



**JÚLIO CÉZAR TANNURE FARIA**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Eucalyptus microcorys* E  
METODOLOGIAS PARA A INVESTIGAÇÃO DO  
REJUVENESCIMENTO E REVIGORAMENTO DE TECIDOS**

**LAVRAS – MG  
2020**

**JULIO CEZAR TANNURE FARIA**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Eucalyptus microcorys* E METODOLOGIAS PARA A  
INVESTIGAÇÃO DO REJUVENESCIMENTO E REVIGORAMENTO DE TECIDOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura e Genética Florestal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Gilvano Ebling Brondani  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2020**

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

Faria, Júlio César Tannure.

Propagação *in vitro* de *Eucalyptus microcorys* e metodologias  
para a investigação do rejuvenescimento e revigoramento de tecidos  
/ Júlio César Tannure Faria. - 2020.

103 p. : il.

Orientador(a): Gilvano Ebling Brondani.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Silvicultura e genética florestal. 2. Micropropagação. 3.  
Eucalipto. I. Brondani, Gilvano Ebling. II. Título.

**JULIO CEZAR TANNURE FARIA**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Eucalyptus microcorys* E METODOLOGIAS PARA A INVESTIGAÇÃO DO REJUVENESCIMENTO E REVIGORAMENTO DE TECIDOS**

***IN VITRO* PROPAGATION OF *Eucalyptus microcorys* AND METHODOLOGIES FOR THE INVESTIGATION OF TISSUE REJUVENATION AND REINVIGORATION**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, área de concentração em Silvicultura e Genética Florestal, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovado, em 23 de janeiro de 2020.

Dr. Gilvano Ebling Brondani	UFLA
Dra. Dulcinéia de Carvalho	UFLA
Dr. Alexandre Alves de Carvalho	UFLA
Dra. Elzimar Oliveira Gonçalves	UFES
Dr. Enéas Ricardo Konzen	UFRGS

Prof. Dr. Gilvano Ebling Brondani  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2020**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Engenharia Florestal (DCF), pela oportunidade concedida para realização do doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal.

Minha família por apoiar nos meus estudos, dando suporte do início ao fim no meu mestrado e doutorado. Em especial a minha mãe Denise, minha irmã Izabela, minha avó Maria Izabel.

As pessoas que tive o prazer de conhecer em Lavras: Thiago Estrela, Erick Nieri, Thiago Agostini, Camila Maciente, Daniel Costa, Enéas Konzen, Thayane Carvalho, Isabela Belchior, Talles Lacerda, Luana Santos e em especial ao Daniel Bernardino por todo companheirismo nesses anos. Muito obrigado pela amizade, companheirismo e diversão nesses anos em Lavras.

Ao meu orientador Gilvano Ebling Brondani pela amizade, ensinamento e apoio em todo o processo de criação e conclusão da presente tese. Aos professores e pesquisadores membros da banca avaliadora Dulcinéia de Carvalho, Alexandre Carvalho, Elzimar Gonçalves e Enéas Konzen.

A equipe de trabalho compostas pelos professores: Gilvano Brondani (Orientador), Enéas Konzen, Dulcineia de Carvalho, José Eduardo Pinto, Alfredo Sena Neto, Thiago Magalhaes. Pelos técnicos(as) de laboratório: Evaldo, Ana Luisa, Olivia, Jacqueline. Pelos alunos(as) de graduação e pós-graduação: Ian, Giovanna, Ludmila, Ariadne, Daniel, Rayssa, Jacqueline, Ana, Laura, Andreane, Denise e demais do Laboratório de Cultivo *In vitro* de Espécies Florestais do Departamento de Ciências Florestais. Foi um prazer trabalhar com vocês.

As equipes presentes nos laboratórios que contribuíram para o desenvolvimento dos experimentos: do Laboratório de Cultivo *In vitro* de Espécies Florestais e do Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas, ambos situados no Departamento de Ciências Florestais; do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Medicinais e do Laboratório de Sementes, situados no Departamento de Agricultura; do Laboratório de processamento de materiais e impressão 3D, situado no Departamento de Engenharia; e do Laboratório de Anatomia Vegetal, situado no Departamento de Biologia, todos localizados na Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo. Ao CNPq e a FAPEMIG, pelos suportes com projetos paralelos vinculados com a presente tese.

E todos que contribuíram na realização deste estudo.

Muito obrigado.

"Quem julga saber e esquece de aprender;  
Coitado de quem se interessa pouco"

Um dia após o outro - Tiago Iorc

## RESUMO GERAL

A maioria das espécies lenhosas apresentam mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas durante a transição da fase juvenil para a adulta, principalmente no potencial de clonagem, vigor de crescimento e enraizamento adventício. A partir da premissa que há poucos estudos que abordam a propagação de *Eucalyptus microcorys*, e pela dificuldade do resgate e clonagem de matrizes adultas por meio de técnicas não-destrutivas, a tese foi dividida em três seções, tendo por objetivo geral promover a propagação *in vitro* de *E. microcorys* e investigar o rejuvenescimento e/ou revigoração de tecidos. O primeiro capítulo baseou-se em desenvolver um protocolo via micropropagação utilizando matriz com idade superior a 40 anos. O segundo capítulo foi baseado em desenvolver um protocolo de micropropagação por meio da organogênese indireta, avaliando a interação de fito-reguladores de crescimento em tecidos juvenis. O terceiro capítulo baseou-se em investigar possíveis indicativos do rejuvenescimento e/ou revigoração de tecidos por meio de diferentes técnicas de produção de mudas. Em termos gerais, o protocolo via micropropagação utilizando brotos epicórmicos apresentou aptidão para o cultivo *in vitro* com estabelecimento de 40,55%, e multiplicação de 820 explantes até o 11º subcultivo. Na fase de alongamento os melhores resultados foram observados na suplementação do meio de cultura com 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e com 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA + 1 mg.L<sup>-1</sup> de AIB. Na fase de enraizamento e aclimatização, destacaram-se dois modelos de microtubetes (M2 com volume = 2,6 cm<sup>3</sup>; e M3 com volume = 5,3 cm<sup>3</sup>), formando raízes adventícias normais e de conexão direta com o câmbio vascular. Nas etapas da organogênese indireta, a calogênese apresentou média de 81,38% de formação de calos nos explantes. Na fase de indução de gemas, os explantes do cotilédone apresentaram os maiores valores médios, enquanto na fase de alongamento os explantes do hipocótilo apresentaram os melhores resultados para as características avaliadas. Com relação a fase de enraizamento e aclimatização, destacaram-se três modelos de microtubetes (M4 com volume = 2,6 cm<sup>3</sup>; M6 com volume = 5,3 cm<sup>3</sup>; e M7 com volume = 4,9 cm<sup>3</sup>), formando raízes adventícias normais e de conexão direta com o câmbio vascular. Por meio dos testes moleculares pela técnica de ISSR, foi possível confirmar a clonagem das plantas resultantes do protocolo de micropropagação e detectou-se baixa diversidade genética das plantas do protocolo da organogênese indireta. O protocolo de micropropagação por meio da organogênese indireta foi eficiente, sendo a melhor resposta observada com o explante do hipocótilo em meio de cultura com 1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ, 1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> de ANA ou 3 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. Na investigação de indicativos do rejuvenescimento e/ou revigoração de tecidos, foram utilizados os materiais resultantes das técnicas de produção de mudas via seminal, via enxertia, via micropropagação com brotações epicórmicas e via organogênese indireta. Verificou-se que os indivíduos propagados via enxertia apresentaram resultados diferenciados com as demais técnicas de propagação, mas seu comportamento, possivelmente, não condiz com maior rejuvenescimento e/ou revigoração dos tecidos. Pelo teste de proteínas totais (TCA/Acetona/Fenol) verificou-se duas regiões distintas nas amostras obtidas pela enxertia. A maior atividade enzimática do teste de peroxidase foi observada na amostra via micropropagação por brotos epicórmicos, demonstrando um indicativo do rejuvenescimento de tecidos. Com relação ao pXRF, foram detectadas as melhores respostas para a distinção dos materiais pelos elementos K, Ca, Zn, Fe, Mn, Si. Contudo, novos estudos são recomendados a fim de buscar outros métodos que apresentem similaridades com as respostas ao enraizamento em espécies florestais e assim otimizar o resgate e clonagem de plantas com distintos estágios ontogenéticos.

**Palavras-chave:** Eucalipto. Clonagem. Resgate não-destrutivo. Micropropagação. Organogênese indireta. Enxertia. Proteína total. Peroxidase. pXRF.

## ABSTRACT

Most woody species experience morphological, physiological and biochemical changes during the transition from the juvenile to the adult phase, especially with regard to the potential for cloning, growth vigor and adventitious rooting of propagules. Due to the lack of studies that address the propagation of *Eucalyptus microcorys*, and to the difficulty in rescuing and cloning adult donor plants using non-destructive techniques, this thesis aimed to promote *in vitro* propagation of *E. microcorys*, and to investigate the rejuvenation and/or reinvigoration of tissues. In the first chapter, a protocol via micropropagation using a donor plant aged over 40 years was developed. In the second chapter, a micropropagation protocol through indirect organogenesis was developed to evaluate the interaction of plant growth regulators in juvenile tissues. In the third chapter, possible indications of rejuvenation and/or reinvigoration of tissues propagated by different techniques, were investigated. In overall terms, the protocol via micropropagation, using epicormic buds, were suitable for *in vitro* cultivation, presenting an establishment rate of 40.55%, and multiplication of 820 explants until the 11th subculture. In the elongating phase, the best results were observed in WPM media with 0.05 mg.L<sup>-1</sup> of BAP + 1 mg.L<sup>-1</sup> of NAA and 0.05 mg.L<sup>-1</sup> of BAP + 1 mg.L<sup>-1</sup> of NAA + 1 mg.L<sup>-1</sup> of AIB. In the rooting and acclimatization phase two models of microvessels (M2 with volume = 2.6 cm<sup>3</sup>; and M3 with volume = 5.3 cm<sup>3</sup>) presented the best results, which formed normal adventitious roots and of direct connection with the vascular cambium. In the stages of the indirect organogenesis, the callogenesis averaged 81.38% of callus formation in explants. In the bud induction phase, the explants from the cotyledon presented the highest mean values, while in the elongating phase, the explants from the hypocotyl tissue presented the best results the evaluated characteristics. Regarding the rooting and acclimatization phase, three models of microvessels (M4 with volume = 2.6 cm<sup>3</sup>; M6 with volume = 5.3 cm<sup>3</sup>; and M7 with volume = 4.9 cm<sup>3</sup>) presented the best results, which formed normal adventitious roots directly connected to the vascular cambium. Through molecular tests, confirmed the successful cloning of plants resulting from the micropropagation protocol by the ISSR technique, and a low genetic diversity of the microplants of the indirect organogenesis protocol. The micropropagation protocol through indirect organogenesis was efficient for the production of *E. microcorys* microplants, which requires as an explant the hypocotyl tissue grown in culture medium supplemented with 1 mg.L<sup>-1</sup> TDZ, 1 mg.L<sup>-1</sup> TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> NAA or 3 mg.L<sup>-1</sup> TDZ + 2 mg.L<sup>-1</sup> NAA. In the investigation of possible indications of rejuvenation and/or reinvigoration of tissues, materials resulting from plant production techniques were used: the seminal, grafting, micropropagation with epicormic shoots and indirect organogenesis. It was concluded that the individuals propagated via grafting presented different results with the other propagation techniques, but their behavior possibly does not match with greater rejuvenation and/or reinvigoration of the tissues. By the total protein test (TCA/Acetone/Phenol) two distinct regions were found in the samples obtained by grafting. The highest enzymatic activity of the peroxidase test was observed in the sample via micropropagation by epicormic shoots, demonstrating an indication of tissue rejuvenation. Regarding by pXRF, the best responses were detected for the distinction of materials propagated from the elements K, Ca, Zn, Fe, Mn, Si. However, new studies are recommended in order to seek other methods that have similarities with the responses to rooting in forest species and thus optimize the rescue in materials with different ontogenetic stages.

**Keywords:** Eucalypts. Cloning. Non-destructive rescues. Micropropagation. Indirect organogenesis. Grafting. Total protein. Peroxidase. pXRF.



## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>9</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>11</b>
	<b>CAPÍTULO 1: MICROPROPAGAÇÃO DE MATRIZ DE <i>Eucalyptus microcorys</i> COM IDADE SUPERIOR A 40 ANOS .....</b>	<b>14</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Caracterização geral .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Origem do material vegetal .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>Coleta e preparo dos galhos para a indução de brotações epicórmicas .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Preparo do meio de cultura e condições <i>in vitro</i> dos experimentos.....</b>	<b>19</b>
<b>2.5</b>	<b>Preparo dos explantes .....</b>	<b>19</b>
<b>2.6</b>	<b>Estabelecimento e multiplicação de gemas <i>in vitro</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>2.7</b>	<b>Alongamento de brotos .....</b>	<b>21</b>
<b>2.8</b>	<b>Enraizamento e aclimatização .....</b>	<b>22</b>
<b>2.9</b>	<b>Análise histológica .....</b>	<b>24</b>
<b>2.10</b>	<b>Fidelidade genética .....</b>	<b>25</b>
<b>2.11</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Brotações epicórmicas .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>Estabelecimento e multiplicação .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b>Alongamento das brotações .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4</b>	<b>Sobrevivência, enraizamento e aclimatização.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5</b>	<b>Análise histológica .....</b>	<b>37</b>
<b>3.6</b>	<b>Fidelidade genética .....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>39</b>
	<b>CAPÍTULO 2: MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Eucalyptus microcorys</i> POR MEIO DA ORGANOGÊNESE INDIRETA .....</b>	<b>44</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
<b>2.1</b>	<b>Caracterização geral .....</b>	<b>48</b>
<b>2.2</b>	<b>Origem do material vegetal .....</b>	<b>48</b>
<b>2.3</b>	<b>Desinfestação e germinação <i>in vitro</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>2.4</b>	<b>Preparo do meio de cultura e condições <i>in vitro</i> dos experimentos.....</b>	<b>49</b>
<b>2.5</b>	<b>Cultura calogênica.....</b>	<b>50</b>
<b>2.6</b>	<b>Regeneração de gemas adventícias .....</b>	<b>51</b>
<b>2.7</b>	<b>Alongamento de brotações.....</b>	<b>51</b>
<b>2.8</b>	<b>Enraizamento e aclimatização .....</b>	<b>51</b>
<b>2.9</b>	<b>Análise histológica .....</b>	<b>54</b>
<b>2.10</b>	<b>Diversidade genética.....</b>	<b>55</b>
<b>2.11</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>57</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>Cultura calogênica.....</b>	<b>57</b>
<b>3.2</b>	<b>Regeneração de gemas .....</b>	<b>59</b>
<b>3.3</b>	<b>Alongamento das brotações .....</b>	<b>61</b>
<b>3.4</b>	<b>Enraizamento e aclimatização .....</b>	<b>65</b>
<b>3.5</b>	<b>Análise histológica .....</b>	<b>68</b>

3.6	Diversidade genética.....	69
4	CONCLUSÕES.....	72
5	REFERÊNCIAS .....	72
	<b>CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL, PEROXIDASE E PXRf PARA A DETERMINAÇÃO DO REJUVENESCIMENTO E/OU REVIGORAMENTO DE TECIDOS DE <i>Eucalyptus microcorys</i> .....</b>	<b>78</b>
1	INTRODUÇÃO .....	80
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	82
2.1	Caracterização geral .....	82
2.2	Origem do material vegetal .....	82
2.3	Técnicas de propagação .....	83
2.3.1	Estaquia .....	83
2.3.2	Alporquia.....	83
2.3.3	Enxertia .....	83
2.3.4	Micropropagação com brotações do ano.....	84
2.3.5	Micropropagação com brotações epicórmicas e via organogênese indireta .....	84
2.3.6	Propagação via seminal.....	84
2.4	Análises para investigação do rejuvenescimento e revigoramento .....	85
2.4.1	Extração de proteína total - TCA/Acetona/Fenol.....	85
2.4.2	Peroxidase .....	86
2.4.3	Avaliação de nutrientes via pXRf .....	87
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	89
3.1	Proteína total - TCA/Acetona/Fenol .....	89
3.2	Peroxidase .....	92
3.3	Equipamento pXRf.....	94
4	CONCLUSÕES.....	97
5	REFERÊNCIAS .....	98
	ANEXOS.....	103

## INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a maior parte dos produtos de origem florestal é oriunda de povoamentos artificiais do gênero *Eucalyptus*. No ano de 2018, a área total de plantios florestais no Brasil totalizou 7,83 milhões de hectares, sendo que 5,7 milhões correspondem aos plantios de *Eucalyptus* e *Corymbia* no País. Mesmo com os impactos das alterações climáticas no crescimento das plantações florestais nos últimos anos, principalmente devido ao desequilíbrio do regime hídrico em várias regiões do território nacional, a produtividade dos plantios de eucaliptos apresentou um aumento médio de 0,5% em relação ao ano anterior (IBÁ, 2019).

O constante crescimento da cultura de espécies do gênero *Eucalyptus* decorre principalmente por suas vantagens advindas da clonagem e do melhoramento genético, os quais possibilitam contornar problemas de doenças, heterogeneidade e produtividade nos plantios florestais (XAVIER; SILVA, 2010; IBÁ, 2019). Diante do crescente uso de clones, tanto pelas grandes empresas, como por pequenos investidores, inclusive produtores rurais, têm-se observado consideráveis avanços tecnológicos quanto aos processos de seleção de árvores, resgate de árvores superiores, avaliação de clones, produção comercial de mudas (estaquia, miniestaquia e microestaquia) e em práticas silviculturais adotadas na implantação e condução dos plantios de florestas clonais (XAVIER; SILVA, 2010).

Um dos maiores desafios para a propagação clonal de espécies lenhosas é o envelhecimento ontogenético dos tecidos, o qual provoca baixa capacidade regenerativa (HARTMANN et al., 2011). A maioria das espécies lenhosas apresentam mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas durante a transição da fase juvenil para a adulta, sobretudo com relação ao potencial de clonagem, vigor de crescimento e resistência a doenças (SCHWAMBACH et al., 2008; HARTMANN et al., 2011). Plantas adultas diminuem gradativamente sua capacidade de enraizamento com o aumento da idade ontogenética, visto que ramos maduros tendem a apresentar menores concentrações de auxina, acúmulo de inibidores de enraizamento, aumento nos níveis fenólicos, além de barreira anatômica de tecido lignificado entre o floema e o córtex (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). Esses tipos de comportamentos em materiais adultos causam barreiras aos programas de melhoramento florestal com espécies de interesse comercial, sendo fator limitante ao avanço no setor de produção de mudas clonais (WENDLING; DUTRA; GROSSI, 2007).

Contudo, as características relacionadas à maturação dos tecidos vegetais podem ser estáveis e reversíveis, mesmo não apresentando o mesmo grau de facilidade na reversão para o

estado juvenil, a qual varia em função do nível de juvenilidade dos tecidos. O rejuvenescimento de clones consiste em reverter plantas ou parte delas de um estado maduro para um estado juvenil (WENDLING; XAVIER, 2005) enquanto o revigoração consiste na aplicação de técnicas que visem retornar a planta para um estado de alto vigor fisiológico (WENDLING; XAVIER, 2001). Assim, diferentes técnicas de rejuvenescimento e revigoração são empregadas em espécies lenhosas para induzir o crescimento de brotos juvenis e aumentar a produção de propágulos com maior potencial de enraizamento.

A fim de selecionar matrizes adequadas visando ganhos na clonagem de povoamentos florestais, a utilização dos testes de progênies para a seleção de árvores superiores tem sido considerada a forma mais adequada e de maior eficiência, principalmente nas situações onde os programas clonais se baseiam em características de baixa herdabilidade (ASSIS; MAFIA 2007, XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013). Por meio das técnicas que garantem o rejuvenescimento e revigoração desses materiais, é possível obter mudas de matrizes altamente produtivas e adaptadas em diferentes condições ambientais. Dada a importância do gênero *Eucalyptus* no atual cenário da silvicultura clonal brasileira, a técnica da micropropagação em espécies florestais vem ganhando cada vez mais espaço, tanto no nível acadêmico quanto no comercial, em função de suas vantagens, as quais proporcionam a minimização de algumas dificuldades no processo de produção de mudas de clones e espécies, principalmente no que concerne ao enraizamento.

No Brasil é raro encontrarmos testes de progênies e procedências com idades avançadas de plantio. Na cidade de Lavras, estado de Minas Gerais, encontram-se um dos poucos plantios experimentais de espécies do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia*, sendo este implantado no ano de 1974 e mantido até os dias atuais pela Universidade Federal de Lavras (UFLA) (MOURA et al., 1980). De origem seminal com diferentes espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia* nativos de regiões da Austrália, o *Eucalyptus microcorys* F. Muell destaca-se entre as demais espécies nesse povoamento, apresentando matrizes com excelentes características morfológicas de crescimento.

O *Eucalyptus microcorys* F. Muell é uma espécie pertencente à família Myrtaceae, gênero *Eucalyptus*, subgênero *Symphyomyrtus* e seção *Sebaria* (PRYOR, 1971). A espécie é nativa da Austrália onde é encontrada naturalmente na região norte de Nova Gales do Sul e ao sul de Queensland, em altitudes de até 800 m. O clima da região é quente e úmido, com chuvas concentradas no verão e período seco de três meses em média (REMADE, 2001). O *E. microcorys* possui excelentes características que favorecem suas aplicações silviculturais, tais

como a resistência moderada a geadas, susceptibilidade à deficiência hídrica severo, tolerância ao fogo, boa capacidade de regeneração pela brotação das cepas, além de apresentar resistência ao fungo *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill, o qual causa apodrecimento em madeiras de diversas espécies de eucalipto (FERREIRA, 1979; REMADE, 2003; CALONEGO et al., 2013).

Em suas características morfológicas, o *E. microcorys* apresenta porte arbóreo com altura de 35 a 60 m, diâmetro de 1,5 a 2 m, casca fibrosa com coloração vermelho-amarronzado ou marrom escuro. Ocorre variação no tamanho e forma das folhas adultas e folhas jovens, sendo as folhas adultas estreitamente lanceoladas e com ápice agudo, e as folhas jovens e intermediárias elípticas a ovadas. As inflorescências são do tipo umbrela localizadas nas pontas dos ramos e seus frutos são cônicos ou piriformes, com valvas niveladas (PLANTNET, 2018).

Com destaque na indústria moveleira e indústria civil, o *E. microcorys* apresenta madeira clara, dura, pesada (0,9 a 1,1 g.cm<sup>3</sup>), resistente, durável e de fácil trabalhabilidade, com baixa tendência às fendas. É uma das melhores madeiras dentre os eucaliptos, sendo utilizada na Austrália em forma de tacos para pisos e de dormentes de estradas de ferro (GOES, 1960). Apresenta alto valor como madeira para desdobro, boas características para laminação, confecção de móveis e caixotaria, bem como para construções e usos como postes, moirões e escoras (FERREIRA, 1979; MARCHESAN; MATTOS; SHIMIZU, 2005).

No Brasil, ainda que não plantada intensivamente, o *E. microcorys* não tem sido utilizada para a composição de florestas como visto em outras espécies do gênero, apresentando poucos relatos científicos na literatura, sendo observado apenas estudos quanto aos seus aspectos adaptativos e de utilização madeireira (OLIVEIRA et al., 2014; SOUZA; DELLA LUCIA; RESENDE, 1979). Dessa forma, a presente tese foi dividida em três seções, todas relacionadas ao estudo no resgate e desenvolvimento de protocolos para a propagação da espécie *E. microcorys*.

## REFERÊNCIAS

ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. **Hibridação e clonagem**. In: BORÉM, A. (ed.) Biotecnologia Florestal. Viçosa: Ed. Suprema, 2007. cap. 5, p. 93-121.

CALONEGO, F. W. et al. Behavior of the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum* on thermally-modified *Eucalyptus grandis* wood. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 20, n. 3, p. 417-423, 2013.

PLANTNET. **A web guide to the eucalypts**. National Herbarium of NSW, Royal Botanic Gardens, Sydney, 2018. Disponível em: <<http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/cgi-bin/NSWfl.pl?page=nswfl&lvl=sp&name=Eucalyptus~microcorys>>. Acesso em: 4 jan. 2018.

FERREIRA, M. Escolha de espécies de eucalipto. **Circular Técnica - IPEF**, Piracicaba, v.47, p.1-30, 1979.

GOES, E. S. R. **Os eucalyptos em Portugal: identificação e monografia de 90 espécies**. Lisboa: Secretaria de Estado da Agricultura, v. 1, 1960. 298 p.

HARTMANN, H. T. et al. **Hartmann & Kester's Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Ed. Prentice Hall, 8<sup>a</sup> edition, 2011. 928 p.

IBÁ – Industria Brasileira de Árvores. **Relatório Ibá 2019: ano base 2018**. São Paulo: Pöyry Consultoria em Gestão e Negócios Ltda, 2019. 90p.

MARCHESAN, R.; MATTOS, P. P.; SHIMIZU, J. Y. Caracterização física, química e anatômica da madeira de *Eucalyptus microcorys* F. Muell. **Embrapa Florestas**, Colombo, 2005. 5 p. (Embrapa Florestas, Comunicado Técnico, 133).

MOURA, V. P. G. et al. **Avaliação de espécies e procedências de *Eucalyptus* em Minas Gerais e Espírito Santo: resultados parciais**. Embrapa CPAC, Boletim de pesquisa 1 (INFOTECA-E), Brasília, 1980. 104p.

OLIVEIRA, F. N. et al. Seasonal influence on the essential oil of *Eucalyptus microcorys*. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 9, n. 4, p. 575-580, 2014.

PRYOR, L. D. **Aspectos da cultura do eucalipto no Brasil**. IPEF, Piracicaba, n. 2/3, p. 53-59, 1971.

REMADE – Revista de Madeira. **Espécies de Eucalipto**. Curitiba, Ed. Porthus Comunicação, v.59. Setembro de 2001. Disponível em: <<http://www.remade.com.br/revista-madeira>>. Acesso em: 14 jan. 2018.

REMADE – Revista de Madeira. **Descrição de algumas espécies de eucalipto**. Curitiba, Ed. Porthus Comunicação, v. 75. Agosto de 2003. Disponível em: <<http://www.remade.com.br/revista-madeira>>. Acesso em: 14 jan. 2018.

SCHWAMBACH, J. et al. Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* × *maidennii* mini-cuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. **New Forests**, Dordrecht, v. 36, n. 3, p. 261-271, 2008.

SOUZA, A. P., DELLA LUCIA, R. M., RESENDE, G. C. Estudo da densidade básica da madeira de *Eucalyptus microcorys* F. Muell, cultivado na região de Dionísio, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, v.3, n.1, p.16-27, 1979.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 8, n. 1, p. 187-194, 2001.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência da miniestaquia seriada no vigor radicular de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 681-689, 2005.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. Produção e sobrevivência de miniestacas e minicepas de erva-mate cultivadas em sistema semi-hidropônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 289-292, 2007.

XAVIER, A.; WENDLING, L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Ed. UFV, 2ª edição, 2013. 279 p.

