntese da planta, ou do explante é limitada (BETTERCOURT *et al.*, 2016). Dessa forma, outros carboidratos podem ser usados com sucesso como fonte de carbono, entretanto é variável de espécie para espécie. A glicose, por exemplo, é um açúcar redutor, que pode ser prontamente absorvido pelos explantes, fornecendo uma melhor fonte de carbono por difusão através das superfícies do tecidos excisados e metabolizado pelo cultivo *in vitro* (WELANDER; PAWLICKI, 1994).

Segundo Tormen *et al.* (2018), em *Eucalyptus cloeziana*, a utilização de 15 g L⁻¹ de glicose resultou em maiores médias para número e comprimento de brotos, não diferindo-se estatisticamente da utilização de 15 g L⁻¹ de sacarose, porém apresentou redução na oxidação dos tecidos, como observado para *E. pilularis*.

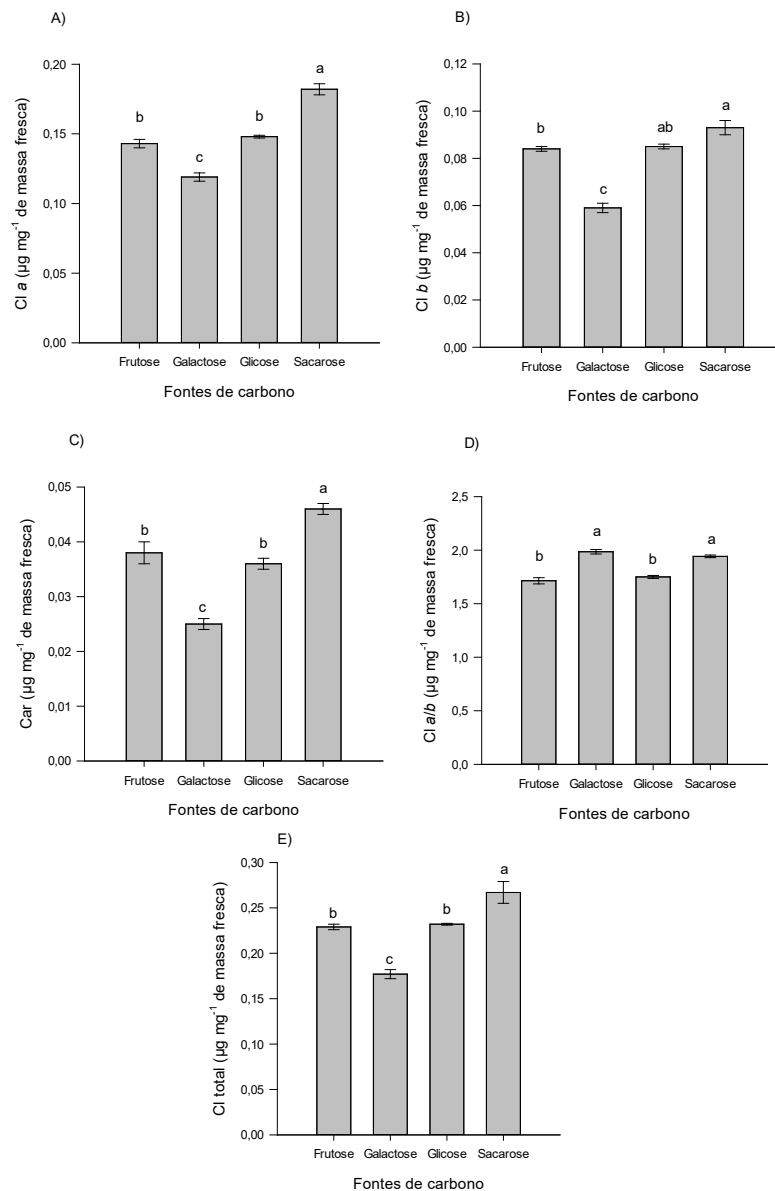
A frutose é um outro monossacarídeo que apresenta resultados positivos no cultivo *in vitro* de algumas espécies. Preethi, Skidhar e Naidu (2011) observaram que a frutose proporcionou melhores resultados do que sacarose, maltose e glicose na micropropagação de *Stevia rebaudiana*. Além disso, Pitekellabou, Aidam e Kokou (2015) verificaram que a frutose como fonte de carbono para a espécie arbórea *Nauclea diderrichii* favoreceu o aumento do número de raízes por explante na concentração de 30 g L⁻¹.

Para espécies de *Prunus*, os melhores resultados no alongamento e no peso fresco foram encontrados em meio de cultura contendo 16 g L⁻¹ de frutose ou glicose ao invés de 30 g L⁻¹ sacarose (CHEONG; AN, 2015). Além disso, as maiores médias verificadas por Harathi, Geetha e Naidu (2016) em relação ao maior número de brotos em meio com frutose para *Sphaeranthus indicus* corroboram com os observados para *E. pilularis*. Em cultivares de *Lonicera caerulea* L., com concentrações de glicose variando de 20 a 40 g L⁻¹, houve um efeito positivo na substituição de sacarose por glicose na multiplicação *in vitro* (ORLOVA; MOLKANOVA; KOROLEVA, 2021), conforme observado no presente estudo.

3.2 Pigmentos fotossintéticos

Para todos os pigmentos fotossintéticos avaliados, foram observadas diferenças nos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenóides, razão *a/b* e clorofila total (*a + b*) mediante às diferentes fontes de carbono utilizadas na multiplicação *in vitro* de *E. pilularis* após 120 dias de cultivo (FIGURA 5).

Figura 5 - Pigmentos fotossintéticos em folhas de *Eucalyptus pilularis* na multiplicação *in vitro* sob diferentes fontes de carbono. A) Teor de clorofila *a*; B) Teor de clorofila *b*; C) Teor de carotenóides; D) Razão entre clorofila *a* e *b*; E) Teor de clorofila total. As letras minúsculas (a, b) acima das barras representam diferenças estatísticas entre os tratamentos (fontes de carbono) de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. Dados apresentados como média \pm erro padrão.



Fonte: Da Autora (2022).

A utilização de sacarose no meio de cultura durante a multiplicação *in vitro* resultou nos maiores teores de clorofila *a* (0,182 $\mu\text{g mg}^{-1}$ MF) (FIGURA 5A), de clorofila *b* (0,093 $\mu\text{g mg}^{-1}$ MF) (FIGURA 5B), embora não tenha diferido estaticamente da glicose neste pigmento, de carotenoides (0,046 $\mu\text{g mg}^{-1}$ MF) (FIGURA 5C), maior razão entre clorofila *a* e clorofila *b* (1,942 $\mu\text{g mg}^{-1}$ MF) (FIGURA 5D), sem apresentar diferença estatística em relação à galactose, e maior teor de clorofila total (0,267 $\mu\text{g mg}^{-1}$ MF) (FIGURA 5E).

Por outro lado, os menores teores de clorofila *a* (0,119 $\mu\text{g mg}^{-1}$ MF), clorofila *b* (0,059 $\mu\text{g mg}^{-1}$ MF), carotenoides (0,025 $\mu\text{g mg}^{-1}$ MF) e clorofila total (0,177 $\mu\text{g mg}^{-1}$ MF) foram encontrados nas folhas de brotações em meio de cultura contendo galactose (FIGURAS 5A, 5B, 5C e 5E).

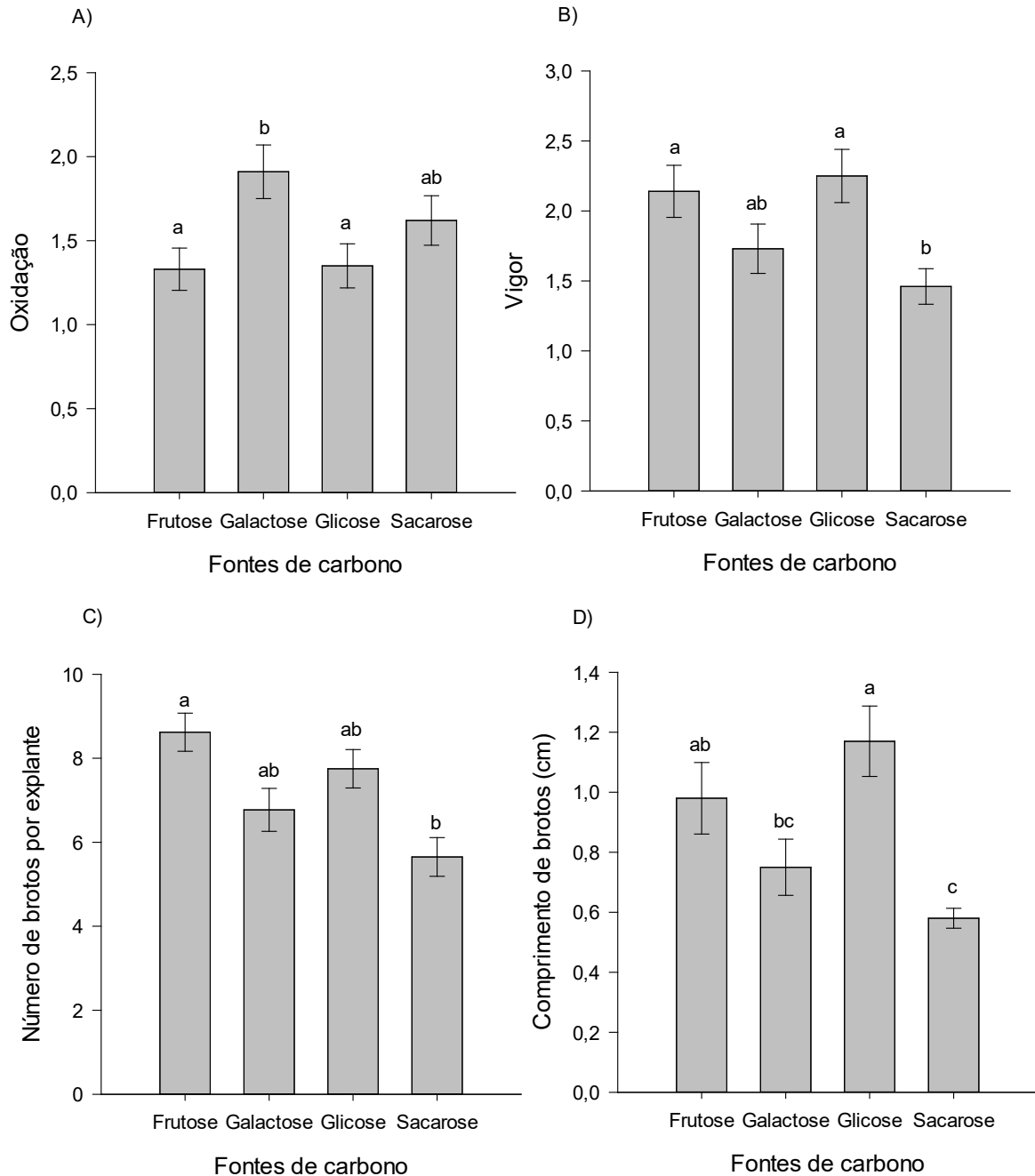
Os carboidratos, em geral, são conhecidos por reprimir a expressão de genes envolvidos na fotossíntese e por diminuir a acumulação de clorofila (GASPAR *et al.*, 2002; ROLLAND; BAENA-GONZALEZ; SHEEN, 2006). A supressão da sacarose no meio de cultivo influenciou significativamente na redução dos teores de clorofila total em *Handroanthus impetiginosus* e em *Jacaranda brasiliana* (SOUZA *et al.*, 2020a).

Para *E. pilularis*, os teores de pigmentos fotossintéticos encontrados na multiplicação *in vitro* foram maiores em meio de cultura suplementado com sacarose, entretanto a sacarose pode ter efeitos de feedback negativos sobre a fotossíntese, reduzindo a quantidade e a atividade da Rubisco (BADR; ANGERS; DESJARDINS, 2011, 2015), podendo o material vegetal economizar energia suficiente, necessária para atividades metabólicas (EMARA *et al.*, 2018), e aumentar o potencial osmótico do meio de cultura, tornando difícil a captação de água para as plantas *in vitro* (PÉREZ *et al.*, 2015), o que possivelmente pode ter promovido menores resultados para vigor e comprimento de brotos na multiplicação e menores resultados para vigor, número e comprimento de brotos no alongamento *in vitro*.