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

**CAPÍTULO 1:**  
**MICROPROPAGAÇÃO DE MATRIZ DE *Eucalyptus microcorys* COM IDADE**  
**SUPERIOR A 40 ANOS**

**RESUMO**

O presente estudo teve por finalidade desenvolver um protocolo eficiente via micropropagação de *Eucalyptus microcorys* utilizando matriz com idade superior a 40 anos. A matriz utilizada foi proveniente de um povoamento implantado no ano de 1974 contendo diferentes procedências de *Eucalyptus* e *Corymbia*, localizada no município de Lavras-MG. Galhos da matriz foram coletados a fim de obter brotações epicórmicas como fonte de explantes para a inoculação *in vitro*. Os galhos foram mantidos em casa de vegetação em vasos de polietileno preenchidos com areia, sendo classificados em três classes diamétricas (T1: 1 a 3 cm; T2: 3 a 5 cm; e T3: 5 a 7 cm), com 15 repetições. O número de gemas e o número de brotações nos galhos foram contabilizados após 45 dias. A partir do estabelecimento e multiplicação *in vitro* dos explantes, foi avaliada a fase de alongamento *in vitro*, testando oito combinações dos fito-reguladores de crescimento BAP (0,05 mg.L<sup>-1</sup>), ANA (0, 1, 2 mg.L<sup>-1</sup>) e AIB (0, 1, 2 mg.L<sup>-1</sup>) em meio WPM, sendo avaliados o número de brotações e o número de brotos alongados (>1cm) após 120 dias. A fase de enraizamento ocorreu em condições *in vitro* testando três modelos de microtubetes em sistema de mini-estufim, sendo avaliadas a porcentagem de sobrevivência de microestacas, de enraizamento adventício (após 45 dias), e de aclimatização (após 65 dias). Por meio dos resultados obtidos, pôde verificar que não houve diferença entre as classes diamétricas dos galhos da matriz. As brotações epicórmicas apresentaram aptidão para o cultivo *in vitro*, com estabelecimento de 40,55% e multiplicação de 820 explantes até o 11<sup>o</sup> subcultivo, com média de 12 gemas por explante. Na fase de alongamento os melhores resultados foram observados utilizando 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA + 1 mg.L<sup>-1</sup> de AIB. Com relação a fase de enraizamento e aclimatização, destacaram-se os modelos 2 (volume = 2,60 cm<sup>3</sup>) e 3 (volume = 5,30 cm<sup>3</sup>) dos microtubetes, os quais apresentaram as maiores médias na sobrevivência, enraizamento e aclimatização das microestacas. O enraizamento foi bem-sucedido, resultando em raízes adventícias normais e conexão direta com o câmbio vascular. Para avaliar a fidelidade genética dos materiais cultivados *in vitro*, foram utilizados 20 marcadores ISSR, os quais revelaram a clonagem bem-sucedida entre as mudas aclimatizada e a planta matriz. O protocolo de micropropagação foi eficiente para a produção de microplantas de *E. microcorys* podendo ser utilizada para novos estudos da espécie ou mesmo como indicação para a propagação clonal de outras espécies de eucalipto.

**Palavra-chave:** Clonagem. Cultivo *in vitro*. Regulador de crescimento. Microtubetes.



## MICROPROPAGATION OF ABOVE 40 YEARS-OLD TREE OF *Eucalyptus microcorys*

### ABSTRACT

The present study developed an efficient protocol via micropropagation of *Eucalyptus microcorys* using a donor plant over 40 years old. The donor plant used came from a settlement implanted in 1974 containing different origins of *Eucalyptus* and *Corymbia*, located in Lavras-MG. In order to minimize the effects of ontogenetic age, the donor plant had as selection criteria visual aspects, straight shaft, no signs of pathogen attacks and branches located in the lowest portion of the crown. Donor plant branches were collected to obtain epicormic shoots as a source of explants for *in vitro* inoculation. The branches were kept in a greenhouse in polyethylene pots filled with sand, and were classified into three diametric classes (T1: 1 to 3 cm; T2: 3 to 5 cm; and T3: 5 to 7 cm), with 15 replications each. The number of buds and the number of shoots on the branches were counted after 45 days. From the *in vitro* establishment and multiplication of the explants, the *in vitro* elongation phase was evaluated, testing eight combinations of growth regulators BAP ( $0.05 \text{ mg.L}^{-1}$ ), NAA (0, 1, 2  $\text{mg.L}^{-1}$ ) and IBA (0, 1, 2  $\text{mg.L}^{-1}$ ), in WPM culture medium. The number of shoots and the number of elongated shoots ( $>1 \text{ cm}$ ) were measured after 120 days. The rooting phase occurred in *in vitro* conditions, testing three different models of microvessels in a mini-estufim system. The percentage of survival and adventitious rooting, and acclimatization of the microcutting were evaluated after 45 and 65 days, respectively. Through the results obtained, no difference between the diametric classes of the branches of the donor plant was verified based on the evaluated characteristics. Epicormic shoots were suitable for *in vitro* cultivation with 40.55% of establishment, and multiplication of 820 explants until the 11th subculture, with an average of 12 buds per explant. In the elongation phase, the supplementation of  $0.05 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP +  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  NAA and  $0.05 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP +  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  NAA +  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  AIB presented the best results. Regarding the rooting and acclimatization phase, models 2 (volume =  $2.60 \text{ cm}^3$ ) and 3 (volume =  $5.30 \text{ cm}^3$ ) of microvessels presented the highest averages in survival, rooting and acclimatization of microcutting. Samples of the microcutting insertion region with the adventitious roots were collected for histological analysis, resulting in a successful rooting with normal adventitious roots and direct connection with the vascular cambium. To evaluate the genetic fidelity of the materials cultivated *in vitro*, 20 ISSR markers were used, which revealed reliability between the rescued propagules and the donor plant. The micropropagation protocol was efficient for the production of *E. microcorys* microplants and can be used for further studies of the species or even as the clonal propagation of other species of the genus.

**Keyword:** Clonal propagation. Adult individuals. Plant growth regulators. Microvessels.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a maior parte dos produtos de origem florestal são oriundos das florestas plantadas do gênero *Eucalyptus*. No ano de 2018, a área total de plantios florestais no Brasil totalizou 7,83 milhões de hectares, sendo que 5,7 milhões correspondem aos plantios de *Eucalyptus* sp. no País (IBÁ, 2019). O constante crescimento da cultura de eucalipto decorre principalmente por suas vantagens advindas da clonagem e do melhoramento genético (XAVIER; SILVA, 2010; IBÁ, 2019).

No início dos programas de silvicultura clonal de *Eucalyptus* no Brasil, a seleção de árvores superiores era realizada, principalmente, em plantios comerciais, devido à grande variabilidade genética e a necessidade de obter resultados a curto prazo, operacionalidade e eficiência nos processos seletivos dos clones. No entanto, em outros programas mais avançados na silvicultura clonal de *Eucalyptus* e *Corymbia* tem sido adotada a seleção de árvores superiores em testes de progênies (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; XAVIER; SILVA, 2010).

Contudo, testes de progênies e procedências são importantes ferramentas para selecionar matrizes com características de interesse ao produto final, sendo raro encontrarmos plantios com idades avançadas de formação. Desde 1974, alguns estudos com espécies do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia* vêm sendo realizados com indivíduos pertencentes a um plantio experimental na cidade de Lavras, estado de Minas Gerais, sendo mantido até os dias atuais pela Universidade Federal de Lavras (UFLA) (MOURA et al., 1980). Dentre as espécies desse povoamento, encontra-se o *Eucalyptus microcorys* F. Muell, que apresenta matrizes com excelentes características morfológicas de crescimento.

O *Eucalyptus microcorys* F. Muell é uma espécie pertencente à família Myrtaceae, gênero *Eucalyptus*, subgênero *Symphyomyrtus* e secção *Sebaria* (PRYOR, 1971). A espécie é nativa da Austrália onde é encontrada naturalmente na região norte de Nova Gales do Sul e ao sul de Queensland, em altitudes de até 800 m. O *E. microcorys* possui excelentes características que favorecem suas aplicações silviculturais, tais como a resistência moderada a geadas, susceptibilidade à deficiência hídrica severo, tolerância ao fogo, além de apresentar boa capacidade de regeneração pela brotação de cepas, e pela sua resistência ao fungo *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill, o qual causa apodrecimento em madeiras de diversas espécies do gênero *Eucalyptus* (FERREIRA, 1979; REMADE, 2003; CALONEGO et al., 2013).

O *E. microcorys* não tem sido implantado para a composição de florestas no País como visto em outras espécies do gênero, apresentando poucos relatos científicos, sendo observado apenas estudos quanto aos seus aspectos adaptativos e de utilização madeireira (OLIVEIRA et al., 2014; SOUZA; DELLA LUCIA; RESENDE, 1979). Dessa forma, o presente estudo teve a seguinte pergunta de pesquisa: é possível propagar vegetativamente, pela técnica de micropropagação, matrizes adultas de *E. microcorys* com idade superior a 40 anos, a fim de desenvolver um protocolo eficiente de clonagem?

A micropropagação é uma das principais aplicações da cultura de tecidos, sendo conceituada como uma técnica de propagação vegetativa *in vitro*, utilizando propágulos de pequeno tamanho (PAIVA; GOMES, 2011; TRUEMAN; HUNG; WENDLING, 2018). Seu uso em nível comercial tem aumentado nos últimos anos, em função das vantagens que a técnica da micropropagação apresenta, tais como a possibilidade de obter grande número de plantas clonais, em curto espaço de tempo e em área reduzida (DAVEY; ANTHONY, 2010; HARTMANN et al., 2011), além de proporcionar menores variações genéticas em relação ao material original, resultando em cópia autêntica da planta-matriz (NEUMANN; KUMAR; IMANI, 2009).

O *Eucalyptus* é o gênero florestal que possui o maior número de estudos na literatura relacionados à micropropagação. Um dos objetivos da micropropagação é a necessidade de clonar espécies ou híbridos que tenham altos índices de crescimento, tolerância a baixas temperaturas e salinidade, resistência a pragas e doenças. Outra importante vantagem é o rejuvenescimento e o revigoramento de árvores adultas selecionadas, visto que se tem comprovado que o potencial do enraizamento de propágulos de árvores adultas aumenta com os sucessivos subcultivos *in vitro* (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; XAVIER; SILVA, 2010; WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014; BRONDANI et al., 2018).

Ainda existe a necessidade de continuidade dos estudos com a técnica de micropropagação de *Eucalyptus*, principalmente no sentido de redução de custos, buscando maximizar as etapas que compõem o processo e estabelecimento de protocolos que possam ser empregados para diversas espécies, bem como, em relação a técnicas para o resgate de material adulto selecionado e seu posterior rejuvenescimento (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009; BRONDANI et al., 2012). Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo desenvolver um protocolo eficiente de clonagem via micropropagação de indivíduo adulto de *E. microcorys* com idade superior a 40 anos de idade, assim como avaliar as combinações de fito-reguladores de crescimento nos diferentes estágios do protocolo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Caracterização geral**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultivo *In vitro* de Espécies Florestais, situado no Departamento de Ciências Florestais e no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Medicinais, situado no Departamento de Agricultura. A caracterização molecular foi realizada no Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas, situado no Departamento de Ciências Florestais, as análises histológicas dos tecidos vegetais foram conduzidas no Laboratório de Anatomia Vegetal, situado no Departamento de Biologia. Todos os laboratórios são pertencentes à Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG.

### **2.2. Origem do material vegetal**

Brotos epicórmicos foram obtidos de galhos coletados de uma matriz adulta de *E. microcorys* para fins de clonagem da espécie. A matriz utilizada foi proveniente de um povoamento implantado no ano de 1974 contendo diferentes procedências de *Eucalyptus* e *Corymbia*, localizado no Viveiro Florestal da Universidade Federal de Lavras (21°22'75" S, 44°96'98" W), no município de Lavras-MG (MOURA et al., 1980).

### **2.3. Coleta e preparo dos galhos para a indução de brotações epicórmicas**

A matriz selecionada teve como critério de seleção aspectos visuais, fuste 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.

Para a indução das brotações epicórmicas, foram coletados 45 galhos com tamanho médio de 50 cm de comprimento e diâmetros entre 1,0 a 7,0 cm, sendo realizada a remoção completa das folhas. Os galhos foram acondicionados em casa de vegetação climatizada, com umidade relativa do ar e temperatura controlados (UR>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 em posição vertical dentro de vasos de polietileno (5 L), preenchidos com areia lavada, em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo classificados em três classes diamétricas: T1: Galhos com 1 a 3 cm; T2: Galhos com 3 a 5 cm; e T3: Galhos com 5 a 7 cm; contendo 15 repetições cada. O número de brotações e número de gemas presentes nos galhos foram contabilizados após 45 dias.