3.3 Efeito das fontes de carbono no alongamento *in vitro*

Para todas as características avaliadas, foram observadas diferenças nas respostas morfofisiológicas mediante às diferentes fontes de carbono utilizadas no alongamento *in vitro* de *E. pilularis* aos 110 dias de cultivo (FIGURA 6).

Figura 6 - Características avaliadas no alongamento *in vitro* de *Eucalyptus pilularis* em função das fontes de carbono (Frutose, Galactose, Glicose e Sacarose). A) Oxidação das brotações; B) Vigor das brotações; C) Número de brotos por explante; D) Comprimento de brotos (cm). As letras minúsculas (a, b) acima das barras representam diferenças estatísticas entre os tratamentos (fontes de carbono) de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. Dados apresentados como média \pm erro padrão.



Fonte: Da Autora (2021).

Para a oxidação fenólica, as menores médias encontradas foram para frutose (1,33) e para glicose (1,35) (FIGURA 6A). Quanto ao vigor das brotações, a fonte de carbono glicose (2,25) e frutose (2,14) apresentaram as maiores médias, diferindo estatisticamente da sacarose (1,46) (FIGURA 6B).

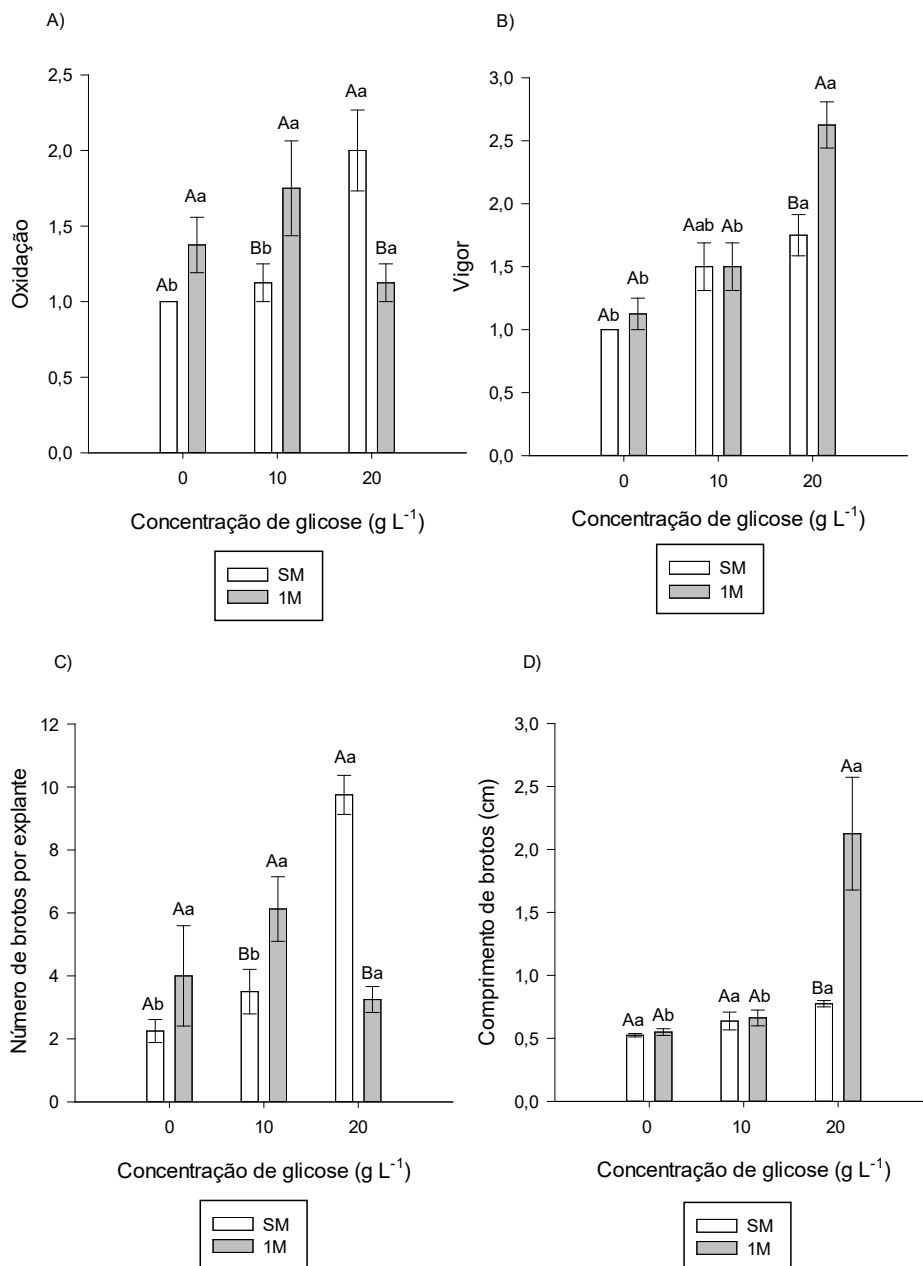
Em relação ao número de brotos, verificou-se as maiores médias para frutose (8,62 brotos/explante), a qual apresentou diferença significativa a 5% da sacarose (5,65 brotos/explante) (FIGURA 6C). Para comprimento de brotos, a utilização da glicose proporcionou as maiores médias (1,17 cm), diferindo estatisticamente da galactose (0,75 cm) e da sacarose (0,58 cm) (FIGURA 6D).

Efeitos positivos da glicose como fonte de carbono foram observados em *Eucalyptus cloeziana* para comprimento de brotos por explante e na redução da oxidação fenólica dos tecidos na concentração de 15 g L⁻¹ (TORMEN *et al.*, 2018). Em *Moringa oleifera*, a utilização de 20 g L⁻¹ de glicose no meio de cultura resultou nos maiores valores para comprimento da parte aérea das plântulas (OKAFOR *et al.*, 2020), corroborando com o resultados observados em *E. pilularis*.

3.4 Efeitos da concentração de glicose e dos sistemas de vedação no alongamento *in vitro*

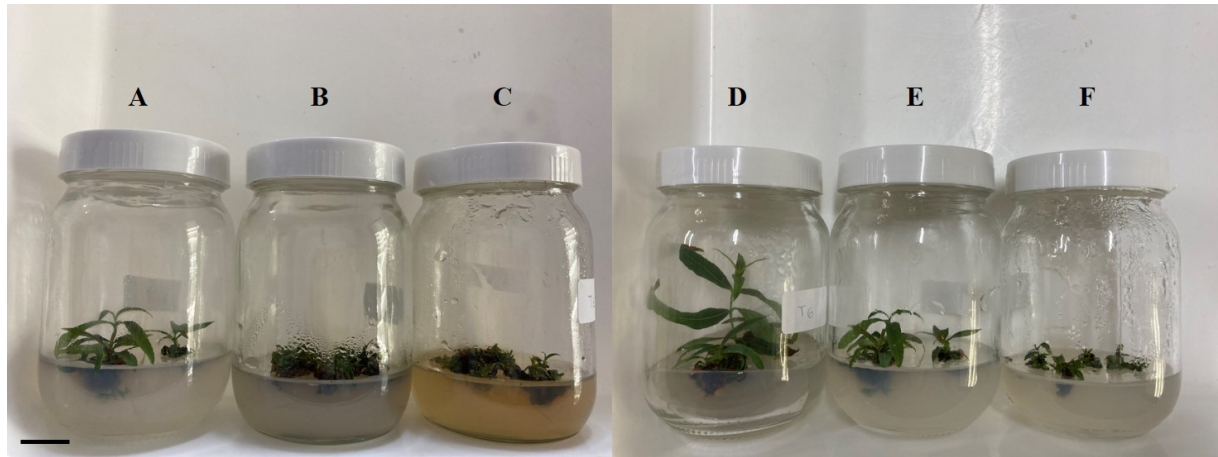
A concentração de glicose e o sistema de vedação dos frascos testados no alongamento *in vitro* de *E. pilularis* influenciaram as respostas morfofisiológicas dos tecidos e apresentaram interação nas características avaliadas (FIGURAS 7 e 8).

Figura 7 - Características avaliadas no alongamento *in vitro* de *Eucalyptus pilularis* em frascos de vidro em função das concentrações de glicose (0, 10 e 20 g L⁻¹) e do sistema de vedação (SM e 1M). A) Oxidação das brotações; B) Vigor das brotações; C) Número de brotos por explante; D) Comprimento de brotos (cm). As letras minúsculas (a, b) acima das barras representam diferenças estatísticas das concentrações de glicose dentro do sistema de vedação, e as letras maiúsculas (A, B) representam diferenças estatísticas dos sistemas de vedação dentro da concentração de glicose de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. Dados apresentados como média ± erro padrão.



Fonte: Da Autora (2022).

Figura 8 - Brotações de *Eucalyptus pilularis* aos 150 dias no alongamento *in vitro* em função das concentrações de glicose e dos sistemas de vedação em frascos. A = 20 g L⁻¹ de glicose e SM; B = 10 g L⁻¹ de glicose e SM; C = 0 g L⁻¹ de glicose e SM; D = 20 g L⁻¹ de glicose e 1M; E = 10 g L⁻¹ de glicose e 1M; F = 0 g L⁻¹ de glicose e 1M. Barra = 1 cm.



Fonte: Da Autora (2022).

Para a oxidação fenólica, as concentrações de glicose não apresentaram diferença significativa com a utilização de 1M, entretanto utilizando tampas de polietileno sem membrana (SM), a concentração de 20 g L⁻¹ de glicose resultou na maior média de oxidação dos explantes (2,00). A concentração de 10 g L⁻¹ de glicose proporcionou maior percentual de oxidação no sistema de vedação com 1M (1,75) (FIGURA 7A).

Quanto ao vigor dos explantes, a suplementação do meio de cultura com 20 g L⁻¹ de glicose resultou no maior valor para esta característica, utilizando-se 1M (2,63). As concentrações de 10 e 20 g L⁻¹ de glicose apresentaram maior vigor nos sistemas de vedação sem membrana (1,50 e 1,75, respectivamente), não diferindo estatisticamente entre si (FIGURA 7B). Para o número de brotos, a concentração de 20 g L⁻¹ promoveu o maior número de brotos por explante no sistema de vedação sem membrana (9,75 brotos por explante), apresentando diferença significativa em relação às demais concentrações. No sistema de vedação com uma membrana (1M), a concentração de 10 g L⁻¹ proporcionou maior número de brotos emitidos por explante (6,13 brotos) (FIGURA 7C).

Em relação ao comprimento de brotos, a utilização de 1M como sistema de vedação e a adição de 20 g L⁻¹ de glicose ao meio de cultura resultaram no maior comprimento de brotos por explante (2,13 cm), diferindo estatisticamente das demais (FIGURA 7D).

Como o ambiente de cultivo convencional *in vitro* é diferente do ambiente externo, o que resulta em distúrbios fisiológicos e morfológicos na planta (MENDES *et al.*, 2015),

adaptações morfológicas e fisiológicas, como emissão e desenvolvimento de raízes, prevenção da perda de água por estômatos funcionais (baixa taxa de transpiração), melhoria na assimilação de CO₂ (alta taxa fotossintética), emissão de novas folhas e aumento da área foliar, aumento de brotos e de biomassa de raízes de plantas aclimatizadas *in vitro* são índices muito importantes para garantir alta sobrevivência e rápido crescimento de plântulas antes da aclimatização *ex vitro* (HOANG *et al.*, 2017).

Além disso, a eficiência das condições fotomixotróficas ou mixotróficas no alongamento e no enraizamento *in vitro* em relação às fotoautotróficas foi reportada em diversos trabalhos (EMARA *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2019, 2020b). Souza *et al.* (2019) observaram que o uso de frascos com membranas que permitem trocas gasosas foi uma alternativa eficiente para melhorar o alongamento e o enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*, e a ausência de carboidratos no meio de cultura foi ineficiente nessas fases, corroborando com os resultados encontrados para *E. pilularis*.