#### **2.4. Preparo do meio de cultura e condições *in vitro* dos experimentos**

O meio de cultura foi preparado com água destilada, adicionando-se 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar e 30 ou 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>/342,30 g). O valor do pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 com HCl e/ou NaOH, previamente a adição do ágar, e então, autoclavado a temperatura de 121°C (~1,0 kgf.cm<sup>-2</sup>) durante 20 minutos. O BAP (benzilaminopurina / C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>5</sub> / 225,25 g) e ANA (ácido naftalenoacético / C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub> / 186,2 g) e AIB (ácido indolbutírico / C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub> / 203,24 g) foram adicionados ao meio de cultura antes da autoclavagem. Os explantes foram cultivados em sala de crescimento com temperatura de 25°C (±1°C), fotoperíodo de 16 horas e intensidade de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

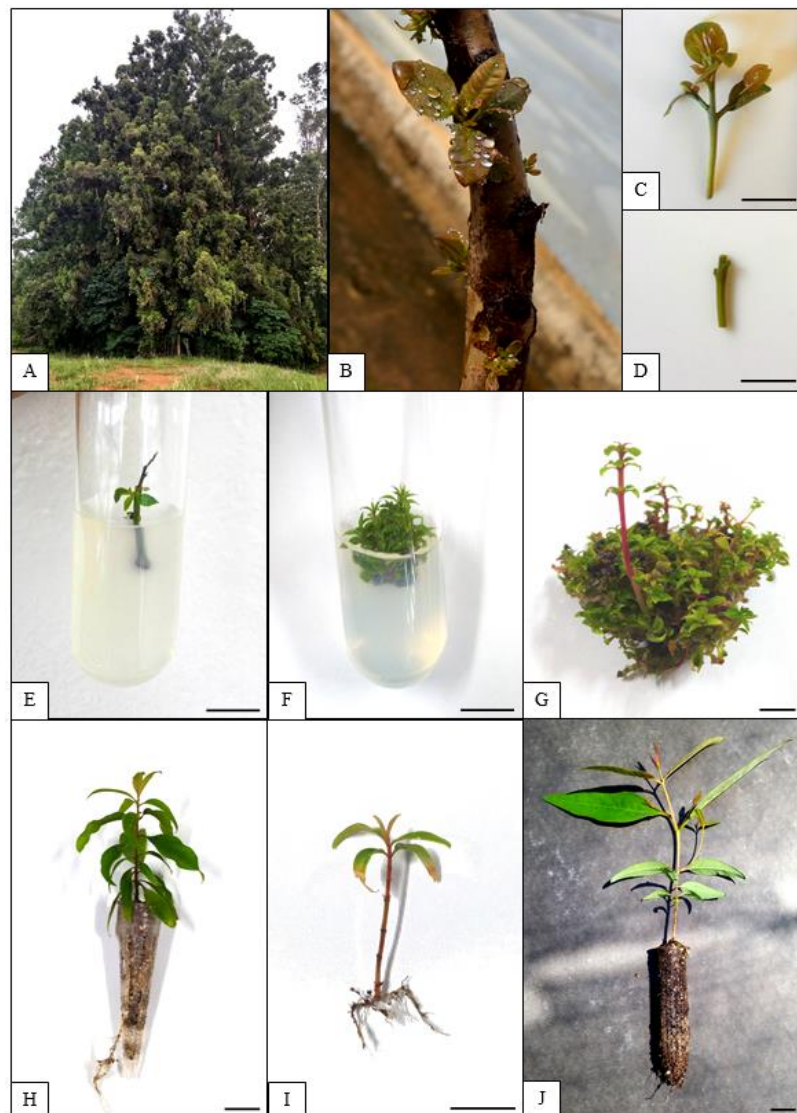
#### **2.5. Preparo dos explantes**

Segmentos nodais coletados da porção mediana das brotações epicórmicas foram utilizados como explantes, apresentado tamanho entre 1,0 a 1,5 cm de comprimento, gemas axilares e folhas removidas por completo (Figura 1C e D). Após a padronização dos explantes, os mesmos passaram pelo processo de assepsia, que consistiu em 10 minutos em água corrente, e em seguida, imersos em hipoclorito de sódio (NaOCl) à 50% (água:hipoclorito, v/v, 2,0-2,5% de cloro ativo) por 5 minutos, e ao final do processo, os explantes foram conduzidos em câmara de fluxo laminar e lavados por três vezes com água deionizada e autoclavada (tríplice lavagem).

Após a assepsia, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (2×15 cm) contendo 12 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com ausência de fito-reguladores de crescimento, sendo mantidos em sala de crescimento (Tabela A - Anexos).

Figura 1 - Detalhes das fases de micropropagação da matriz adulta de *Eucalyptus microcorys*.

(A) Matriz adulta selecionada para coleta dos explantes; (B) Galho da matriz com brotos epicórmicos após 45 dias em casa de vegetação; (C) Segmentos nodais da porção mediana de brotação epicórmica (D) utilizados como explantes; (E) segmento nodal estabelecido *in vitro* após 30 dias da inoculação; (F) Explante contendo múltiplas gemas axilares em meio de cultura WPM suplementado com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de ANA após 275 dias; (G) Explante apresentando múltiplas gemas axilares com iniciação de alongamento de brotações em meio de cultura WPM suplementado 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e mg.L<sup>-1</sup> de AIB, aos 90 dias; (H e I) Enraizamento *in vitro* de microestaca após 45 dias da fase de enraizamento (H) com destaque ao crescimento radicial fora do microtubete; (J) Microestaca aclimatizada inicializando a degradação do microtubete (modelo 3) após 30 dias da fase de aclimatização. Barras = 1cm.



Fonte: O Autor (2020).

## 2.6. Estabelecimento e multiplicação de gemas *in vitro*

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento. Os explantes que não apresentaram contaminação fúngica e/ou bacteriana e ausência de oxidação, foram considerados estabelecidos ao final de 30 dias da inoculação *in vitro*.

A etapa de multiplicação de gemas foi proveniente do protocolo de micropropagação da espécie florestal *E. benthamii*, adaptado de Brondani et al. (2012). Os explantes provenientes da fase de estabelecimento, contendo uma gema axilar, foram inoculados em tubos de ensaio (2×15 cm) contendo 12 mL do meio de cultura WPM - *Wood Plant Medium* (LLOYD; MCCOWN, 1981) (Tabela A - Anexos), preparado com água destilada, adicionando-se 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar, 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. As repicagens foram realizadas em intervalos de 25 dias. O número de explantes e de gemas induzidas por explante foram contabilizados após 275 dias de cultivo *in vitro*.

## 2.7. Alongamento de brotos

Explantes contendo gemas axilares com 5 a 10 iniciações de brotos (obtidos a partir da 11ª repicagem em meio de multiplicação) foram inoculados em meio de cultura WPM com oito combinações e concentrações dos fito-reguladores ANA e AIB, conforme apresentado na Tabela 1. O fito-regulador BAP foi suplementado em todos os tratamentos na concentração de 0,05 mg.L<sup>-1</sup>.

Tabela 1 - Suplementação do meios de cultura WPM com fito-reguladores de crescimento na fase de alongamento *in vitro* para explantes de *Eucalyptus microcorys*.

Tratamento	ANA	AIB
	mg.L <sup>-1</sup>	
1	0	1
2	0	2
3	1	0
4	1	1
5	1	2
6	2	0
7	2	1
8	2	2

ANA – ácido naftalenoacético, AIB – ácido indolbutírico.

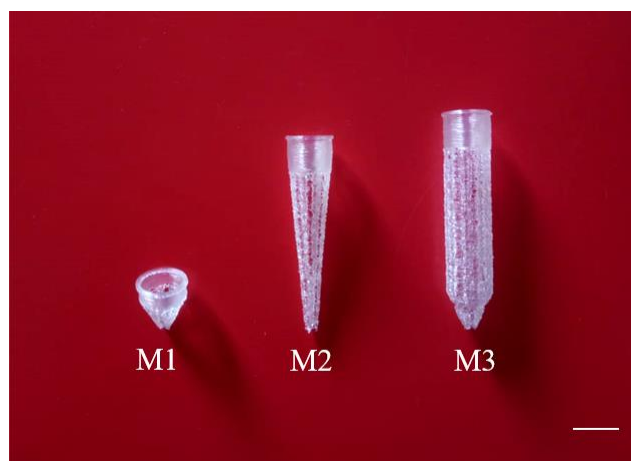
Fonte: O Autor (2020).

Os explantes foram inoculados em frascos circulares de vidro (6×7 cm) contendo 40 mL do meio de cultura, sendo realizados subcultivos a cada 25 dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), contendo oito combinações dos fitoreguladores ANA e AIB, em oito repetições com quatro explantes por frasco. O número de brotação e o número de brotos alongados (>1cm) foram avaliados após 120 dias.

## 2.8. Enraizamento e aclimatização

As microestacas possuindo comprimento superior a 1 cm foram coletadas e transplantadas em microtubetes *in vitro*, com o auxílio do sistema em mini-estufim (BRONDANI et al., 2018). Três modelos de microtubetes foram utilizados na fase de enraizamento. Os microtubetes foram produzidos em impressora 3D (Orion Delta) utilizando como material o polímero PLA (poli(ácido láctico)), que nada mais é que um poliéster termoplástico feito com ácido láctico a partir de materiais de origem natural (amido de milho, mandioca, beterraba, cana-de-açúcar) e que apresenta biodegradabilidade (Figura 2).

Figura 2 - Modelos dos microtubetes (M1, M2 e M3) utilizados na fase de enraizamento de microestacas de indivíduo adulto de *Eucalyptus microcorys*. Barra = 1cm.



M = modelo de microtubete.

Fonte: O Autor (2020).

Os modelos dos microtubetes apresentaram duas formas distintas (cilíndrica e cônica) com três alturas (variando de 1,5 a 6,0 cm) e com diâmetro fixo de 1 cm. As principais características dos modelos dos microtubetes, como o formato, o número de estrias, a dimensão, o volume, o peso e o tempo de impressão estão apresentados na Tabela 2.



Tabela 2 - Detalhes do formato, número de estrias, dimensões, peso e tempo na confecção dos três modelos de microtubetes utilizados nas fases de enraizamento *in vitro* e aclimatização de microestacas de *Eucalyptus microcorys*.

Modelos	Formato	Número de estrias	Dimensões		Volume (cm <sup>3</sup> )	Peso (g)	Tempo de impressão* (minutos)
			Altura (cm)	Diâmetro (cm)			
1	Cônico	8	1,5	1,0	0,75	0,53	6
2	Cônico	8	5,5	1,0	2,60	1,00	19
3	Cilíndrico	16	6,0	1,0	5,30	1,00	23

\* Utilizado a impressora 3D marca Orion Delta.

Fonte: O Autor (2020).

O mini-estufim consistiu de uma estrutura plástica contendo uma bandeja de células retangulares (utilizadas na horticultura) com dimensões 47×17×3 cm. Cada célula foi preenchida com areia autoclavada servindo de suporte para os microtubetes. O mini-estufim foi vedado para evitar variações na umidade relativa do ar, sendo controlado semanalmente com a adição de 20-50 mL de água destilada (BRONDANI et al., 2012; BRONDANI et al., 2018).

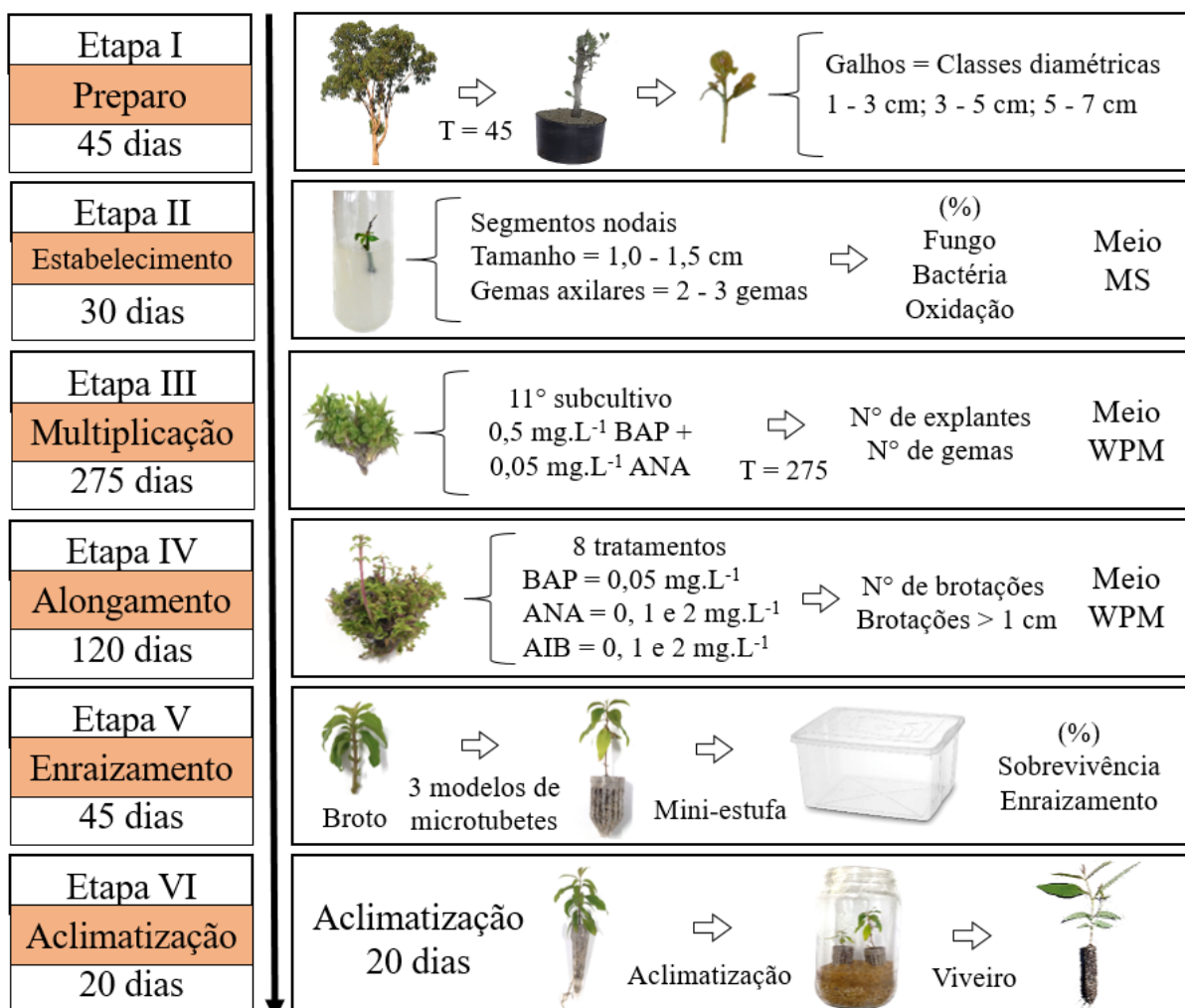
O substrato utilizado para promover o enraizamento das microestacas foi constituído pela mistura de substrato orgânico comercial a base de casca de pinus decomposta e vermiculita média, na proporção igual a 1:1 (v/v). O mini-estufim foi mantido em ambiente com temperatura de 25°C (±1°C), fotoperíodo de 16 horas e intensidade de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), contendo três modelos de microtubetes com 15 repetições cada, totalizando 45 microestacas. Após 45 dias, foram contabilizados a porcentagem de sobrevivência e de enraizamento adventício das microestacas.