Batista *et al.* (2017) observaram que plântulas de *Capsicum annuum* cultivadas em frascos com tampas com membranas apresentaram estruturas anatômicas diferenciadas e vigorosas, resultando em plântulas maiores, com mais folhas expandidas, maior número de folhas, maior massa fresca e maior quantidade de pigmentos fotossintéticos. O tipo de vedação influenciou as respostas morfogênicas da espécie, demonstrando que o aumento nas trocas gasosas teve efeito positivo sobre a produção de biomassa e aclimatização das plântulas.

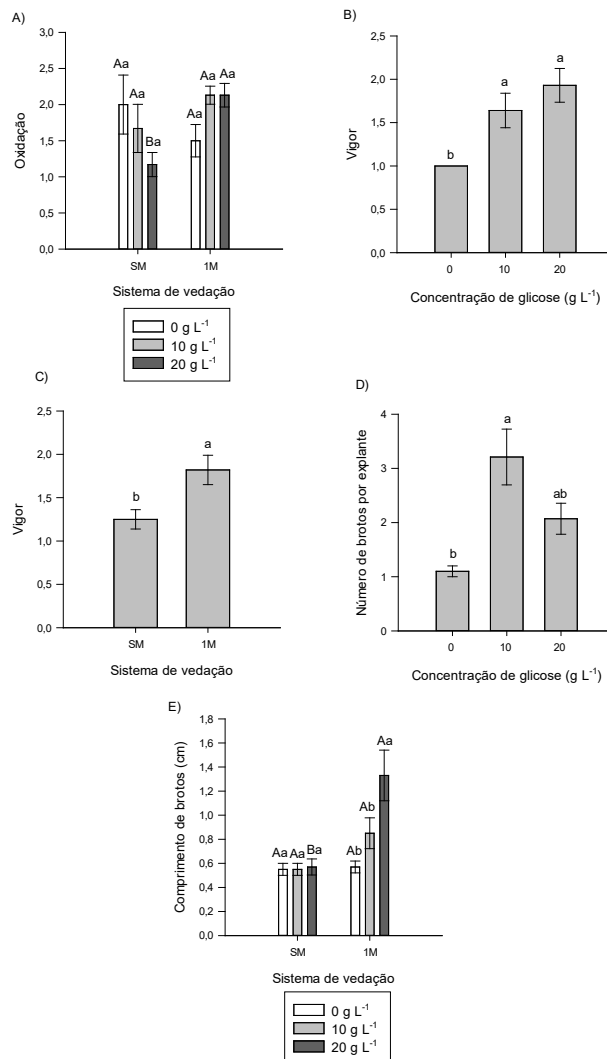
Pelos benefícios que proporciona, a utilização de tampas com membranas porosas em frascos tem promovido o aumento do teor de clorofila *a*, *b* e total, assim como melhorias no sistema fotossintético das plântulas de abacaxizeiro cv. Perolera (MENDES *et al.*, 2015), melhores resultados para comprimento de brotos, número de entrenós e massa secas de brotos foram encontrados em *Tectona grandis* com a utilização de 18 g L⁻¹ de sacarose e de tampas plásticas com filtro (FERNANDES *et al.*, 2013).

Em *Eucalyptus dunnii*, a utilização de frascos com membranas porosas que permitiram maiores trocas gasosas resultou em uma efetiva alternativa para melhorar o alongamento *in vitro* de microestacas (SOUZA *et al.*, 2019), conforme observado para *E. pilularis*.

3.5 Efeitos da concentração de glicose e dos sistemas de vedação no enraizamento *in vitro*

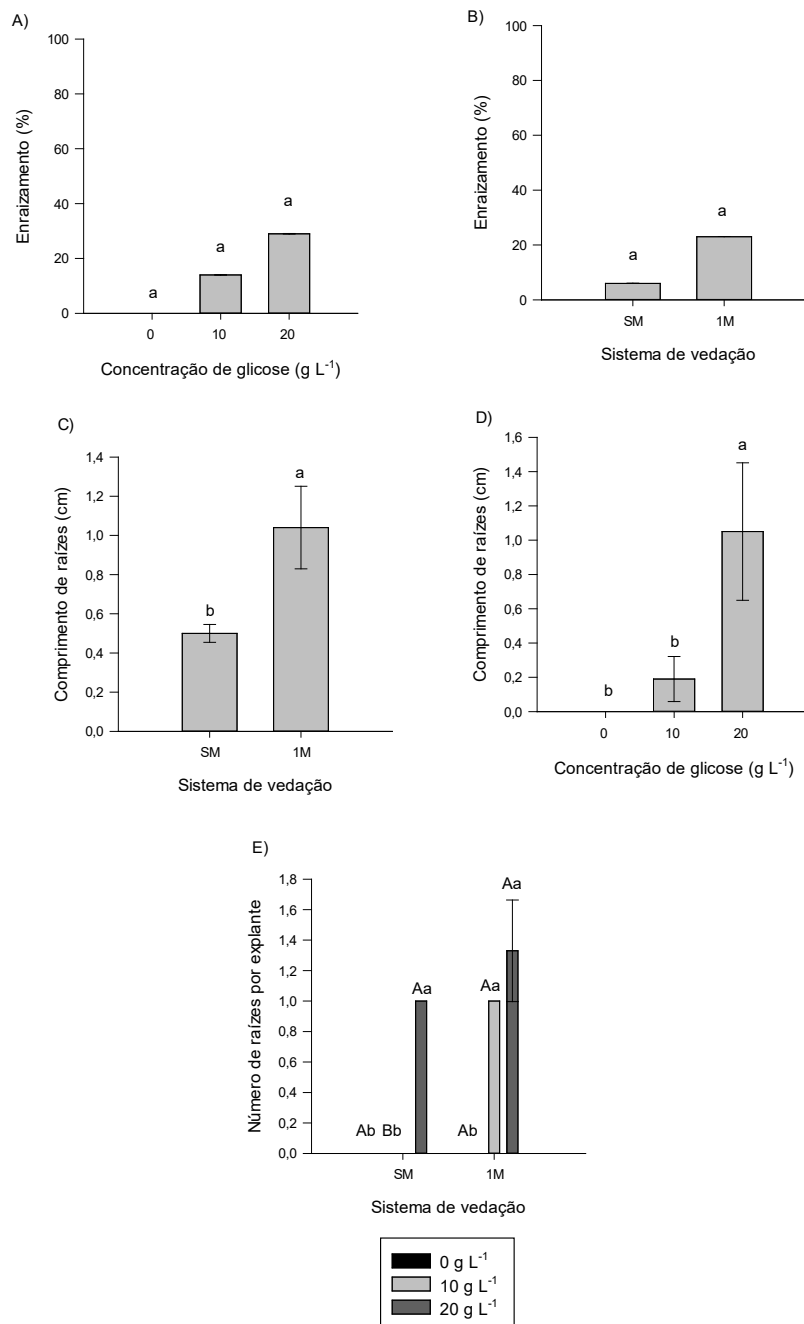
A concentração de glicose e o sistema de vedação dos frascos testados no enraizamento *in vitro* de *E. pilularis* influenciaram as respostas morfofisiológicas dos tecidos e apresentaram interação nas características avaliadas (FIGURAS 9 e 10).

Figura 9 - Características avaliadas no enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus pilularis* em frascos de vidro em função das concentrações de glicose (0, 10 e 20 g L⁻¹) e do sistema de vedação (SM e 1M). A) Oxidação das brotações; B) Vigor das brotações; C) Número de brotos por explante; D) Comprimento de brotos (cm). As letras minúsculas (a, b) acima das barras representam diferenças estatísticas das concentrações de glicose dentro do sistema de vedação, e as letras maiúsculas (A, B) representam diferenças estatísticas dos sistemas de vedação dentro da concentração de glicose de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. Dados apresentados como média ± erro padrão.



Fonte: Da Autora (2022).

Figura 10 - Características avaliadas no enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus pilularis* em frascos de vidro em função das concentrações de glicose (0, 10 e 20 g L⁻¹) e do sistema de vedação (SM e 1M). A) Percentual de enraizamento em função das concentrações de glicose; B) Percentual de enraizamento em função dos sistemas de vedação; C) Comprimento das raízes (cm) em função dos sistemas de vedação; D) Comprimento das raízes (cm) em função das concentrações de glicose; E) Número de raízes por explante. As letras minúsculas (a, b) acima das barras representam diferenças estatísticas das concentrações de glicose dentro do sistema de vedação, e as letras maiúsculas (A, B) representam diferenças estatísticas dos sistemas de vedação dentro da concentração de glicose de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. Dados apresentados como média ± erro padrão.



Fonte: Da Autora (2022).

Para oxidação fenólica, a utilização do sistema de vedação de frascos sem membrana (SM) e contendo 20 g L^{-1} de glicose resultou na menor média de oxidação dos explantes (1,17), apresentando diferença significativa em relação ao uso de 1M (FIGURA 9A). Quanto ao vigor dos explantes, a utilização de 1M nas tampas de polietileno dos frascos proporcionou a maior média nesta característica avaliada (1,82), diferindo-se estatisticamente do sistema de vedação sem membrana (FIGURA 9C). Além disso, as maiores médias para vigor foram observadas em frascos contendo 10 g L^{-1} (1,64) e 20 g L^{-1} (1,93) de glicose, com diferenças significativas em relação à concentração de 0 g L^{-1} (FIGURA 9B).

Para número de brotos por explante, somente a concentração de glicose influenciou as respostas morfofisiológicas dos explantes *in vitro*. A utilização da concentração 10 g L^{-1} resultou na maior média de brotos emitidos por explante (3,21 brotos), diferindo estatisticamente apenas da concentração de 0 g L^{-1} (FIGURA 9D).

Quanto ao comprimento de brotos por explante, o uso de tampas com 1M e contendo 20 g L^{-1} de glicose no meio de cultura resultou na maior média de comprimento de brotos (1,33 cm), apresentando diferença em relação aos frascos sem membranas contendo a mesma concentração (FIGURA 9E).

A concentração de glicose e o sistema de vedação dos frascos não resultaram em diferenças significativas para o percentual de enraizamento *in vitro*. Diferentes desafios podem ser encontrados na micropropagação de plantas, como contaminação, oxidação, dificuldade de enraizamento *in vitro*, variações somaclonais, hiperidricidade, habituação *in vitro*, entre outros (ABDALLA *et al.*, 2022). Possivelmente, esses resultados indicam a habituação dos tecidos, o efeito residual de BAP na multiplicação pelo longo tempo de subcultivo, o que poderia estar correlacionado com a redução do comprimento de brotos.

A habituação celular foi definida como uma perda estável e hereditária ao requerimento dos fatores de crescimento pelas células de plantas cultivadas, em que a habituação às auxinas e citocininas resulta em modificações reversíveis na hereditariedade celular, conhecida como mudanças epigenéticas (MEINS, 1989). Subcultivos e a habituação estão entre os fatores negativos que estimulam alterações epigenéticas e fenotípicas (BEDNAREK; ORLOWSKA, 2020) Células habituadas perdem a capacidade de responder à manipulação externa de reguladores de crescimento (DJANDE *et al.*, 2019).

A habituação causada por prolongados períodos de contínuos subcultivos é a maior limitação aos sistemas de produção comercial, resultando em um progressivo declínio de vigor (AKIN-IDOWU; IBITOYE; ADEMOYEGUN, 2009), diminuição do crescimento, desencadeando estruturas malformadas e perda na capacidade de desenvolver estruturas

especializadas (REE, 2019). Esse fenômeno pode ser desencadeado por alterações na metilação do DNA durante a regeneração da planta *in vitro* (BEDNAREK; ORLOWSKA, 2020). Tais eventos foram observados em *Moringia oleifera* após o tratamento com diferentes razões de 2,4-D/cinetina, resultando em nenhuma rediferenciação de raízes e brotos (DJANDE et al., 2019), em *Bactris gasipaes* (REE, 2019), provavelmente devido ao fenômeno da habituação a reguladores de crescimento exógenos.

A utilização de 10 g L⁻¹ e de 20 g L⁻¹ resultou nas maiores médias para número de raízes por explante em frascos contendo 1M (1,00 e 1,33 raízes, respectivamente), diferindo-se da concentração de 0 g L⁻¹. Além disso, no sistema de vedação SM, a maior média encontrada para esta característica foi observada na concentração de 20 g L⁻¹ (1,00 raiz), diferindo-se estatisticamente das demais concentrações (FIGURAS 10A e 10B).