Para a aclimatização, as microestacas enraizadas inseridas nos microtubetes foram transferidas para frascos circulares de vidro vedados com papel filme, mantendo o ambiente úmido e realizando pequenas aberturas a cada dois dias. Após 10 dias, as microestacas foram levadas para viveiro e imersas diretamente em tubetes de polietileno (110 cm<sup>3</sup>) contendo a mesma combinação do substrato utilizado na fase do enraizamento. Nessa fase, as microestacas permaneceram em casa de sombra coberta com tela permitindo passagem de 50% da luminosidade, sendo irrigadas por aspersão com sistema automático quatro vezes ao dia. A aclimatização ocorreu em torno de 10 dias, sendo avaliada a sobrevivência das mudas.

Os passos apresentados na metodologia estão ilustrados resumidamente pela Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma com os métodos utilizados desde a coleta e inoculação dos explantes *in vitro* (brotos epicórmicos) até a fase de aclimatização de plantas de *Eucalyptus microcorys* (total de 535 dias).



Fonte: O Autor (2020).

## 2.9. Análise histológica

Estudos anatômicos foram conduzidos para evidenciar o local de diferenciação das células na raiz adventícia das microestacas de *E. microcorys*. Segmentos caulinares com formação de raízes adventícias foram coletadas e fixadas em FAA70 (formaldeído 37% + etanol 70% + ácido acético glacial) (JOHANSEN, 1940), por 48 horas, e logo após, desidratadas em série etílica de 70, 80 e 95%, em intervalos regulares de 24 horas. Na sequência, os materiais permaneceram sete dias em resina de infiltração Leica Histoiresin na mistura de 1:1

(resina:álcool) e logo após, transferidos para resina pura, por mais sete dias, e então foram emblocados em historesina.

Os cortes transversais foram realizados em micrótomo de mesa regulado na espessura de 8µm. As seções foram desidratadas em álcool etílico, coradas com solução aquosa azul de toluidina – pH 4,7. Para a confecção das lâminas permanentes foi utilizado meio de montagem Acrilex, misturado em glicerina 50% (PAIVA et al., 2006).

## **2.10. Fidelidade genética**

Extrações de DNA foram realizadas após a aclimatização das microestacas em viveiro, de acordo com protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1990). Amostras contendo 20 mg de tecido foliar foram coletadas, armazenadas em microtubos e maceradas com o auxílio de nitrogênio líquido. Adicionou-se 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), submetendo-as novamente à agitação vigorosa, seguida por centrifugação a 12.000 rpm durante 7 minutos. Transferiu-se 500 µL do sobrenadante para novos tubos contendo 500 µL de isopropanol, deixando-as 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 também avaliadas qualitativamente conforme razão de absorbância entre os comprimentos de onda A260 e A280, utilizando o espectrofotômetro NanoVue Plus™ (Biochrom).

Para avaliar a fidelidade genética dos materiais resgatados, foram utilizados 20 marcadores ISSR, cujas especificações são apresentadas na Tabela 3. As amplificações 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 segundos 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).

Os fragmentos amplificados foram comparados com marcador de peso molecular conhecido Ladder 1Kb Plus. Utilizando apenas bandas bem definidas, foi avaliado a ocorrência de polimorfismo em cada indivíduo.

Tabela 3 - Especificações dos primers ISSR utilizados nas análises de fidelidade genética dos materiais resgatados de *Eucalyptus microcorys*.

Nº	Primer	Sequência	Nº	Primer	Sequência
1	Becky	(CA)7-YC	11	835	(AG)8-YC
2	Chris	(CA)7-YG	12	840	(GA)8-YT
3	John	(AG)7-YC	13	841	(GA)8-YC
4	Manny	(CAC)4-RC	14	842	(GA)8-YG
5	807	(AG)8-T	15	848	(CA)6-RG
6	808	(AG)8-C	16	880	(GGAGA)3
7	810	(GA)8-T	17	889	DBD(AC)7
8	814	(CT)8-TG	18	898	(CA)6-RY
9	825	(AC)8T	19	901	(GT)6-YR
10	827	(AC)8G	20	902	(GT)6-AY

R = purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T).

Fonte: O Autor (2020).

## 2.11. Análise estatística

Os dados mensurados foram submetidos ao teste de Hartley ( $p > 0,05$ ) e Shapiro-Wilk ( $p > 0,05$ ), a fim de verificar a homogeneidade de variância entre os tratamentos e a distribuição normal dos dados, respectivamente. Os dados foram transformados conforme a necessidade por meio do teste Box-Cox. Em seguida, foi realizada análise de variância (ANOVA,  $p < 0,05$ ). De acordo com a significância da ANOVA, os dados dos fatores qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Foi utilizado para a análise estatística dos dados o software estatístico R versão 3.5.2, pacote ExpDes (R CORE TEAM, 2019).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Brotações epicórmicas

O número de gemas e o número de brotações epicórmicas presentes nos galhos coletados do indivíduo adulto de *E. microcorys* foram contabilizadas após 45 dias em casa de vegetação.

Não houve diferença em relação ao número de gemas e número de brotações epicórmicas em relação às classes diamétricas dos galhos coletados do indivíduo de *E. microcorys* (Tabela 4).

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para o número de gemas e o número de brotações epicórmicas dos galhos coletados de *Eucalyptus microcorys* em relação as classes diamétricas.

Causas da variação	GL	Quadrados médios	
		N° de gemas	N° de brotações
Classes diamétricas	2	0,0012 <sup>ns</sup>	0,0028 <sup>ns</sup>
Resíduo	42	0,0009	0,0011
Média	-	8,67	10,50
CV (%)	-	3,38	4,02

<sup>ns</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. Dados transformados por  $1/EXP[(n+0,5)/100]$ , onde n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação.

Fonte: O Autor (2020).

Houve decréscimo do número de gemas quando os galhos apresentaram diâmetros maiores, mas essa diferença resultou em pouca variação, estando todas as três classes diamétricas estatisticamente iguais, com média geral de 8,67 gemas por galho (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios do número de gemas e do número de brotações epicórmicas dos galhos coletados de *Eucalyptus microcorys* em relação as classes diamétricas aos 45 dias em casa de vegetação.

Classes diamétricas	Número de gemas	Número de brotações
1 - 3 cm	9,80 ( $\pm 1,76$ )	12,20 ( $\pm 2,63$ )
3 - 5 cm	8,60 ( $\pm 1,07$ )	9,70 ( $\pm 0,99$ )
5 - 7 cm	7,80 ( $\pm 1,98$ )	10,40 ( $\pm 2,13$ )
Média	8,67	10,50
CV (%)	3,38	4,02

CV = coeficiente de variação. Dados apresentados como: média  $\pm$  erro padrão. CV = coeficiente de variação.

Fonte: O Autor (2020).

Em um estudo realizado com a espécie florestal *Ilex paraguariensis*, utilizando galhos provenientes de indivíduos adultos visando à indução de brotações epicórmicas, foi observada média de seis brotações por galho podado, aos 50 dias em casa de vegetação (WENDLING et al., 2013). No presente estudo, o número de brotações epicórmicas dos galhos de *E. microcorys*

apresentaram uma média geral de 10,5 brotações aos 45 dias em casa de vegetação, estando todas as classes diamétricas estatisticamente iguais entre si (Tabela 5).

Os coeficientes de variação dos dados para as duas características avaliadas foram relativamente altos, havendo necessidade de transformação dos mesmos, fato esse decorrente da grande amplitude dos dados coletados, contendo galhos com apenas três gemas e brotações, e outros com mais de 20.

O uso da técnica de resgate via brotações epicórmicas é importante para a conservação de germoplasma e de seleção de indivíduos superiores, na qual o resgate é feito normalmente na fase adulta, onde a propagação pode ser limitada devido à idade ontogenética (WENDLING et al., 2013; PIRES; WENDLING; BRONDANI, 2013). Os resultados do presente estudo podem ser explicados pelo potencial fisiológico e genético da matriz selecionada, além dos critérios de seleção adotados, dentre os quais foram coletados galhos na porção mais baixa da copa com o intuito de minimizar os efeitos da idade ontogenética do material.

Na literatura encontram-se estudos recomendando o método de resgate via brotos epicórmicos para matrizes de espécies florestais adultas, tais como em *Ilex paraguariensis* com 19 anos de idade (WENDLING et al., 2013), *Eucalyptus benthamii* com 13 anos (BACCARIN et al., 2015) e *Eucalyptus cloeziana* com 26 anos (OLIVEIRA et al., 2015). No presente estudo, a indução de brotações epicórmicas a partir de galhos podados, foi considerada uma técnica viável para a matriz adulta de *E. microcorys*, apresentando brotos com qualidade e quantidade satisfatórias (Figura 1B).

### 3.2. Estabelecimento e multiplicação

A propagação vegetativa de árvores adultas pode ser facilitada pela indução de brotações epicórmicas, buscando obter brotos com maior grau de juvenilidade, geralmente com bom potencial de propagação (HARTMANN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015). No presente estudo, as brotações epicórmicas coletadas a partir dos galhos do indivíduo adulto de *E. microcorys* apresentaram aptidão para o cultivo *in vitro*, sendo coletadas 150 brotações após 45 dias em casa de vegetação.

A assepsia adotada para a fase de introdução *in vitro* dos explantes de *E. microcorys* apresentou uma porcentagem média de estabelecimento de segmentos nodais de 40,55% aos 30 dias após introdução *in vitro* (Tabela 6). Com relação a presença de contaminações *in vitro*, a maior porcentagem contabilizada foi de origem fúngica, correspondendo 49,8% do total dos

explantes, sendo o restante das perdas de apenas 6,20% de contaminação bacteriana e 3,45% de oxidação fenólica (Tabela 6).

Tabela 6 - Porcentagem de estabelecimento, contaminações fúngicas, bacterianas e oxidação dos explantes de *Eucalyptus microcorys* aos 30 dias após a instalação do experimento.

Estabelecimento	Contaminações		
	Fungo	Bactéria	Oxidação
40,55(±4,00)	49,80(±4,15)	6,20(±2,00)	3,45(±1,52)

Dados apresentados como: média ± erro padrão.

Fonte: O Autor (2020).

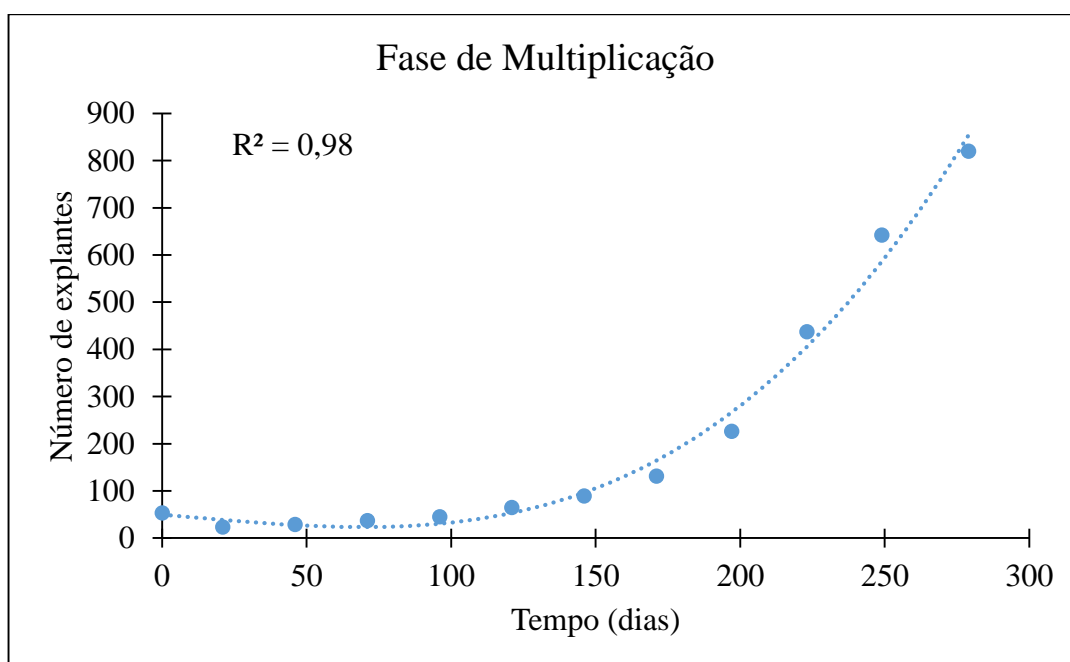
As contaminações por fungos e bactérias são um dos maiores problemas enfrentados na fase inicial de estabelecimento de explantes *in vitro*, sendo o surgimento desses microrganismos influenciados pelo tipo do explante, idade e estado fisiológico da planta matriz e, tempo e concentração da solução desinfestante (NAVROSKI et al., 2014; BACCARIN et al., 2015). No presente estudo, as maiores perdas por contaminação no estabelecimento *in vitro* de explantes de *E. microcorys* foram de origem fúngica, fato esse similar com outros estudos na literatura, como de Brondani et al. (2009) trabalhando com estabelecimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*, os quais apresentaram resultados com baixa contaminação por bactérias (9%) e alta contaminação por fungos (41,3%).

Uma das possíveis formas de minimizar a presença das contaminações fúngicas no meio de estabelecimento seria por meio de tratamentos mais criteriosos nas brotações epicórmicas na casa de vegetação, realizando aplicações de fungicidas nos galhos alguns dias antes da coleta, a fim de reduzir as fontes de contaminação e maximizar o processo da micropropagação da espécie. Mesmo assim, para obter o sucesso da técnica de micropropagação é necessário que apenas alguns explantes emitam brotações livres de contaminação, pois o início da propagação *in vitro* é a principal fase limitante (TRUEMAN; HUNG; WENDLING, 2018). No presente estudo, mesmo com 59,45% de perda dos materiais inoculados *in vitro*, as emissões dos brotos axilares estabelecidos de *E. microcorys* apresentaram excelente qualidade, sendo recomendados para utilização nas fases subsequentes do protocolo da espécie (Figura 1E).