O comprimento de raízes foi influenciado pelo sistema de vedação e pela concentração de glicose. A utilização de 1M proporcionou a maior média (0,50 cm), apresentando diferença significativa em relação à ausência de membrana. Além disso, a suplementação de 20 g L⁻¹ de glicose resultou na maior média nesta característica (1,05 cm), diferindo-se estatisticamente das demais concentrações (FIGURAS 10C e 10D).

O microambiente dentro dos frascos no cultivo *in vitro* pode variar de acordo com o sistema de vedação utilizado (FREITAS et al., 2021). Na forma de vedação convencional na propagação *in vitro*, são utilizadas tampas de polietileno que atuam como barreiras, restringindo o fluxo de fótons fotossinteticamente ativos e limitando as trocas gasosas, aumentando a umidade relativa dentro do recipiente (KRISANTINI, 2018), elevando a concentração de etileno (SILVA et al., 2017) e reduzindo a concentração de CO₂ (CHEN et al., 2015), fatores que inibem o crescimento e o desenvolvimento da planta.

Por outro lado, no sistema de vedação com membranas porosas, a difusão de ar é elevada, a qual permite o aumento da concentração de CO₂ (KRISANTINI, 2018) e a eliminação do etileno para o ambiente externo (RIBEIRO et al., 2019). Além disso, o aumento da densidade estomática quando são utilizadas membranas porosas pode ser associada ao aumento da fotossíntese causada pela maior disponibilidade de CO₂ (MOLINARI et al., 2020).

A utilização de sistemas de vedação que permitam maiores trocas gasosas que o sistema convencional tem apresentado resultados positivos no cultivo *in vitro* de *Dendrobium bigibbum* Lindl. (RIBEIRO et al., 2019), de *Eucalyptus dunnii* (SOUZA et al., 2019), de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (MOLINARI et al., 2020) e de *Dipteryx alata* Vog. juntamente a diferentes concentrações de carboidrato (BARBOSA et al., 2021).

Para *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, o uso do sistema de membranas para promover a ventilação natural com um filtro e com dois filtros melhoraram o enraizamento da espécie. Além disso, segmentos apicais da espécie devem ser cultivados sob a ventilação natural com um filtro e segmentos nodais devem ser cultivados com dois filtros para garantir melhor crescimento (SILVA *et al.*, 2017).

Na ausência de carboidrato não houve o enraizamento *in vitro* de *E. pilularis*, enquanto a utilização do sistema de vedação com tampas contendo 1M favoreceu o comprimento de raízes adventícias (Figura 8E), corroborando com os resultados encontrados no enraizamento *in vitro* de microestacas de *Eucalyptus dunnii* (SOUZA *et al.*, 2019).

Entretanto, há a necessidade de se desenvolver mais estudos a respeito do tema a fim de minimizar os efeitos negativos desses entraves e otimizar a propagação *in vitro* de *Eucalyptus pilularis*.

4 CONCLUSÃO

A concentração de 20 g L⁻¹ de glicose como fonte de carbono na multiplicação em tubos de ensaio e no alongamento *in vitro* em tubos e em frascos contendo 1M resultou nas melhores médias nas características avaliadas.

No enraizamento *in vitro*, a suplementação do meio de cultura com 10 ou 20 g L⁻¹ de glicose, juntamente a um sistema de vedação com tampas contendo 1M, favoreceu a emissão de raízes adventícias.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, N. *et al.* An academic and technical overview on plant micropropagation challenges. **Horticulturae**, v. 8, n. 677, p. 1-28, 2022.
- AKIN-IDOWU, P. E.; IBITOYE, D. O.; ADEMOYEGUN, O. T. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 16, p. 3782-3788, 2009.
- BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 107, p.13-24, 2011.
- BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Comprehensive analysis of *in vitro* to *ex vitro* transition of tissue cultured potato plantlets grown with or without sucrose using metabolic profiling technique. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, p. 491-508, 2015.
- BARBOSA, G. G. *et al.* Cultivo *in vitro* de embrião zigótico de baru influenciado por tipos de vedações e concentrações de sacarose. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 42390-42408, 2021.
- BATISTA, D. S. *et al.* Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 3, p. 1-6, 2017.
- BEDNAREK, P. T.; ORLOWSKA, R. Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 140, p. 245-257, 2020.
- BETTENCOURT, G. M. F. *et al.* Efeito da fonte de carbono na embriogênese somática em *Bactris gasipaes*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 36, n. 86, p. 179-183, abri./jun. 2016.
- CARVALHO, D.C. *et al.* Fox grape cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) and grapevine cv. Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) cultivated *in vitro* under different carbohydrates, amino acids and 6-Benzylaminopurine levels. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 191-201, 2013.
- CHEN, C. Application of growth models to evaluate the microenvironmental conditions using tissue culture plantlets of *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3'. **Scientia Horticulturae**, v. 191, p. 25-30, 2015.
- CHEONG, E. J.; AN, C. Effect of carbohydrates on *in vitro* shoot growth of various *Prunus* species. **Korena Journal of Plant Resources**, v. 28, n. 3, p. 357-362, 2015.
- DJANDE, C. Y. H. *et al.* Habituated *Moringia oleifera* callus retains metabolic responsiveness to external plant growth regulators. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, p. 246-264, 2019.
- EMARA, H. A.; HAMZA, E. M.; FEKRY, W. A. *In vitro* propagation and microtuber formation of potato in relation to different concentrations of some growth regulators and sucrose. **Middle East Journal of Agriculture Research**, v. 6, n. 4, p. 1029-1037, 2017.

EMARA, H. A. *et al.* Evaluation of photomixotrophic technique and several carbohydrate sources as affecting banana micropropagation. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 10, p. 788-804, 2018.

FERNANDES, D. A. *et al.* Tipos de vedação e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Tectona grandis* L.f. **Revista de Agricultura**, v. 88, n. 3, p. 218-228, 2013.

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

FREITAS, K. G. *et al.* *In vitro* growth of *Cattleya nobilior* Rchb. F.: culture media, sealing systems and irradiance. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, p. 1-9, 2021.

GASPAR, T. *et al.* Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 263-285, 2002.

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

HARATHI, K.; GEETHA, G.; NAIDU, C. V. Effect of silver nitrate and different carbon sources on *in vitro* shoot multiplication of *Sphaeranthus indicus* (Linn.) – An important antijaundice medicinal plant. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 6, n. 1, jan./mar. 2016.

HASSANKHAH, A. *et al.* Effects of ventilation and sucrose concentrations on the growth and plantlet anatomy of micropropagated persian walnut plants. **International Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 1, n. 2, p. 111-120, 2013.

HERINGER, A. S. *et al.* Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.39, p. 39-52, 2017.

HOANG, N. B. *et al.* A comparative study on growth and morphology of wasabi plantlets under the influence of the micro-environment in shoot and root zones during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 130, n. 2, p. 255-263, 2017.

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS (IPEF). **Procedências de *Eucalyptus* spp. introduzidas no Brasil por diferentes entidades**. Piracicaba, v. 10, n. 29, 259 p., 1984. Disponível em: <http://www.ipef.br/publicacoes/boletim_informativo/bolinf29.pdf>. Acesso em: 03 de maio de 2019.

JIMÉNEZ-PÉREZ, M. *et al.* A regime of high CO₂ concentration improves the acclimatization process and increases plant quality and survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, n. 3, p. 547-557, 2015.

KRISANTINI, N. M. A. W. Photoautotrophic System: A Review and Potential Applications in Plant Micro Propagation. **Journal of Tropical Crop Science**, v. 5, n. 2, p. 73-77, 2018.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.

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

LOBO, A. K. M. *et al.* Exogenous sucrose supply changes sugar metabolism and reduces photosynthesis of sugarcane through the down-regulation of Rubisco abundance and activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 179, p. 113-121, 2015.

MAZINGA, K. M. *et al.* Effets du charbon actif dans le milieu de culture sur l'induction de la rhizogénèse chez l'hybride FHIA-01 de bananier (*Musa AAAB*) en culture *in vitro*. **Journal of Applied Biosciences**, v. 73, p. 5991-6001, 2014.

MEINS, F. J. Habituation: heritable variation in the requirement of cultured plant cells for hormones. **Annual Review of Genetics**, v. 23, p. 395-408, 1989.

MEMON, A. A. *et al.* Effect of carbon sources and their various concentrations for optimize in *in vitro* micropropagation of Banana *Musa* (spp.) Basrai. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 1108-1114, 2019.

MENDES, P. S. *et al.* Cultivo *in vitro* de plântulas de abacaxizeiro com uso de filtros, ventilação artificial e sacarose. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 9, n. 2, p. 202-207, 2015.

MOLINARI, L. V. *et al.* Effects of chemical sterilization of the culture media, porous membranes and luminosity on in vitro culture of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **Journal of Forestry Research**, v. 32, p. 1587-1598, 2020.

MORADNEZHAD, M. *et al.* A new approach for olive (*Arbequina* cv.) micropropagation: effect of dikemulac, light and carbon source. **International Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 79-87, jun. 2017.

NGUYEN, Q. T.; XIAO, Y.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. *In: Plant Factory: An Indoor Vertical Farming System For Efficient Quality Food Production*. Cambridge: Academic Press, 2015. p. 333-346.

OKAFOR, U. C. *et al.* Comparison of sucrose and glucose as carbon source for *in vitro* growth of *Moringa oleifera* Lam. embryos. **Nigerian Agricultural Journal**, v. 51, n. 3, p. 16-20, 2020.

ORLOVA, N. D.; MOLKANOVA, O. I.; KOROLEVA, O. V. Improvement of clonal micropropagation technique of promising *Lonicera caerulea* L. cultivars. **IOP Conference Series Earth and Environmental Science**, v. 941, n. 1, p. 1-8, 2021.

PÉREZ, L. P. *et al.* Effects of different culture conditions (photoautotrophic, photomixotrophic) and the auxin indole-butyric acid on the *in vitro* acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Red Maradol) plants using zeolite as support. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 35, p. 2622-2635, 2015.

PITEKELAVOU, R.; AÏDAM, A. V.; KOKOU, K. Influence of various carbohydrates on the *in vitro* micropropagation of *Nauclea diderrichii* (De Wild & T. Durand) Merrill, an endangered forest species in Togo. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 15, p. 1283-1289, apr./2015.

PREETHI, D.; SRIDHAR, T. M.; NAIDU, C. V. Carbohydrate concentration influences on *in vitro* plant regeneration in *Stevia rebaudiana*. **Journal of Phytology**, v. 3, n. 5, p. 61-64, 2011.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021.

REE, Joseph Francis. **Impermanence of somatic embryogenesis: the effect of and solutions to gradual aging of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) cultures *in vitro***. 2019. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

RIBEIRO, L. M. *et al.* Influência da luz, ventilação natural e tamanho do frasco no crescimento e desenvolvimento de denphal (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 14, n. 3, p. 1-7, 2019.

ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar Sensing and Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 675-709, 2006.

SÁEZ, P.L. *et al.* Effect of photon flux density and exogenous sucrose on the photosynthetic performance during *In Vitro* culture of *Castanea sativa*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, p. 2087-2105, 2016.

SALDANHA, C. W. *et al.* A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal culture of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012.

SALDANHA, C. W. *et al.* A CO₂-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 49, n. 4, p.433-444, 2013.

SILVA, S. T. *et al.* Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 3, p. 501-510, 2017.

SOUZA, D. M. S. C. *et al.* Mixotrophism effect on *in vitro* elongation and adventitious rooting of *Eucalyptus dunnii*. **Cerne**, Lavras, v. 25, n. 4, p.394-401, 2019.

SOUZA, L. M. *et al.* Influência da sacarose no crescimento e no perfil de pigmentos fotossintéticos em duas espécies arbóreas cultivadas *in vitro*. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 1916-1926, jan. 2020a.

SOUZA, D. M. S. C. *et al.* Photomixotrophism on *in vitro* elongation of *Corymbia* hybrid clones. **Scientia Forestalis**, v. 48, n. 128, p. 1-11, 2020b.

TISARUM, R. *et al.* *In vitro* photoautotrophic acclimatization, direct transplantation and *ex vitro* adaptation of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 133, n. 2, p. 215-223, 2018.

TORMEN, G. C. R. *et al.* Carbohydrate sources, alanine and calcium for *in vitro* multiplication of *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, v. 73, n. 3, p. 329-335, dez., 2018.

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

WELANDER, M.; PAWLICKI, N. Carbon compounds and their influence on *in vitro* growth and organogenesis. In *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture* (P.J. Lumsden, J.R. Nicholas & W.J. Davies, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 83-89, 1994.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

**ARTIGO 4 – QUALIDADE DE LUZ E CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE NA
MULTIPLICAÇÃO E NO ALONGAMENTO *IN VITRO* DE *Eucalyptus pilularis*
Smith**

**Artigo formatado conforme a NBR 6022 (ABNT 2018) e adaptado as exigências do Manual de
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da UFLA.**

RESUMO

A qualidade luminosa e a concentração da fonte de carbono podem influenciar as respostas morfofisiológicas dos explantes na micropropagação de espécies do gênero *Eucalyptus*. A adequação do ambiente de cultivo *in vitro* pode trazer melhorias na clonagem de espécies de interesse econômico e com idade ontogenética avançada a fim de promover a propagação massal em larga escala. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de quatro fontes de qualidade de luz (lâmpada fluorescente, LEDs vermelho/azul 1:1, LEDs azul e LEDs vermelho) e de três concentrações de glicose (10, 20 e 30 g L⁻¹) na multiplicação e no alongamento *in vitro* de *Eucalyptus pilularis* Smith. Na multiplicação *in vitro*, aos 150 dias, o uso da lâmpada fluorescente resultou nas maiores médias de sobrevivência e nas menores de oxidação, assim como a utilização da concentração de 30 g L⁻¹ de glicose. O uso das LEDs vermelho/azul 1:1 resultou nas maiores médias para número de brotos por explante, embora não tenham diferido estatisticamente da lâmpada fluorescente, e para vigor na concentração de 30 g L⁻¹ de glicose. Os resultados para os LEDs vermelho foram inferiores para todas as características avaliadas. No alongamento *in vitro*, a lâmpada fluorescente e LEDs vermelho/azul resultaram nas maiores médias nas características avaliadas, assim como a concentração de 30 g L⁻¹ de glicose.

Palavras-chave: Propagação *in vitro*. Qualidade espectral. Fonte de carbono. Clonagem.

ABSTRACT

Light quality and carbon source concentration can influence the morphophysiological responses of explants in the micropropagation of species of the *Eucalyptus*. The adequacy of the in vitro culture environment can bring improvements in the cloning of species of economic interest and with advanced ontogenetic age in order to promote mass propagation on a large scale. The aim of the present study was to evaluate the influence of four sources of light quality (fluorescent lamp, 1:1 red/blue LEDs, blue LEDs and red LEDs) and three glucose concentrations (10, 20 and 30 g L⁻¹) in the in vitro multiplication and elongation of *Eucalyptus pilularis* Smith. In the in vitro multiplication, at 150 days, the use of a fluorescent lamp resulted in the highest survival and lowest oxidation means, as well as the use of a concentration of 30 g L⁻¹ of glucose. The use of 1:1 red/blue LEDs resulted in the highest means for number of shoots per explant, although they did not differ statistically from the fluorescent lamp, and for vigor at the concentration of 30 g L⁻¹ of glucose. The red LEDs promoted the lowest averages in all evaluated characteristics. In the *in vitro* elongation, the fluorescent lamp and red/blue LEDs resulted in the highest means in the evaluated characteristics, as well as the concentration of 30 g L⁻¹ of glucose.

Keywords: *In vitro* propagation. Spectral quality. Carbon source. Cloning.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as áreas de florestas plantadas de eucalipto crescem a cada ano e são responsáveis pela maior parte da produção de madeira para fins industriais (CARRILLO *et al.*, 2018). A contribuição delas no setor florestal brasileiro que, por sua vez, apresenta expressiva representatividade na economia, é significativa, justificando a busca pela otimização do cultivo, por meio de pesquisas em melhoramento genético e silvicultura clonal, as quais vêm proporcionando ganhos em produtividade e qualidade da madeira de florestas plantadas (MYBURG *et al.*, 2014).

Dentre as espécies de *Eucalyptus*, *Eucalyptus pilularis* Smith é uma espécie pouco estudada, porém com grande potencial para serraria e laminação, principalmente no Sudeste do Brasil (GOMES *et al.*, 1981; MENDES *et al.*, 1983). Por esse motivo, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas, até então escassas, que visem a micropropagação de árvores adultas da espécie com avançada idade ontogenética.

O crescimento e o desenvolvimento *in vitro* de diferentes espécies nas fases da micropropagação são afetados por diversos fatores. Dentre estes fatores, pode-se destacar o tipo e as concentrações de fonte de carbono (TORMEN *et al.*, 2018) e a qualidade de luz, com lâmpadas LEDs (SOUZA *et al.*, 2018, 2020a, 2020b; STEFANEL *et al.*, 2020), visando otimizar o ambiente de cultivo para a propagação *in vitro* de árvores adultas com avançada idade ontogenética, a produção de fotoassimilados, e também como estímulo percebido por fotorreceptores que desencadeiam a fotomorfogênese em plantas (BELLO-BELLO; ESTRADA; VELÁZQUEZ, 2016; GUPTA; KARMAKAR, 2017).

Como o cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos não é totalmente autotrófico, é necessária a presença de carboidratos em meios de cultura para manter o potencial osmótico, servir como fonte de energia e carbono para o crescimento das células (GAUCHAN, 2012) e para o desenvolvimento de processos, como a proliferação de brotos, a indução e emissão de raízes, a embriogênese e a organogênese (YASEEN *et al.*, 2013). Além disso, os tecidos mostram melhor desenvolvimento e proliferação após a adição de uma fonte adequada de carbono no meio de cultivo (MAZINGA *et al.*, 2014). A glicose, por exemplo, é um açúcar redutor, que pode ser prontamente absorvido pelos explantes, fornecendo uma melhor fonte de carbono por difusão através das superfícies do tecidos excisados e metabolizado pelo cultivo *in vitro* (WELANDER; PAWLICKI, 1994).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da qualidade de luz e da concentração de glicose na multiplicação e no alongamento *in vitro* de segmentos nodais

provenientes de brotações epicórmicas de árvores adultas de *Eucalyptus pilularis* Smith aos 44 anos de idade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização do estudo e material experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultivo *In Vitro* de Espécies Florestais, pertencentes ao Departamento de Ciências Florestais (DCF) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizada no município de Lavras, Minas Gerais (21°14'S de latitude; 44°59'W de longitude e 919 m de altitude).

O material experimental utilizado foi proveniente de segmentos nodais previamente estabelecidos *in vitro*, confeccionados a partir de brotações epicórmicas de galhos podados de uma matriz com 44 anos de idade de *Eucalyptus pilularis*, localizada em um teste de procedências de *Eucalyptus* e *Corymbia*, instalado em 1974 no Viveiro Florestal da UFLA (IPEF, 1984).

2.2 Qualidade de luz

As fases da micropropagação foram avaliadas em quatro qualidades espectrais: lâmpada fluorescente – F (40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ - HO Sylvania T12, 20 W, São Paulo, Brasil), LEDs vermelho - V, LEDs azul - A e LEDs vermelho/azul 1:1 – V:A (40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ - LabPARLLHR/ DB-480, 20 W, LabLumens®, Carapicuíba, SP, Brasil).

2.3 Multiplicação *in vitro*

Brotações padronizadas com 0,5 cm de comprimento, obtidas a partir de segmentos nodais previamente estabelecidos *in vitro*, foram transferidas para tubos de ensaio de vidro (25 mm \times 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,05 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), 6 g L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações de glicose.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 4 \times 3, sendo testadas quatro qualidades espectrais (lâmpada fluorescente - F, LEDs vermelho/azul 1:1 – V:A, LEDs azul - A e LEDs vermelho - V) e três concentrações de glicose (10, 20 e 30 g L⁻¹), com dez repetições, compostas por um explante cada.

Foram realizados 5 subcultivos, a cada 30 dias, nos quais foram avaliados o percentual de sobrevivência, a oxidação e o vigor, mediante escala de notas proposta por Oliveira et al. (2016), o número e o comprimento de brotações por explante

2.4 Alongamento *in vitro*

Brotações padronizadas com 0,5 cm de comprimento, provenientes da fase de multiplicação *in vitro*, foram transferidas para tubos de ensaio de vidro (25 mm × 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), 0,10 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,10 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) e 6 g L⁻¹ de ágar e diferentes concentrações de glicose.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 3 × 2, sendo testadas quatro qualidades espectrais (lâmpada fluorescente, LEDs vermelho/azul (1:1), LEDs azul) e duas concentrações de glicose (20 e 30 g L⁻¹), com dez repetições, compostas por um explante cada.

Foram realizados 3 subcultivos, a cada 30 dias, nos quais foram avaliados a oxidação e o vigor, mediante escala de notas proposta por Oliveira *et al.* (2016), o número e o comprimento de brotações por explante e o percentual de hiperidricidade.

2.5 Análise de dados

As análises foram processadas no software R, versão 3.0.3 (R CORE TEAM, 2018), com auxílio do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013). As médias dos tratamentos foram utilizadas para a realização das análises estatísticas. As variáveis que não apresentaram distribuição normal perante o teste de Shapiro-Wilk a 5% de significância foram transformadas em arcsen. Para as variáveis significativas foi realizado o teste Tukey a 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Multiplicação *in vitro*

Diferenças significativas foram observadas nas respostas morfofisiológicas mediante às diferentes qualidades espectrais e concentrações de glicose utilizadas na multiplicação *in vitro* de *E. pilularis* aos 150 dias de cultivo para percentual de sobrevivência, oxidação e número de brotos por explante. Houve interação significativa entre os fatores para vigor e comprimento de brotos por explante (FIGURAS 1 e 2).

A utilização da lâmpada fluorescente resultou no maior percentual de sobrevivência dos explantes (53,3%) (FIGURA 1A) e na menor média para oxidação fenólica (2,2) (FIGURA 1C), diferindo-se estatisticamente somente das LEDs azul e LEDs vermelha nesta característica. A concentração de 30 g L⁻¹ de glicose resultou no maior percentual de sobrevivência (67,5%)

(FIGURA 1B) e na menor média para oxidação (2,1) (FIGURA 1D), diferindo-se estatisticamente das demais concentrações.

As lâmpadas fluorescentes são versáteis, pois fornecem um amplo espectro de luz (350 a 750 nm), sendo aplicável para inúmeras espécies (MILER *et al.*, 2019). Na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pilularis* em biorreator de imersão temporária, a utilização de lâmpada fluorescente resultou nas maiores médias para vigor, número e comprimento de brotos por explante (SOUZA *et al.*, 2022a), demonstrando a importância da ampla variação de comprimentos de onda na multiplicação da espécie.

Em relação ao número de brotos por explante, as LEDs azul e azul/vermelha (1:1) proporcionaram os melhores resultados para essa característica, 6,9 e 6,6 brotos emitidos por explante, respectivamente, diferindo-se somente da LED vermelha (FIGURA 1F). Estudos recentes demonstram resultados satisfatórios obtidos por meio do uso de LEDs vermelho/azul, na multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia* (SOUZA *et al.*, 2020b), e na emissão de maior número de brotos em *Eugenia involucrata* (STEFANEL *et al.*, 2020).

Apesar do uso da LED azul ter proporcionado um dos melhores resultados para número de brotos, os brotos sob esta fonte de luz apresentavam uma coloração verde clara, com aspecto de hiperidricidade, e pequena expansão foliar (FIGURA 3D). A região azul do espectro de luz (450 a 500 nm) pode inibir o crescimento e a produtividade (ABIRI *et al.*, 2020), portanto, a exposição à luz azul pode resultar em diferentes respostas no crescimento das plantas, como má expansão foliar, conforme reportado por Tian *et al.* (2019) em *Camellia sinensis* cv. Huangjinya, corroborando com os resultados encontrados para *E. pilularis*. Quanto à concentração de glicose, a utilização de 30 g L⁻¹ resultou no maior número de brotos por explante (6,6 brotos), apresentando diferenças significativas em relação à concentração de 10 g L⁻¹ (FIGURA 1G).