Após o estabelecimento dos explantes *in vitro*, ocorreu a fase de multiplicação, correspondendo em 11 subcultivos com total de 275 dias. A análise de regressão polinomial apresentou estimativa adequada para os valores médios do número de explantes. O valor do coeficiente de determinação foi igual a 0,98 sendo possível modelar adequadamente o

comportamento do número de explantes durante o tempo dos subcultivos em meio de multiplicação de gemas (Figura 4). Os explantes de *E. microcorys* apresentaram comportamento de multiplicação satisfatório resultando em um crescimento exponencial a partir do 6° subcultivo (150 dias) (Figura 4).

Figura 4 - Número de explantes em função do tempo de cultivo durante a fase de multiplicação de explantes oriundos de indivíduo adulto de *Eucalyptus microcorys*.



Fonte: O Autor (2020).

As citocininas são responsáveis por estimular o desenvolvimento das gemas axilares, desencadeando o crescimento e divisões celulares que resultam no surgimento de novas brotações, dentre as quais o BAP corresponde a citocinina mais utilizada nos trabalhos de multiplicação *in vitro* de espécies florestais, sendo seu uso muitas vezes combinado com o ANA (DAVEY; ANTHONY, 2010; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013). A espécie *E. microcorys* respondeu positivamente ao meio de multiplicação proveniente do protocolo da espécie florestal *Eucalyptus benthamii*, adaptado de Brondani et al. (2012) (0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) resultando no 11° subcultivo 820 explantes com média de 12 gemas cada ( $\pm 0,36$ ) (Figura 1F).

Na literatura são relatados o uso dos fito-reguladores BAP e ANA nas concentrações, respectivamente, de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> e 0,05 mg.L<sup>-1</sup> para a micropropagação de outras espécies do gênero *Eucalyptus* na fase de multiplicação, tendo por exemplo, o *Eucalyptus tereticornis* ×



*E. camaldulensis* (BISHT et al., 1999), *E. tereticornis* (SHARMA; RAMAMURTHY, 2000), *E. tereticornis* × *E. grandis* (JOSHI et al., 2003), *E. camaldulensis* × *E. tereticornis* e *Eucalyptus torelliana* × *Eucalyptus citriodora* (ARYA et al., 2009), *E. benthamii* × *E. dunnii* (BRONDANI et al., 2011) e *E. benthamii* (BACCARIN et al., 2015; BRONDANI et al., 2012).

De acordo com Alfenas et al. (2009), o rejuvenescimento ou pelo menos o restabelecimento da competência ao enraizamento é obtido, geralmente, após 10-12 subcultivos. Recomendação similar foi feita por Xavier, Otoni e Penchel (2007), para os quais um mínimo de 12 subcultivos devem ser feitos, quando o objetivo é o rejuvenescimento de clones de eucalipto selecionados na idade adulta e a melhoria do potencial de enraizamento. No presente estudo foram apresentados altos índices de multiplicação em explantes de *E. microcorys* no 11º subcultivo.

### 3.3 Alongamento das brotações

Durante a etapa de alongamento de brotações *in vitro*, é almejavél obter brotos de tamanho adequado no menor intervalo de tempo. A análise de variância dos dados revelou efeito significativo dos fito-reguladores de crescimento com número de brotações e o número de brotações alongadas (>1cm) dos explantes de *E. microcorys* durante a fase de alongamento (Tabela 7).

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para o total de brotações e o número de brotações alongadas (>1cm) de explantes de *Eucalyptus microcorys* em relação aos tratamentos testados na fase de alongamento aos 120 dias.

Causas da variação	GL	Quadrados médios	
		Número de brotações	Brotos alongados (> 1cm)
Fito-reguladores	7	0,2363*	0,0369*
Resíduo	56	0,0096	0,0014
Média	-	70,25	13,35
CV (%)	-	10,03	8,77

<sup>ns</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. \* Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. Dados transformados por  $[(n+0,5)/100]^{0,5}$ , onde n = dado amostrado. GL = grau de liberdade, CV = coeficiente de variação.

Fonte: O Autor (2020).

O número de brotações e o número de brotações alongadas (>1cm) dos explantes de *E. microcorys* foram contabilizadas aos 120 dias na fase de alongamento. No que concerne ao total de brotações, as maiores médias foram observadas com 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, variando apenas as concentrações de AIB, resultando em médias entre 90 à 112 brotações totais. As suplementações no meio WPM com 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA contribuíram na diminuição dos valores médios do total de brotações em relação às com 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA (Tabela 8). Os menores valores médios foram observados utilizando o fito-regulador ANA, apresentando explantes com aproximadamente 40 brotações, sendo esses estatisticamente inferiores aos demais (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores médios do número de brotações e brotos alongados (>1cm) de explantes oriundos de indivíduo adulto de *Eucalyptus microcorys* em relação as combinações de fito-reguladores de crescimento ANA e AIB, aos 120 dias.

Tratamento	ANA	AIB	Número de brotações	Brotos alongados (> 1cm)
	mg.L <sup>-1</sup>			
1	0	1	40,00 (±5,78) c	6,75 (±0,80) c
2	0	2	39,25 (±4,60) c	7,25 (±1,03) c
3	1	0	104,25 (±5,41) a	18,35 (±0,56) a
4	1	1	112,00 (±9,03) a	18,65 (±0,98) a
5	1	2	90,00 ((±6,57) ab	13,75 (±1,50) b
6	2	0	69,00 (±5,75) b	12,75 (±1,00) b
7	2	1	67,90 (±2,36) b	11,50 (±0,68) b
8	2	2	70,00 (±4,27) b	12,00 (±0,78) b
Média			70,03	13,77
CV(%)			10,03	8,77

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ( $p<0,05$ ). Dados apresentados como: média ± erro padrão. CV = coeficiente de variação.

Fonte: O Autor (2020).

No que diz respeito ao número de brotos alongados (>1cm), as maiores médias foram observadas nas suplementações com 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA + 1 mg.L<sup>-1</sup> de AIB (Figura 1G), sendo ambas estatisticamente superiores aos demais, correspondendo a 18,5 brotos alongados por explante. Assim como no número de brotações totais, as menores médias no número de brotos alongados (>1cm) resultaram da suplementação do fito-regulador ANA no meio de cultura, apresentando valores menores que oito brotos alongados por explante (Tabela 8).

No presente estudo, optou-se por utilizar as auxinas no meio de alongamento, ao invés de giberelinas que são comumente empregadas nessa fase, pelo fato do material de origem apresentar alto nível de maturação, fazendo com que os estímulos desses fito-reguladores promovam juntamente com o alongamento das brotações um estímulo para a formação de raízes, garantindo assim maior sucesso para o resgate do material (SOUZA; PEREIRA, 2007; ROCHA et al., 2009; TRUEMAN; HUNG; WENDLING, 2018).

Porém, na literatura são encontradas recomendações utilizando as auxinas como fito-reguladores crescimento a fim de obter maiores números de brotações na fase de alongamento *in vitro*. Avaliando o alongamento de *Eucalyptus dunnii* sob diferentes concentrações de fito-reguladores, Navroski et al. (2014) recomendam o uso  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA no meio de cultura para o maior número de brotações alongadas. Em estudo com *E. benthamii* × *E. dunnii*, Brondani et al. (2009) apresentaram seus maiores resultados no número de brotações alongadas nos meios com concentrações entre  $0,25$  e  $0,75 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA e  $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP. O balanço entre auxinas e citocininas é recomendado em outros estudos para espécies do gênero *Eucalyptus*, como em *E. grandis* × *nitens* e *E. grandis* × *urophylla* (WATT, 2014), em *E. grandis* × *nitens* e *E. grandis* (NAKHOODA; WATT; MYCOCK, 2012) e em *E. grandis* (NAKHOODA; WATT; MYCOCK, 2011). Por meio das características avaliadas no presente estudo, a espécie *E. microcorys* apresentou as melhores médias na fase de alongamento utilizando  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA e  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA +  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB no meio de cultura.

### 3.4. Sobrevivência, enraizamento e aclimatização

Microestacas de *E. microcorys* foram avaliadas quanto sua sobrevivência e enraizamento (aos 45 dias da incubação no sistema de mini-estufim) e aclimatização (aos 20 dias após enraizamento), as quais apresentaram respostas significativas com os modelos de microtubetes, descritas por meio da análise de variância (Tabela 9).

A sobrevivência das microestacas de *E. microcorys* dispostas nos microtubetes 2 e 3 apresentaram as maiores porcentagens, sendo estatisticamente superiores as microestacas dispostas no modelo 1. Os resultados do enraizamento das microestacas seguiram proporcionalmente aos da sobrevivência, estando as maiores médias apresentadas nos microtubetes 2 e 3. A menor média resultou nas microestacas do modelo 1, com 6,67% de enraizamento (Tabela 10).

Tabela 9 - Resumo da análise de variância para a sobrevivência (SOB), enraizamento (ENR) e aclimatização (ACL) de microestacas de *Eucalyptus microcorys* em relação aos modelos de microtubetes.

Causas da variação	GL	Quadrados médios		
		SOB	ENR	ACL
Modelo dos microtubetes	2	0,0897*	0,0646*	0,0584*
Resíduo	42	0,0202	0,0184	0,0178
Média (%)	-	42,22	31,11	28,89
CV (%)	-	21,92	19,89	19,37

<sup>ns</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. \* Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. Dados transformados por  $[(n+0,5)/100]^{0,5}$ , onde n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação.

Fonte: O Autor (2020).

Tabela 10 - Porcentagem de sobrevivência, enraizamento e aclimatização de microestacas oriundas de indivíduo adulto de *Eucalyptus microcorys* em modelos de microtubetes.

Microtubetes	Sobrevivência	Enraizamento	Aclimatização
	%		
Modelo 1	13,33(±9,09) b	6,67(±6,67) b	6,67(±6,67) b
Modelo 2	53,33(±13,33) a	40,00(±13,09) ab	33,33(±12,60) ab
Modelo 3	58,90(±12,70) a	45,70(±12,92) a	45,70(±12,93) a
Média	42,22	31,11	28,89
CV (%)	21,92	19,89	19,37

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Dados apresentados como: média ± erro padrão. CV = coeficiente de variação.

Fonte: O Autor (2020).

Embora o enraizamento de microestacas possa ocorrer *in vitro* utilizando meio de cultura, estudos relatam a eficiência dessa etapa quando a mesma ocorre em ambiente *ex vitro* utilizando substrato, garantindo maior sucesso para a etapa de aclimatização, além da vantagem de não precisar utilizar fito-reguladores de crescimento, como por exemplo o AIB (BRONDANI et al., 2012; BRONDANI et al., 2018). O sistema de mini-estufim foi adotado por meio das vantagens destacadas em trabalhos de aclimatização de mudas, principalmente, de *Eucalyptus benthamii* relatados por Brondani et al. (2012) e Baccarin et al. (2015) e *Eucalyptus cloeziana* por Oliveira et al. (2015).

No geral, miniestacas de espécies de eucaliptos apresentam porcentagem de sobrevivência e enraizamento igual ou superior a 85% (ALMEIDA; XAVIER; DIAS, 2007; BORGES et al., 2011; BRONDANI et al., 2010a, b). Embora o enraizamento das microestacas

no presente estudo apresentaram resultados abaixo de 50%, na literatura existem diversos relatos sobre as diferenças do enraizamento adventício entre material juvenil e adulto, os quais podem variar de acordo com a condição fisiológica da árvore matriz e da idade ontogenética (BRONDANI et al., 2009, 2010a, 2012; WENDLING et al., 2013; HUNG; TRUEMAN, 2011; TRUEMAN; HUNG; WENDLING, 2018). No presente estudo, as microestacas foram provenientes de uma matriz com idade ontogenética avançada, com mais de 40 anos, o que pode ter contribuído para o menor percentual de enraizamento quando comparado com demais estudos na literatura.

Além disso, um grande número de mortalidade das microestacas de *E. microcorys* nos modelos de microtubetes resultaram do surgimento de microrganismos de natureza fúngica nos tecidos vegetais. As microestacas cultivadas nos microtubetes de menor dimensão (modelo 1) apresentaram as menores médias de sobrevivência e conseqüentemente a maior incidência de microrganismos fúngicos, sendo uma das possíveis causas a maior proximidade das microestacas à umidade presente no fundo do mini-estufim (Tabela 2).

Após a detecção do enraizamento, as microestacas foram transferidas para frascos de vidro vedados com papel filme (Figura 1H), realizando-se aberturas a cada dois dias. A aclimatização ocorreu aos 20 dias, sendo as microestacas dos modelos 2 e 3 (Figura 1J) as quais apresentaram as maiores médias, com valores médios superiores a 30%. O menor valor médio foi apresentado com o modelo 1 (Tabela 10).

Após 20 dias, as mudas foram transferidas para viveiro em casa de sombra. Os problemas relacionados às fases de enraizamento e aclimatização de microestacas advindos dos protocolos-padrões da micropropagação podem ser solucionados com o uso dos microtubetes. A principal diferença do uso dos microtubetes comparado com os métodos tradicionais de enraizamento e aclimatização está no aumento produtivo nessas duas etapas da micropropagação. Os ganhos produtivos estão relacionados ao maior percentual de pegamento das mudas transferidas das condições *in vitro* para *ex vitro*, por não haver a necessidade de remover as mudas enraizadas dos microtubetes para outro recipiente, garantindo assim menor estresse causado nas raízes das microestacas, e à redução do tempo operacional ao acondicionar as mudas ao recipiente final de produção em viveiro, pois os microtubetes se degradam ao longo do tempo.