A condução dos sinais realizada pelos fotorreceptores das plantas não é independente, e a relação entre eles pode estar vinculada à condição de luminosidade a que são submetidas e às atividades fisiológicas do vegetal (CHEN *et al.*, 2019). As LEDs vermelho/azul emitem energia no espectro visível nas regiões do espectro em que a planta é fotossinteticamente ativa (BATISTA *et al.*, 2018), o que pode permitir um melhor desenvolvimento da planta.

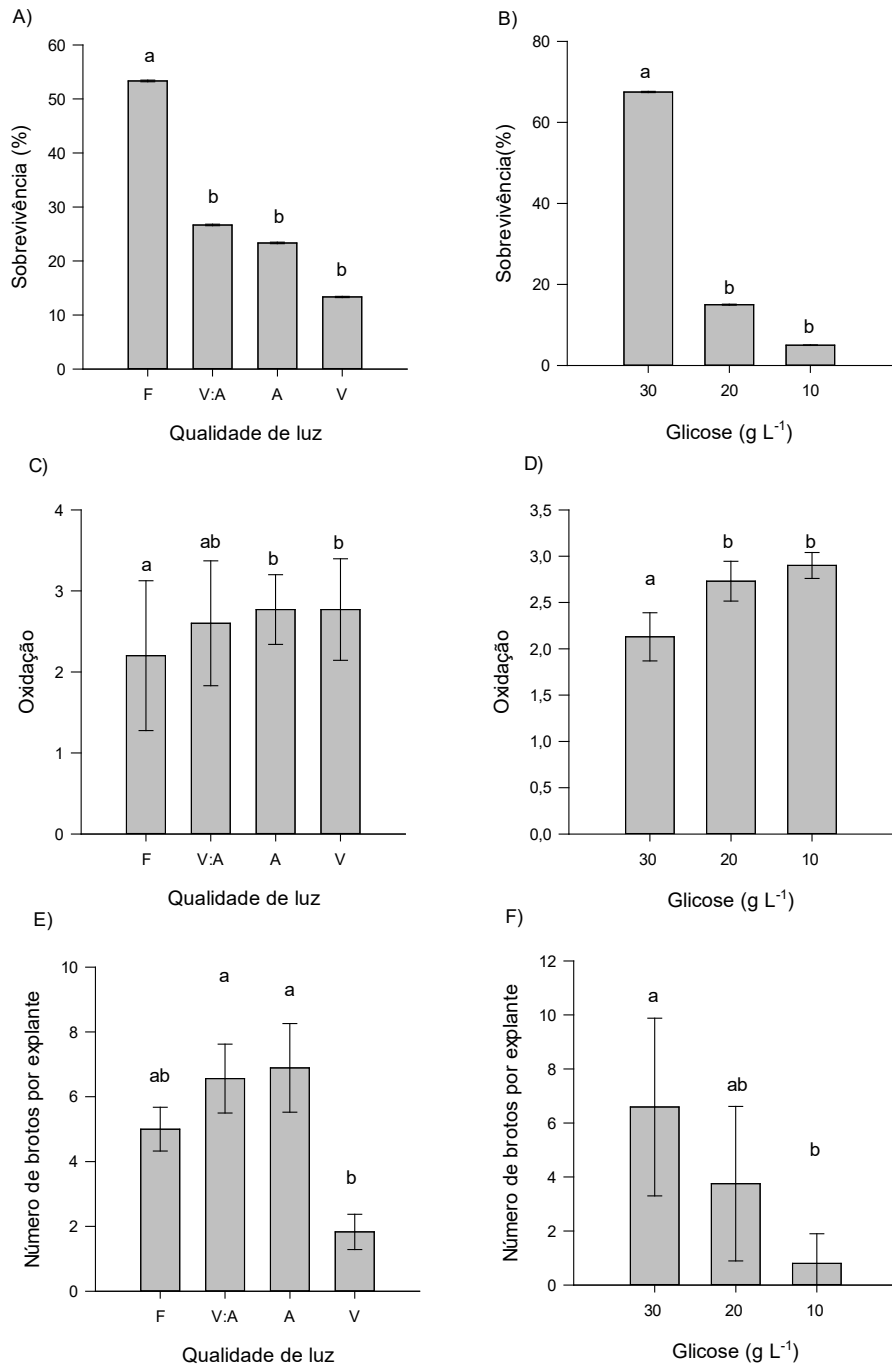
Dados descritos na literatura corroboram com os resultados encontrados no presente estudo para número de brotos por explante sob LEDs vermelho/azul em clones de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* (SOUZA *et al.*, 2020a), para percentual de oxidação, número e comprimento de brotos por explante em clones híbridos de *Corymbia* (SOUZA *et al.*, 2018, 2020b).

Para as LEDs azul e vermelho/azul (1:1), a suplementação de 30 g L⁻¹ de glicose no meio de cultura resultou nas maiores médias para vigor (1,7), diferindo-se das demais. Para a lâmpada fluorescente, as maiores médias para vigor também foram observadas no meio contendo 30 g L⁻¹ de glicose (1,6), embora não tenha diferido estatisticamente da concentração de 20 g L⁻¹. O uso de diferentes concentrações de glicose não resultou em diferenças significativas para vigor diante da LED vermelha (FIGURA 2H).

O efeito das fontes de luz na morfogênese das espécies e clones deve ser avaliado para a otimização do protocolo de micropropagação (MIRANDA *et al.*, 2020). Em *Physalis angulata*, foram encontrados os menores valores para o teor de clorofila total sob LEDs vermelha, o que resultou em menores número de folhas e área foliar (SANTOS *et al.*, 2020), fato que pode ter contribuído para a redução da capacidade fotossintética da planta. Além disso, a utilização de LEDs vermelha resultou em menores números de brotos emitidos no cultivo *in vitro* de *Cattleya crispata* (SOUZA *et al.*, 2021), de *Pyrus communis* (LOFT; MARS; WERBROUCK, 2019) e em menor número e comprimento de brotos de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* (SOUZA *et al.*, 2022) quando comparados com outras fontes de luz. No presente estudo, a utilização de LEDs vermelha resultou nas menores médias para as características avaliadas, possivelmente em decorrência na menor capacidade para realização de fotossíntese e consequente desenvolvimento dos explantes de *E. pilularis* (FIGURA 3C).

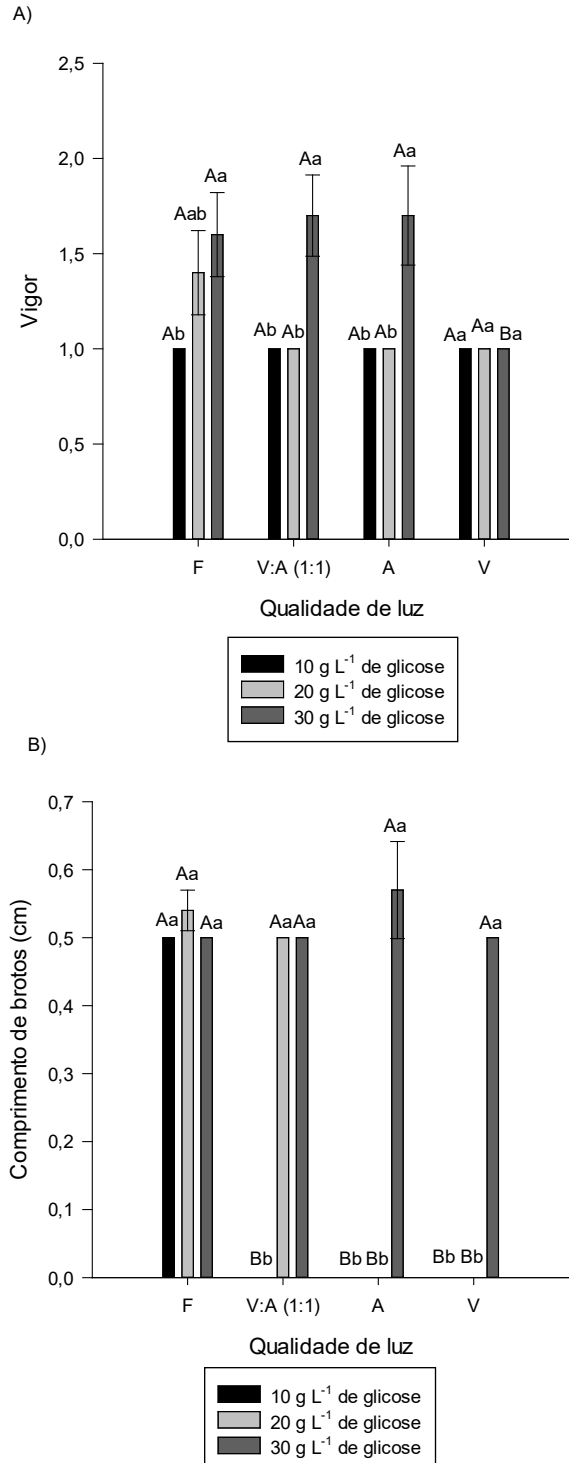
Para as LEDs azul e LEDs vermelha, os maiores comprimentos de brotos foram encontrados em meio de cultura contendo 30 g L⁻¹ de glicose (0,57 cm e 0,50 cm, respectivamente), com diferenças estatísticas em relação às demais concentrações. Para a LED vermelha/azul, as concentrações de 20 e 30 g L⁻¹ de glicose resultaram na maior média para a característica avaliada (0,50 cm), diferindo da concentração de 10 g L⁻¹. Para a lâmpada fluorescente, a utilização de diferentes concentrações de glicose não resultou em diferenças significativas para o comprimento dos brotos (FIGURA 2I). A partir disto, fica evidente a importância e a necessidade de se definir a qualidade espectral e a fonte de carbono no desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro* (PEPE *et al.*, 2021).

Figura 1 - Características avaliadas na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pilularis* em função da qualidade de luz e das concentrações de glicose (20 e 30 g L⁻¹). A) Sobrevivência em função da qualidade de luz; B) Sobrevivência em função das concentrações de glicose; C) Oxidação em função da qualidade de luz; D) Oxidação em função das concentrações de glicose; E) Número de brotos por explante em função da qualidade de luz; F) Número de brotos por explante em função das concentrações de glicose. As letras minúsculas (a, b) acima das barras representam diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. Dados apresentados como média \pm erro padrão.



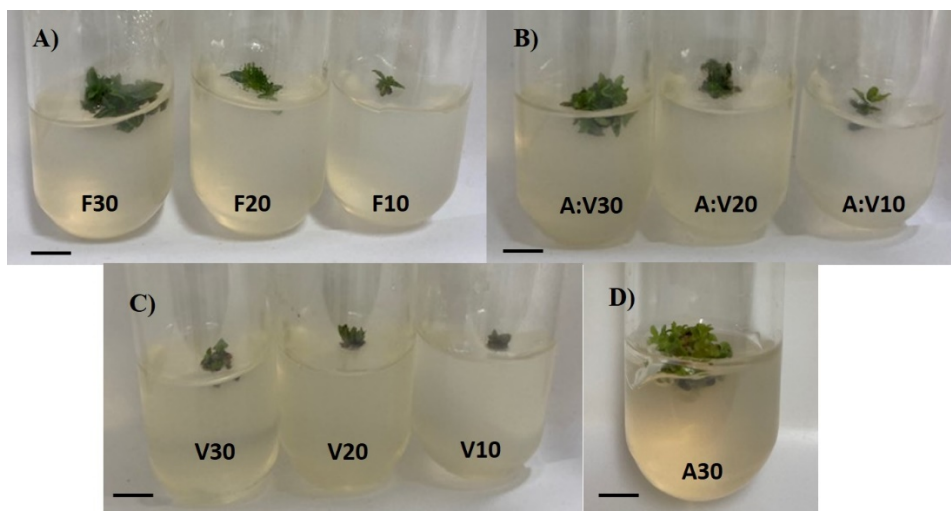
Fonte: Da Autora (2022).

Figura 2 - Características avaliadas na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pilularis* com interação entre qualidade de luz e concentrações de glicose (20 e 30 g L⁻¹). A) Vigor dos explantes; B) Comprimento de brotos (cm). As letras minúsculas (a, b) acima das barras representam diferenças estatísticas das concentrações de glicose dentro do sistema de vedação, e as letras maiúsculas (A, B) representam diferenças estatísticas dos sistemas de vedação dentro da concentração de glicose de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. Dados apresentados como média ± erro padrão.