Na figura 5 pode-se observar a diferença visual no crescimento das mudas de *E. microcorys* entre os modelos de microtubetes testados após 30 dias em casa de sombra, estando as maiores alturas da parte aérea decorrente nos modelos 2 e 3.

Figura 5 - Mudanças obtidas do resgate via micropropagação de indivíduo adulto de *Eucalyptus microcorys* aclimatizadas em casa de sombra após 30 dias, demonstrando a diferença no crescimento da parte aérea entre os três modelos de microtubetes. Barra = 1 cm.



Fonte: O Autor (2020).

Todos os modelos de microtubetes apresentaram desenho com estrias objetivando auxiliar no controle da umidade e aeração do substrato, na expansão das raízes, e na própria degradação dos mesmos durante a etapa posterior à aclimatização das mudas em viveiro. Uma das principais causas do menor crescimento em altura apresentada nas microestacas presentes no modelo 1, foi justamente a barreira criada do microtubete devido ao menor número de estrias, dificultando o crescimento e expansão do sistema radicular das microestacas.

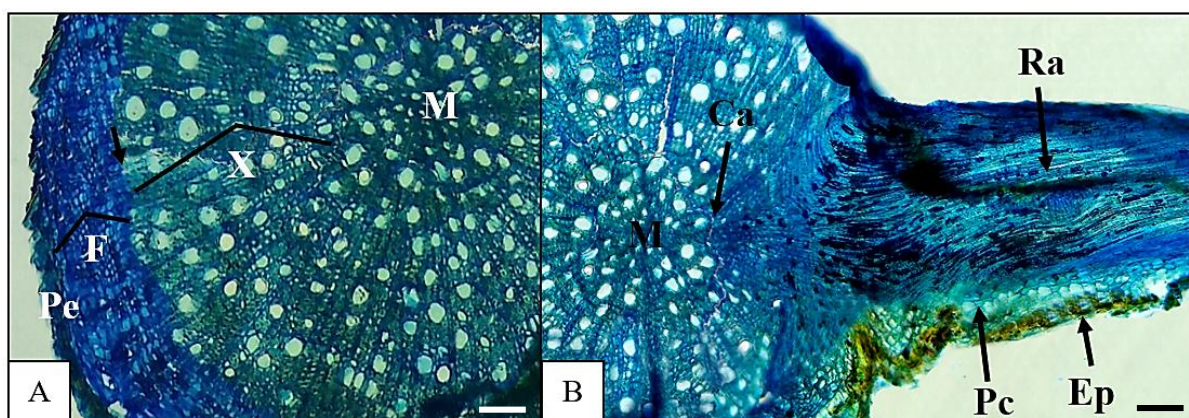
Ao final da aclimatização, pôde-se concluir o sucesso no uso dos microtubetes com a espécie florestal *E. microcorys*. O presente estudo teve como objetivo prescrever um protocolo de micropropagação até a fase de aclimatização, não sendo avaliadas as características de crescimentos das mudas em viveiro, como altura, diâmetro do coleto, massa seca da parte aérea e radicular, sendo importantes outros estudos a fim de verificar tais parâmetros de qualidade.

O protocolo de micropropagação foi adequado para a produção de microplantas de *E. microcorys* podendo ser utilizada para novos estudos da espécie ou mesmo como recomendação para a propagação clonal de outras espécies de eucalipto. Futuros projetos são idealizados para o processo de mecanização de mudas propagadas *in vitro* utilizando os microtubetes como ferramenta para otimização da produção em larga escala em biofábricas.

### 3.5. Análise histológica

Os cortes anatômicos realizados na região de inserção da microestaca com as raízes adventícias revelou a distribuição dos feixes vasculares formando um anel cilíndrico ao redor do caule (Figura 6A).

Figura 6 - Cortes anatômicos das microestacas aclimatizadas de *Eucalyptus microcorys*. (A) Caule demonstrando a organização dos feixes vasculares. Barra = 100  $\mu$ m; (B) Região da conexão vascular estabelecida entre a raiz adventícia e o câmbio do caule. Barra = 100  $\mu$ m.



Pe = Periderme; F = Floema secundário; (seta) = Faixa cambial; X = Xilema secundário; M = Médula; Ca = Câmbio vascular; Pc = Parênquima cortical; Ep = Epiderme; Ra = Raiz adventícia.  
Fonte: O Autor (2020).

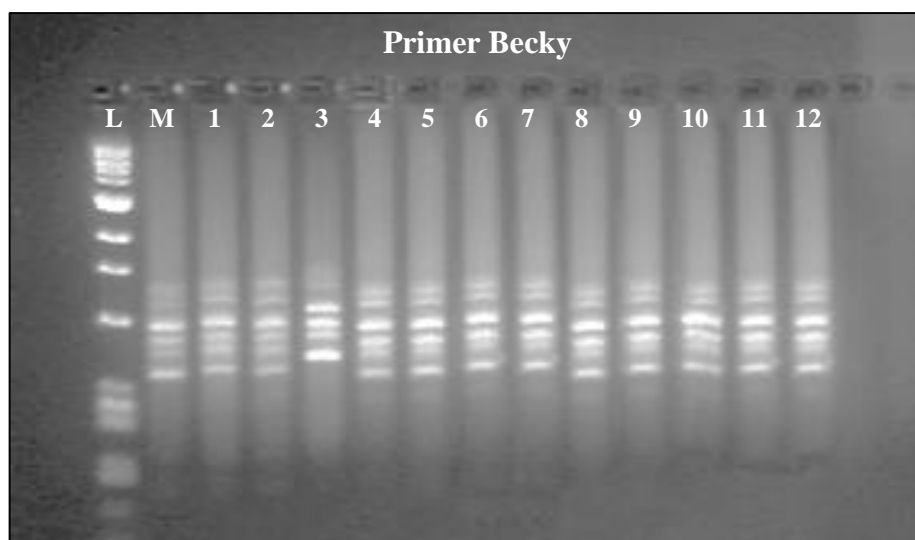
A figura 6B elucida a conexão vascular estabelecida entre a raiz adventícia e o câmbio do caule. Ressalta-se que, uma vez estabelecida essa conexão, a planta deixa de depender somente das reservas nutricionais da parte aérea e passa a ser suprida também pelos elementos químicos assimilados pela raiz.

### 3.6. Fidelidade genética

O teste de fidelidade genética em plantas micropropagadas *in vitro* é crucial para identificar corretamente os clones multiplicados e também para garantir o controle da qualidade dos mesmos, sendo possível ocorrer variações somaclonais durante o cultivo prolongado *in vitro*, podendo acarretar descaracterização da clonagem da planta de interesse (SHEN et al., 2007). Os perfis das bandas dos marcadores ISSR utilizados no presente estudo indicaram que todos os indivíduos resgatados de *E. microcorys* foram semelhantes às da planta matriz,

garantindo assim a natureza clonal de todos os indivíduos. Vale ressaltar a diferença de mobilidade apresentada nas bandas formadas em alguns indivíduos presente no gel da eletroforese, sendo um comportamento normal durante a corrida das amostras (Figura 7).

Figura 7 - Perfil da eletroforese do primer Becky em indivíduos resgatados via micropropagação de de *E. microcorys*.



L = Marcador Ladder 1Kb Plus; M = Matriz de *E. microcorys*; 1 a 12 = indivíduos de resgatados via micropropagação de *E. microcorys*.

Fonte: O Autor (2020).

Do total dos 20 primers utilizados, 18 resultaram na amplificação do DNA dos indivíduos de *E. microcorys*, apresentando primers com no mínimo três e no máximo oito bandas. O tamanho dos marcadores amplificados variou de 200 a 2.500 pb, com base no marcador padrão para comparação.

Na literatura são encontrados estudos de fidelidade genética utilizando marcadores ISSR para testar a integridade de clones de mudas de *Eucalyptus* via micropropagação, como em *Eucalyptus tereticornis* (AGGARWAL; KUMAR; REDDY, 2010), *Eucalyptus globulus* (OLIVEIRA et al., 2017) e *Eucalyptus camaldulensis* (SHANTHI et al., 2015). No presente estudo, as mudas aclimatizadas resultaram em 100% de uniformidade genética com a planta matriz, demonstrando estabilidade do genoma com as manipulações ocorridas durante as fases e o tempo de cultivo *in vitro*.

Vale ressaltar que mesmo os resultados tendo demonstrado que não houve diversidade genética entre os indivíduos propagados de *E. microcorys*, possivelmente exista uma diversidade epigenética. Nas últimas décadas estudos vem sendo realizados a fim de entender



melhor os diferentes mecanismos genéticos e controlar dificuldades na propagação em espécies vegetais, sendo uma delas o entendimento a respeito das modificações epigenéticas, as quais podem ocorrer em resposta às variações ambientais acarretando em mudanças fenotípicas nos indivíduos propagados sem a ocorrência de alterações na sequência do DNA (ELWELL et al., 2011; RASMANN et al., 2012; VIVAS et al., 2013; VIVAS et al., 2017). Desse modo, mesmo sendo um clone, diferentes indivíduos podem apresentar diferentes níveis de expressão de acordo com o ambiente de implantação (VIVAS et al., 2019; WANG et al., 2020). Assim, existe uma perspectiva no aumento dos estudos nessa área devido a importância das respostas das plantas às mudanças no ambiente, bem como para o aproveitamento total do potencial produtivo por meio de programas de melhoramento, assim como garantir um maior controle na homogeneidade dos plantios clonais.

#### 4. CONCLUSÕES

O protocolo via micropropagação utilizando brotos epícorímicos apresentou aptidão para o cultivo *in vitro* com estabelecimento de 40,55%, e multiplicação de 820 explantes até o 11º subcultivo.

Os explantes apresentaram os melhores resultados na fase de alongamento com 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e com 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA + 1 mg.L<sup>-1</sup> de AIB.

Os modelos de microtubetes M2 (volume = 2,60 cm<sup>3</sup>) e M3 (volume = 5,30 cm<sup>3</sup>), destacaram-se na fase de enraizamento e aclimatização das microestacas, formando raízes adventícias normais e de conexão direta com o câmbio vascular.

Por meio da técnica de ISSR, confirmou-se a clonagem das plantas cultivadas *in vitro* por 490.

#### 5. REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa: Ed. UFV, 2ª edição, 2009. 500 p.

AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Shoot organogenesis from elite plants of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Boston, v. 102, n. 1, p. 45-52, 2010.

ALMEIDA, F. D.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M. Propagação vegetativa de árvores selecionadas de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell por estaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 445-453, 2007.

ARYA, I. D. et al. Micropropagation of superior *Eucalyptus* hybrids FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn × *E. tereticornis* Sm) and FRI14 (*Eucalyptus torelliana* F. V. Muell x *E. citriodora* Hook): a commercial multiplication and field evaluation. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 8, n. 21, p. 5718-5726, 2009.

BACCARIN, F. J. B. et al. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, Dordrecht, v. 46, p. 465-483, 2015.

BISHT, P. et al. Micropropagation of newly produced F1 hybrid of *Eucalyptus* (*E. tereticornis* Sm. × *E. camaldulensis* Dehn. Southern Form). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.48, n.2, p.104-108, 1999.

BORGES, S. R. et al. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 3, p.425-434, 2011.

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

BRONDANI, G. E. et al. Aplicação de IBA para o enraizamento de miniestacas de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage × *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p.667-674, 2010a.

BRONDANI, G. E. et al. Miniestaquia de *Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*: (II) sobrevivência e enraizamento de miniestacas em função das coletas e estações do ano. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 3, p.453-465, 2010b.

BRONDANI, G. E. et al. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 4, p. 655-663, 2011.

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

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**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 2, p. 2409-2423, 2018.

CALONEGO, F. W. et al. Behavior of the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum* on thermally-modified *Eucalyptus grandis* wood. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 20, n. 3, p. 417-423, 2013.

DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture: essential methods**. Singapore: Wiley-Blackwell, 1ª edition, 2010. 358 p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, p. 13-15, 1990.

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

ELWELL, A. L. et al. Separating parental environment from seed size effects on next generation growth and development in *Arabidopsis*. **Plant, Cell & Environment**, Glasgow, v. 34, n. 2, p. 291-301, 2011.

FERREIRA, M. Escolha de espécies de eucalipto. **Circular Técnica - IPEF**, Piracicaba, v.47, p.1-30, 1979.

HARTMANN, H.T. et al. **Hartmann & Kester's Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Ed. Prentice Hall, 8ª edition, 2011. 928 p.

HUNG, C. D.; TRUEMAN, S. J. *In vitro* propagation of the African mahogany *Khaya senegalensis*. **New Forests**, Dordrecht, v. 42, n. 1, p. 117-130, 2011.

IBÁ – Industria Brasileira de Árvores. **Relatório Ibá 2019: ano base 2018**. São Paulo: Pöyry Consultoria em Gestão e Negócios Ltda, 2019. 90p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York and London: McGraw-Hill Book Company, 1ª edition, 1940. 487p.

JOSHI, I. et al. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. × *E. grandis* Hill ex Maiden). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.52, n.3-4, p.110-113, 2003.

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

MOURA, V. P. G. et al. **Avaliação de espécies e procedências de *Eucalyptus* em Minas Gerais e Espírito Santo: resultados parciais**. Embrapa CPAC, Boletim de pesquisa 1 (INFOTECA-E), Brasília, 1980. 104p.

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

NAKHOODA, M.; WATT, M. P.; MYCOCK, D. Auxin stability and accumulation during *in vitro* shoot morphogenesis influences subsequent root induction and development in *Eucalyptus grandis*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 65, n. 2, p. 263-271, 2011.

NAKHOODA, M.; WATT, M. P.; MYCOCK, D. The properties and interaction of auxins and cytokinins influence rooting of shoot cultures of *Eucalyptus*. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 11, n. 100, p. 16568-16578, 2012.

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, 2014.