Fonte: Da Autora (2022).

Figura 3 - Características visuais de *Eucalyptus pilularis* sob diferentes qualidades espectrais e concentrações de glicose. A) Lâmpada fluorescente; B) LEDs vermelho/azul (1:1); C) LEDs vermelho; D) LEDs azul. Em que: F30 = Lâmpada fluorescente e 30 g L⁻¹ de glicose; F20 = Lâmpada fluorescente e 20 g L⁻¹ de glicose; F10 = Lâmpada fluorescente e 10 g L⁻¹ de glicose; A:V30 = LEDs vermelho/azul (1:1) e 30 g L⁻¹ de glicose; A:V20 = LEDs vermelho/azul (1:1) e 20 g L⁻¹ de glicose; A:V10 = LEDs vermelho/azul (1:1) e 10 g L⁻¹ de glicose; V30 = LEDs vermelho e 30 g L⁻¹ de glicose; V20 = LEDs vermelho e 20 g L⁻¹ de glicose; V10 = LEDs vermelho e 10 g L⁻¹ de glicose; A30 = LEDs azul e 30 g L⁻¹ de glicose. Barra = 1cm.



Fonte: Da Autora (2022).

3.2 Alongamento *in vitro*

Foram observadas diferenças significativas nas respostas morfofisiológicas mediante às diferentes qualidades espectrais e concentrações de glicose utilizadas no alongamento *in vitro* de *E. pilularis* aos 90 dias de cultivo para oxidação, vigor, número e comprimento de brotos por explante e percentual de hiperidricidade. Não houve interação entre os fatores (FIGURAS 4 e 5).

Para oxidação, a utilização da lâmpada fluorescente resultou nas menores médias para a característica (1,26), diferindo estatisticamente somente da LED azul (2,06) (FIGURA 4A). O uso de lâmpada fluorescente e de LED azul/vermelho resultou nas maiores médias para vigor (1,89 e 1,76, respectivamente) (FIGURA 4B) e para número de brotos emitidos por explante (6,68 e 5,59 brotos, respectivamente) (FIGURA 4D), não diferindo estatisticamente entre si.

A qualidade espectral atua como um sinal morfogênico que influencia o crescimento da parte aérea das plantas *in vitro* e as concentrações de reguladores de crescimento, estando as citocininas envolvidas nas etapas iniciais da via de sinalização luminosa (ROMAN *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2019). A condução do sinal realizada pelos fotorreceptores não é independente, e a

relação entre eles pode estar relacionada à condição de luz e às atividades fisiológicas da planta (CHEN *et al.*, 2019).

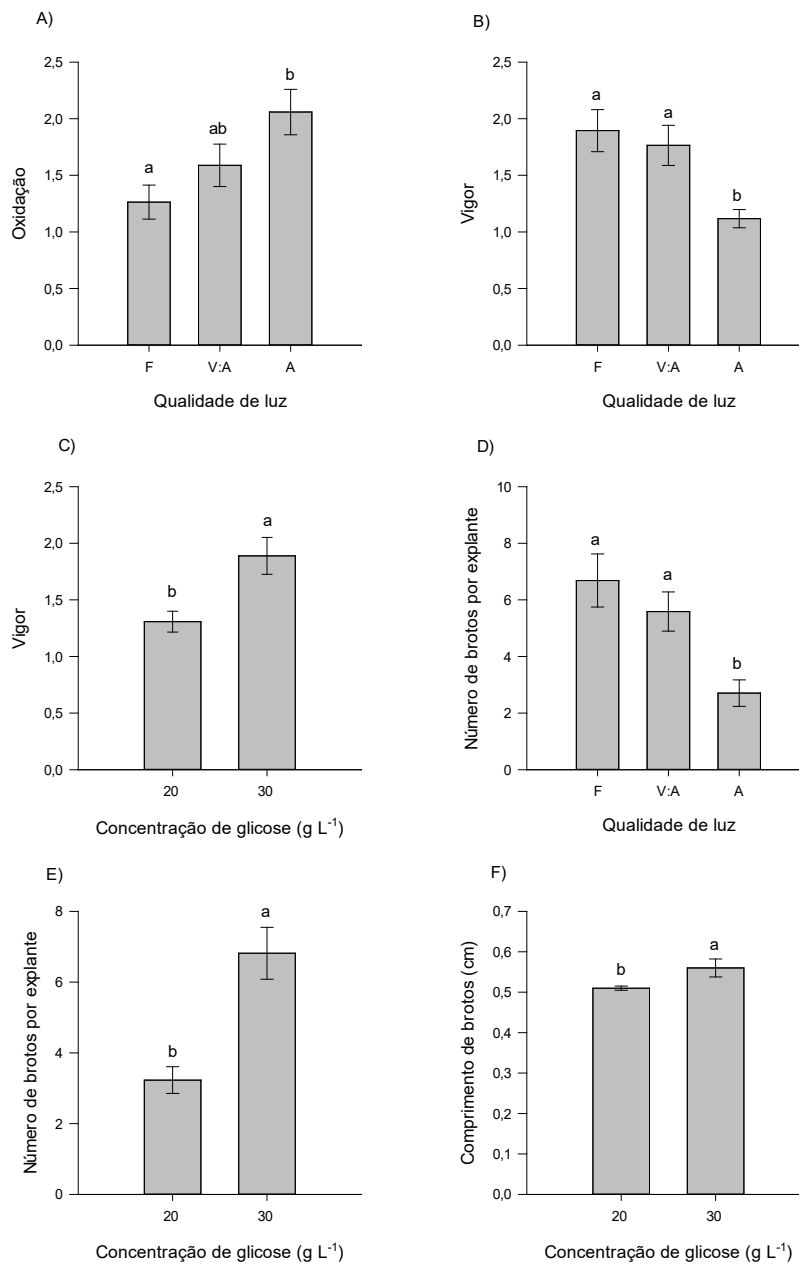
Lâmpadas fluorescentes e LEDs vermelho/azul foram consideradas mais adequadas para o uso no alongamento *in vitro* de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*, sem prejudicar o desenvolvimento de brotações para a produção de plantas clonais micropropagadas (SOUZA *et al.*, 2020a), resultado semelhante ao encontrado no presente estudo. Além disso, a lâmpada fluorescente promoveu o maior percentual de emissão de raízes adventícias em miniestacas de *E. pilularis* (75%) (SOUZA *et al.*, 2022b).

No alongamento *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia*, o uso de LEDs vermelho/azul resultou nas melhores respostas para vigor, número e comprimento de brotos por explante (SOUZA *et al.*, 2020c), demonstrando a eficiência desta fonte de luz e corroborando com os resultados encontrados para *E. pilularis*. De acordo com Batista *et al.* (2018), as LEDs vermelho/azul emitem energia, no espectro visível, em regiões de interesse para fotossíntese, o que pode favorecer o crescimento e o desenvolvimento no cultivo *in vitro*.

A suplementação do meio de cultura com 30 g L⁻¹ de glicose proporcionou maiores médias para vigor (1,89) (FIGURA 4C), número (6,81 brotos) (FIGURA 4E) e comprimento de brotos por explante (0,56 cm) (FIGURA 4F), diferindo da concentração de 20 g L⁻¹. O tipo e as concentrações de fonte de carbono podem influenciar a indução e o desenvolvimento de brotos *in vitro* em espécies lenhosas (MEMON *et al.*, 2019). Efeitos positivos da glicose como fonte de carbono foram observados em *Eucalyptus cloeziana* para comprimento de brotos por explante e na redução da oxidação fenólica dos tecidos na concentração de 15 g L⁻¹ (TORMEN *et al.*, 2018). Em *Moringa oleifera*, a utilização de 20 g L⁻¹ de glicose no meio de cultura resultou nos maiores valores para comprimento da parte aérea das plântulas (OKAFOR *et al.*, 2020), corroborando com o resultados observados em *E. pilularis*.

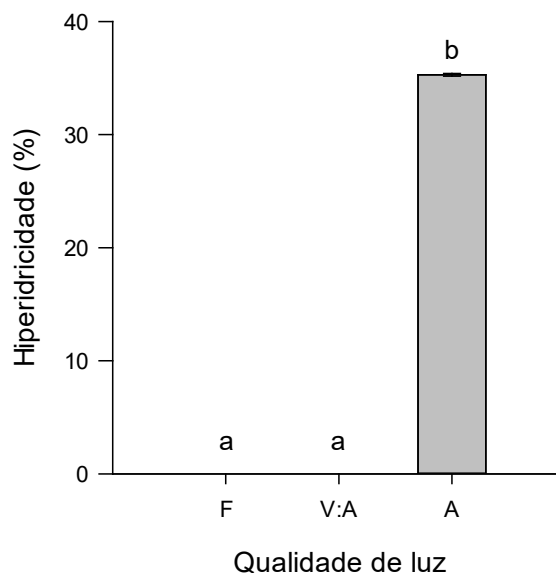
Em relação à hiperidricidade, somente os explantes sob LED azul apresentaram características morfológicas que indicam este distúrbio (35,3%), como coloração verde clara, pequena expansão foliar, enquanto os explantes sob as demais fontes de luz não apresentaram tal característica (FIGURA 5). Em *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*, a qualidade espectral azul foi uma das mais adequadas para o cultivo *in vitro* do híbrido, uma vez que foi observado menor hiperidricidade sob essa fonte de luz (SOUZA *et al.*, 2020d), ao contrário do que foi encontrado para *E. pilularis*, demonstrando que o efeito da fonte de luz na morfogênese de espécies é variável e necessita ser avaliado (MIRANDA *et al.*, 2020).

Figura 4 - Características avaliadas no alongamento *in vitro* de *Eucalyptus pilularis* em função da qualidade de luz e das concentrações de glicose (20 e 30 g L⁻¹). A) Oxidação em função da qualidade de luz; B) Vigor em função da qualidade de luz; C) Vigor em função das concentrações de glicose; D) Número de brotos por explante em função da qualidade de luz; E) Número de brotos por explante em função das concentrações de glicose; F) Comprimento de brotos por explante em função das concentrações de glicose. As letras minúsculas (a, b) acima das barras representam diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. Dados apresentados como média ± erro padrão.



Fonte: Da Autora (2022).

Figura 5 - Percentual de hiperidricidade no alongamento *in vitro* de *Eucalyptus pilularis* em função da qualidade de luz. As letras minúsculas (a, b) acima das barras representam diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância. Dados apresentados como média \pm erro padrão.



Fonte: Da Autora (2022).

Análises de anatomia foliar, de densidade estomática e do conteúdo de pigmentos fotossintéticos seriam realizadas para avaliar as respostas dos tecidos *in vitro* às fontes de luz utilizadas, entretando o material vegetal se mostrou estagnado, não respondendo aos estímulos de reguladores, sem aumento do número e comprimento de brotações e, muitas vezes, senescendo. Uma possível explicação para este fato seria a habituação celular, um dos entraves encontrados na micropropagação de plantas (ABDALLA *et al.*, 2022), na qual células habituadas perdem a capacidade de responder à manipulação externa de reguladores de crescimento (DJANDE *et al.*, 2019).

A habituação celular foi definida como uma perda estável e hereditária ao requerimento dos fatores de crescimento pelas células de plantas cultivadas, em que a habituação às auxinas e citocininas resulta em modificações reversíveis na hereditariedade celular, conhecida como mudanças epigenéticas (MEINS, 1989). Esse fenômeno pode ser desencadeado por alterações na metilação do DNA durante a regeneração da planta *in vitro* (BEDNAREK; ORLOWSKA, 2020).

O alongamento e o enraizamento *in vitro* de brotos induzidos em meio de cultura contendo reguladores de crescimento podem ser afetados pela habituação (MANGENA, 2020).

A habituação causada por prolongados períodos de contínuos subcultivos é a maior limitação aos sistemas de produção comercial, resultando em um progressivo declínio de vigor (AKIN-IDOWU; IBITOYE; ADEMOYEGUN, 2009). No cultivo *in vitro* de *Bactris gasipaes* por um longo período de tempo, 8 anos, o monitoramento de vias morfogênicas para indução direta de gemas adventícias revelou um forte potencial de redução morfogênica em células pré-procambiais, células de parênquima na base do caule e em células externas das bainhas das folhas, comprometendo a reprogramação celular para o estado indiferenciado e, conseqüentemente, a aquisição de competência celular (GRANER *et al.*, 2018).

Entretanto, há a necessidade de se desenvolver mais estudos a respeito do tema a fim de minimizar os efeitos negativos desses entraves e otimizar a propagação *in vitro* de *Eucalyptus pilularis*.

4 CONCLUSÃO

A utilização de lâmpada fluorescente e LED V:A (1:1) combinadas com a suplementação de 30 g L⁻¹ de glicose no meio de cultura resultou nas maiores médias das características avaliadas nas fases de multiplicação e no alongamento *in vitro* de *Eucalyptus pilularis*. As duas fontes de luminosidade e concentração de glicose resultaram em menor oxidação fenólica dos tecidos, maior vigor e maior número de brotos por explante, com ausência de hiperidricidade.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, N. *et al.* An academic and technical overview on plant micropropagation challenges. **Horticulturae**, v. 8, n. 677, p. 1-28, 2022.
- ABIRI, R. *et al.* The prospect of physiological events associated with the micropropagation of *Eucalyptus* sp. **Forests**, v. 11, n. 11, p.1-29, 2020.
- AKIN-IDOWU, P. E.; IBITOYE, D. O.; ADEMOYEGUN, O. T. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 16, p. 3782-3788, 2009.
- BATISTA, D. S. *et al.* Light quality in plant tissue culture: Does it matter? **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 54, n. 3, p. 195–215, 2018.
- BELLO-BELLO, B.B.; ESTRADA, E.M.; VELÁZQUEZ, J.H.C.; Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). **African Journal**, v.15, p.272 – 277, 2016.
- BEDNAREK, P. T.; ORLOWSKA, R. Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 140, p. 245-257, 2020.
- CARILLO, I. *et al.* Comparative study of cellulosic components isolated from different *Eucalyptus* species. **Cellulose**, v.25, p.1011 – 1029, 2018.
- CHEN, X. *et al.* Sugar accumulation and growth of lettuce exposed to different lighting modes of red and blue LED light. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 6926, 2019.
- DJANDE, C. Y. H. *et al.* Habituated *Moringia oleifera* callus retains metabolic responsiveness to external plant growth regulators. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, p. 246-264, 2019.
- FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. **ExpDes**: Experimental Designs package. R packageversion 1.1.2. 2013.
- GAUCHAN, D. Effect of different sugars on shoot regeneration of maize (*Zea mays* L.). Kathmandu University Journal of Science, **Engineering and Technology**, v. 8, n. 1, p. 119-124, 2012.
- GRANER, E. M. *et al.* Decreasead morphogenetic potential in peach palm stem-like cells in long-term *in vitro* conditions. **Journal of Forestry Research**, v. 31, p. 485-495, 2018.
- GOMES, J. M. *et al.* Variação do crescimento de espécies e procedências de eucalipto cultivadas na região de Viçosa. Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 5, p. 2, p. 233-49, 1981.
- GUPTA, S.D.; KARMAKAR, D. Machine vision based evaluation of impact of light emitting diodes (LEDs) on shoot regeneration and the effect of spectral quality on phenolic content and antioxidant capacity in *Swertia chirata*. **Journal of Photochemistry e Photobiology**, v.174, p.162–172, 2017.
- INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS (IPEF). **Procedências de Eucalyptus spp. introduzidas no Brasil por diferentes entidades**. Piracicaba, v. 10, n. 29,

259 p., 1984. Disponível em: <
http://www.ipef.br/publicacoes/boletim_informativo/bolinf29.pdf>. Acesso em: 03 de maio de 2019.

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

LOFT, M.; MARS, M.; WERBROUCK, S. Optimizing pear micropropagation and rooting with light emitting diodes and trans-cinnamic acid. **Plant Growth Regulation**, v. 88, p. 173-180, 2019.

MANGENA, P. Benzyl adenine in plant tissue culture – succinct analysis of the overall influence in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] seed and shoot culture establishment. **Journal of Biotech Research**, v. 11, p. 23-34, 2020.

MAZINGA, K. M. *et al.* Effets du charbon actif dans le milieu de culture sur l'induction de la rhizogénèse chez l'hybride FHIA-01 de bananier (*Musa AAAB*) en culture *in vitro*. **Journal of Applied Biosciences**, v. 73, p. 5991-6001, 2014.

MEMON, A. A. *et al.* Effect of carbon sources and their various concentrations for optimize in *in vitro* micropropagation of Banana *Musa* (spp.) Basrai. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 1108-1114, 2019.

MENDES, J. M. *et al.* Comportamento de 29 espécies de *Eucalyptus* lat two sites in Minas Gerais). **Silvicultura**, v. 8, n. 31, p. 467-471, 1983.

MEINS, F. J. Habituation: heritable variation in the requirement of cultured plant celles for hormones. **Annual Review of Genetics**, v. 23, p. 395-408, 1989.

MILER, N. *et al.* Application of wide-spectrum light-emitting diodes in micropropagation of popular ornamental plant species: a study on plant quality and cost reduction. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 55, p. 99-108, 2019.

MIRANDA, N. A. *et al.* Quality and intensity of light in the *in vitro* development of microstumps of *Eucalyptus urophylla* in a photoautotrophic system. **Forest Science**, v. 66, n. 6, p. 754-760, 2020.

MYBURG, A. A. *et al.* The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v.510, p. 356 – 362, 2014.

OLIVEIRA, L. S. *et al.* Multiplicação e alongamento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, p. 235-247, 2016.

OKAFOR, U. C. *et al.* Comparison of sucrose and glucose as carbon source for *in vitro* growth of *Moringa oleifera* Lam. embryos. **Nigerian Agricultural Journal**, v. 51, n. 3, p. 16-20, 2020.

PEPE, M. *et al.* Comparative analysis of machine learning and evolutionary optimization algorithms for precision tissue culture of *Cannabis sativa*: Prediction and validation of *in vitro* shoot growth and development based on the optimization of light and carbohydrates sources. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 1-27, 2021.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **An introduction to R. Notes on R: a programming**

environment for data analysis and graphics. Version 2.15.1. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-12-7, 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 12 mai. 2021.

ROMAN, H. *et al.* Cytokinins are initial targets of light in the control of bud outgrowth. **Plant Physiology**, v. 172, n. 1, p. 489–509, 2016.

SANTOS, G. C. *et al.* Effect of light and sucrose on photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation of *Physalis angulata*. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 4, p. 1353-1367, 2020.

SOUZA, D. M. S. C. *et al.* Light quality in the *in vitro* introduction of *Corymbia* hybrid clones. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 42, n. 6, p. 1-9, 2018.

SOUZA, D. M. S. C. *et al.* Light quality in micropropagation of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Forestalis**, v. 48, n. 127, p. 1-13, 2020a.

SOUZA, D. M. S. C. *et al.* Light quality, 6-benzyladenine and number of subcultures for *in vitro* multiplication of hybrid clones of *Corymbia*. **Scientia Forestalis**, v. 48, n. 128, p. 1-10, 2020b.

SOUZA, D. M. S. C. *et al.* Photomixotrophism on *in vitro* elongation of *Corymbia* hybrid clones. **Scientia Forestalis**, v. 48, n. 128, p. 1-11, 2020c.

SOUZA, D. M. S. C. *et al.* Spectral quality and temporary immersion bioreactor for *in vitro* multiplication of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **3 Biotech**, v. 10, n. 10, p. 1-11, 2020d.

SOUZA, D. M. S. C. *et al.* The influence of light quality in the *in vitro* cultivation of *Cattleya crispata* (Thunb.) Van den Berg. **Nativa**, v. 9, n. 5, p. 582-588, 2021.

SOUZA, D. M. S. C. *et al.* *In vitro* multiplication of *Eucalyptus pilularis* and *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* (Urograndis eucalypt): Effect of light quality in temporary immersion bioreactor. **Mindanao Journal of Science and Technology**, v. 20, n. 1, p. 72-86, 2022a.

SOUZA, D. M. S. C. *et al.* Influence of spectral quality on the rooting of *Corymbia* and *Eucalyptus* spp. minicuttings. **Annals of Forest Research**, v. 65, n. 1, p. 141-154, 2022.

STEFANEL, C. M. *et al.* Diodos emissores de luz (LEDs) usados no cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 40, p.1-5, 2020.

TIAN, Y. *et al.* Response of leaf color and the expression of photoreceptor genes of *Camellia sinensis* cv. Huangjinya to different light quality conditions. **Scientia Horticultural**, v. 251, p. 225–232, 2019.

TORMEN, G. C. R. *et al.* Carbohydrate sources, alanine and calcium for *in vitro* multiplication of *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, v. 73, n. 3, p. 329-335, dez., 2018.

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

YU, Y. *et al.* Red light promotes cotton embryogenic callus formation by influencing endogenous hormones, polyamines and antioxidative enzyme activities. **Plant Growth Regulation**, v. 87, n. 2, p. 187–199, 2019.

WELANDER, M.; PAWLICKI, N. **Carbon compounds and their influence on *in vitro* growth and organogenesis**. In *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture* (P.J. Lumsden, J.R. Nicholas & W.J. Davies, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 83-89, 1994.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Eucalyptus pilularis é considerada uma das espécies com maior potencial para a serraria e laminação na região sudeste do Brasil, principalmente em Minas Gerais e São Paulo. No município de Lavras, Minas Gerais, matrizes da espécie, localizadas em teste de espécies e procedências, implantado em 1974, demonstraram adequado desempenho fenotípico quanto à adaptação, crescimento em altura e em diâmetro à altura do peito.

A utilização da técnica de indução de brotos epicórmicos em galhos podados provenientes de árvores adultas de *E. pilularis* aos 44 anos de idade, selecionadas em teste de espécies e procedências, foi eficiente na obtenção de propágulos visando a clonagem. A organogênese direta, via proliferação de gemas axilares, mostrou-se uma alternativa eficiente para o rejuvenescimento/revigoração de tecidos com idade ontogenética avançada, sendo possível a indução da competência ao enraizamento.

Quanto ao balanço de reguladores de crescimento, a utilização de 0,10 mg L⁻¹ de BAP combinada com 1,0 mg L⁻¹ de ANA resultou nas menores médias para oxidação e nas maiores para o vigor, o número e o comprimento de brotos por explante no alongamento *in vitro*.

Quanto à fonte de carbono e suas respectivas concentrações, a utilização de 20 g L⁻¹ de glicose promoveu as melhores respostas morfofisiológicas dos explantes na multiplicação e no alongamento *in vitro*, tanto em tubos de ensaio quanto em frascos contendo sistema de vedação com uma membrana (1M). No enraizamento *in vitro*, a suplementação do meio de cultura com 10 ou 20 g L⁻¹ de glicose, juntamente a um sistema de vedação com tampas contendo 1M, favoreceu a emissão de raízes adventícias.

Quanto à qualidade de luz e concentrações de glicose, a utilização de lâmpada fluorescente e de LED vermelho/azul (1:1) e a suplementação de 30 g L⁻¹ de glicose no meio de cultura resultou nas maiores médias nas características avaliadas na multiplicação e no alongamento *in vitro* de *Eucalyptus pilularis*.

Todavia, apesar dos resultados obtidos, ainda é necessário desenvolver estudos referentes à espécie e às técnicas utilizadas, bem como, quanto ao rejuvenescimento e revigoração de tecidos. Pesquisas voltadas à otimização do processo de clonagem devem ser estimuladas, desde a coleta de brotos até a fase de aclimatização. Nesse contexto, experimentos posteriores podem ser realizados quanto às condições edafoclimáticas antes da poda dos galhos de árvores selecionadas e como podem influenciar na emissão de brotos epicórmicos, às fontes

de carbono no estabelecimento *in vitro*, às concentrações de reguladores de crescimento em todas as fases da micropropagação e como podem afetar as divisões celulares na planta e desencadear habituação celular, a outras qualidades de luz e se os diferentes comprimentos de onda interferem na hiperidricidade, aos métodos de pré-aclimatização de brotações alongadas, a outros sistemas de vedação e como influenciam a área foliar, a densidade de estômatos e as anatomias foliar e radicular.