- NEUMANN, K.H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant cell and tissue culture: a tool in biotechnology**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. 333 p.
- 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, 2013.
- OLIVEIRA, F. N. et al. Seasonal influence on the essential oil of *Eucalyptus microcorys*. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 9, n. 4, p. 575-580, 2014.
- OLIVEIRA, L. S. et al. Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. **Australian Forestry**, Yarralumla, v. 78, n. 4, p. 219-231, 2015.
- 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.
- PAIVA, J. G. A. et al. Vernix vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 02, p. 257-264, 2006.
- PAIVA, H. N. de; GOMES, J. M. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Viçosa: UFV, 1ª edição, 2011. 52 p. (Série Didática).
- PIRES, P.P.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. Ácido indolbutírico e ortotropismo na miniestaquia de *Araucaria angustifolia*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.37, n. 3, p. 393-399, 2013.
- PRYOR, L. D. **Aspectos da cultura do eucalipto no Brasil**. IPEF, Piracicaba, n. 2/3, p. 53-59, 1971.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing, reference index version 3.6.1**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019.
- RASMANN, S. et al. Herbivory in the previous generation primes plants for enhanced insect resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 158, n. 2, p. 854-863, 2012.
- REMADE – Revista de Madeira. **Descrição de algumas espécies de eucalipto**. Curitiba, Ed. Porthus Comunicação, v. 75. Agosto de 2003. Disponível em: <<http://www.remade.com.br/revista-madeira>>. Acesso em: 14 jan. 2018.
- ROCHA, P, S, G. et al. Multiplicação alongamento *in vitro* do porta-enxerto de Prunus. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 1, p. 69-74, 2009.
- SHANTHI, K. et al. Micropropagation of *Eucalyptus camaldulensis* for the production of rejuvenated stock plants for microcuttings propagation and genetic fidelity assessment. **New Forests**, Dordrecht, v. 46, n. 3, p. 357-371, 2015.
- SHARMA, S. K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**, Germany, v. 19, n. 5, p. 511-518, 2000.
- SHEN, X. et al. Assessment of somaclonal variation in *Dieffenbachia* plants regenerated through indirect shoot organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Boston, v. 91, p. 21-27, 2007.

- SOUZA, A. P., DELLA LUCIA, R. M., RESENDE, G. C. Estudo da densidade básica da madeira de *Eucalyptus microcorys* F. Muell, cultivado na região de Dionísio, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 3, n. 1, p. 16-27, 1979.
- SOUZA, A.V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.
- TRUEMAN, S. J.; HUNG, C. D.; WENDLING, I. Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, Switzerland, v. 9, n. 2, p. 1-42, 2018.
- VIVAS, M. et al. Environmental maternal effects mediate the resistance of *Maritime pine* to biotic stress. **PloS One**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. 1-8, 2013.
- VIVAS, M. et al. Maternal effects on phenotype, resistance and the structuring of fungal communities in *Eucalyptus grandis*. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 140, p. 120-127, 2017.
- VIVAS, M. et al. Maternal environment regulates morphological and physiological traits in *Eucalyptus grandis*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 432, p. 631-636, 2019.
- WANG, M. et al. Correlations between genetic, epigenetic and phenotypic variation of an introduced clonal herb. **Heredity**, London, v. 124, n. 1, p. 146-155, 2020.
- WATT, M. P. Genotypic-unspecific protocols for the commercial micropropagation of *Eucalyptus grandis* × *E. nitens* and *E. grandis* × *E. urophylla*. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 38, n. 1, p. 125-133, 2014.
- WENDLING, I. et al. Vegetative propagation of adult *Ilex paraguariensis* trees through epicormic shoots. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 1, p. 117-125, 2013.
- WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry—part I: concepts, regulation and consequences of phase change. **New Forests**, Dordrecht, v. 45, n. 4, p. 449-471, 2014.
- XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. cap. 3, p. 55-74.
- XAVIER, A.; SILVA, R. L. Evolução da silvicultura clonal de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**, San Pedro de Montes de Oca, v. 34, n. 1, p. 93-98, 2010.

**CAPÍTULO 2:**  
**MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus microcorys* POR MEIO DA**  
**ORGANOGENESE INDIRETA**

**RESUMO**

O presente estudo teve por objetivo desenvolver um protocolo de micropropagação por meio da organogênese indireta em *Eucalyptus microcorys*, avaliando a interação dos fito-reguladores de crescimento (TDZ e ANA) em tecidos juvenis (hipocótilo e cotilédone). Os explantes foram resultantes de tecidos juvenis de plântulas *in vitro* de duas matrizes de *E. microcorys*. Tecidos do hipocótilo e cotilédone foram seccionados, inoculados em meio WPM e submetidos as concentrações de 0, 1, 2 e 3 mg.L<sup>-1</sup> de thidiazuron (TDZ) e 0, 2 e 4 mg.L<sup>-1</sup> de ácido naftalenoacético (ANA). O experimento foi conduzido em arranjo fatorial (2×12), avaliando a interação de dois tipos de tecidos com 12 combinações de fito-reguladores de crescimento, em quatro repetições contendo cinco explantes por recipiente. Na fase de calogênese os explantes foram mantidos em local com ausência de luz por 60 dias, sendo avaliadas as porcentagens de calos formados nos tecidos. Os explantes apresentando calogênese foram transferidos para o meio de regeneração de gemas (1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) durante 120 dias, e posteriormente para o meio de alongamento de brotações (0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) por mais 120 dias. Nessas fases foram avaliadas a porcentagem de regeneração de gemas, o número de brotações e o número de brotos alongados (>1cm). A fase de enraizamento ocorreu em condições *in vitro* testando sete modelos de microtubetes em sistema de mini-estufim, sendo avaliadas as porcentagens de enraizamento adventício e de aclimatização das microestacas. Pôde-se verificar adequação dos tecidos e fito-reguladores de crescimento para indução a calogênese, correspondendo média de 81,38% de formação de calos nos explantes. Na fase de indução de gemas, os explantes de origem do cotilédone apresentaram os maiores valores de regeneração nos meios de indução T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ) e T10 (3 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ), com 73,30% e 40% de regeneração, enquanto os explantes do hipocótilo apresentaram as maiores médias nos meios T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ) e T7 (2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ) resultando em 80% e 66,60%. Na fase de alongamento, os explantes oriundos do tecido do hipocótilo apresentaram os melhores resultados para as características avaliadas, destacando-se os tratamentos T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ), T6 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> de ANA), T9 (2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) e T11 (3 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA). Com relação a fase de enraizamento e aclimatização, o uso dos microtubetes dos modelos 4 (volume = 2,60 cm<sup>3</sup>), 6 (volume = 5,30 cm<sup>3</sup>) e 7 (volume = 4,90 cm<sup>3</sup>) apresentaram os melhores resultados. Amostras da região de inserção da microestaca com as raízes adventícias foram coletadas para análises histológicas, sendo verificado o enraizamento foi bem-sucedido, resultando em raízes adventícias normais e conexão direta com o câmbio vascular. Para avaliar a diversidade genética foram utilizados 16 marcadores ISSR, os quais detectaram baixa variabilidade nas microestacas aclimatizadas. O protocolo de micropropagação por meio da organogênese indireta foi eficiente para a produção de microplantas de *E. microcorys*, apresentando os melhores resultados nos explantes do tecido do hipocótilo cultivados em T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ), T6 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) ou T11 (3 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA).

**Palavras-chave:** Eucalipto. Calogênese. Fito-reguladores de crescimento. Enraizamento adventício. Microtubetes.

## MICROPROPAGATION OF *Eucalyptus microcorys* BY INDIRECT ORGANOGENESIS

### ABSTRACT

The present study developed a micropropagation protocol through indirect organogenesis in *Eucalyptus microcorys*, to evaluate the interaction of plant growth regulators (TDZ and NAA) in juvenile tissues (i.e., hypocotyl and cotyledon). The explants resulted from juvenile tissue from *in vitro* seedlings of two *E. microcorys* donor plants. Hypocotyl and cotyledon tissues were sectioned, inoculated in WPM medium and submitted to concentrations of 0, 1, 2 and 3 mg.L<sup>-1</sup> of thidiazuron (TDZ) and 0, 2 and 4 mg.L<sup>-1</sup> of naphthalenoacetic acid (NAA). The experiment was conducted in a factorial arrangement (2×12) to evaluate the interaction of two types of tissues with 12 combinations of plant growth regulators, in four replications comprising five explants per container. In the callogenesis phase, the explants were kept in the dark for 60 days, and the percentages of calluses formed in the tissues were evaluated. The explants presenting callogenesis were transferred to the bud regeneration medium (1 mg.L<sup>-1</sup> BAP and 0.05 mg.L<sup>-1</sup> NAA) for 120 days, and subsequently to the bud lengthening medium (0.05 mg.L<sup>-1</sup> BAP and 1 mg.L<sup>-1</sup> NAA) for a further 120 days. In these phases, the percentage of bud regeneration, the number of shoots and the number of elongated shoots (>1cm) were evaluated. Adventitious rooting phase occurred in *in vitro* conditions using elongated microshoots (>1cm), in which seven models of microvessels were tested in a mini-stove system, and the percentages of adventitious rooting and acclimatization of the microcutting were evaluated. The tissue and plant growth regulators were proven adequate to induce callogenesis, averaging 81.38% of callus formation in explants. In the bud induction phase, the explants of cotyledon origin had the highest regeneration values in the T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> TDZ) and T10 (3 mg.L<sup>-1</sup> TDZ) induction medium, with 73.30% and 40% of regeneration, while the hypocotyl explants presented the highest averages on T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> TDZ) and T7 (2 mg.L<sup>-1</sup> TDZ) medium, resulting in 80% and 66.60%. In the elongating phase, the explants from the hypocotyl tissue presented the best results the evaluated characteristics, especially in treatments T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> TDZ), T6 (1 mg.L<sup>-1</sup> TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> NAA), T9 (2 mg.L<sup>-1</sup> TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> NAA) and T11 (3 mg.L<sup>-1</sup> TDZ + 2 mg.L<sup>-1</sup> NAA). The microvessels of models 4 (volume = 2.60 cm<sup>3</sup>), 6 (volume = 5.30 cm<sup>3</sup>) and 7 (volume = 4.90 cm<sup>3</sup>) presented the best results. Samples of the microcutting insertion region including the adventitious roots were collected for histological analyses, and it was verified that the rooting was successful, resulting in normal adventitious roots with direct connection to the vascular cambium. To evaluate the genetic diversity of the materials, 16 ISSR markers were used, which revealed low genetic variability in acclimatized microcutting. The micropropagation protocol through indirect organogenesis was efficient for the production of *E. microcorys* microplants. The tissues of the hypocotyl cultivated in T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> TDZ), T6 (1 mg.L<sup>-1</sup> TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> NAA) or with TPM (1 mg.L<sup>-1</sup> TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> NAA) or T11 (3 mg.L<sup>-1</sup> TDZ + 2 mg.L<sup>-1</sup> NAA) presented the best results.

**Keywords:** Eucalypts. Callogenesis. Plant growth regulators. Adventitious rooting. Microvessels.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a maior parte dos produtos de origem florestal são oriundos dos plantios de espécies do gênero *Eucalyptus*, sendo de importância para os setores econômico, social e ambiental. No ano de 2018, o setor brasileiro de florestas apresentou crescimento de 13,1% com relação ao ano anterior, alcançando receita setorial de R\$ 86,6 bilhões (IBÁ, 2019). O constante crescimento da cultura de eucalipto decorre principalmente das suas vantagens advindas da clonagem e do melhoramento genético, a qual se fundamenta na seleção de espécies e indivíduos com características determinadas por fatores genéticos e na evolução das ferramentas para obter produtos florestais de maior qualidade para diversos ramos industriais (XAVIER; SILVA, 2010; IBÁ, 2019).

Contudo, testes de progênies e procedências são importantes ferramentas para selecionar matrizes com características de interesse ao produto final, sendo raro encontrar plantios com idades avançadas. Desde 1974, alguns estudos com espécies do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia* vêm sendo realizados com indivíduos pertencentes a um plantio experimental na cidade de Lavras, estado de Minas Gerais, sendo mantido até os dias atuais pela Universidade Federal de Lavras (UFLA) (MOURA et al., 1980). Dentre as espécies desse povoamento, encontra-se o *Eucalyptus microcorys* F. Muell, o qual possui características que favorecem suas aplicações silviculturais, tais como resistência moderada a geadas, susceptibilidade à deficiência hídrica, tolerância ao fogo, e boa capacidade de regeneração pela brotação de cepas (FERREIRA, 1979; REMADE, 2003; CALONEGO et al., 2013).

O *E. microcorys* tem sido pouco implantado para a composição de florestas no País como visto em outras espécies do gênero, apresentando poucos relatos científicos, sendo observados apenas estudos quanto aos seus aspectos adaptativos e de utilização madeireira (OLIVEIRA et al., 2014; SOUZA; DELLA LUCIA; RESENDE, 1979). Dessa forma, o presente estudo teve a seguinte pergunta de pesquisa: Tecidos juvenis de plântulas de sementes germinadas *in vitro* são capazes de propagar vegetativamente mudas de *E. microcorys* por meio da técnica de micropropagação da organogênese indireta?

Associada às técnicas de propagação clonal, a biotecnologia é uma ferramenta que contribui efetivamente para avanços aos programas de melhoramento das espécies florestais, fornecendo metodologias na produção massiva de mudas por meio da clonagem de árvores superiores. As vias adotadas na obtenção de mudas de espécies do gênero *Eucalyptus* baseia-se nas técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, tais como por meio da organogênese direta e indireta,



sendo a segunda caracterizada quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calo (BARRUETO CID, 2010).

Com relação a organogênese indireta, uma das principais vantagens como ferramenta para a regeneração de plantas é o seu potencial de produzir grandes número na multiplicação do material, além de ser uma alternativa para espécies que apresentam dificuldades de reprodução natural, onde os métodos convencionais de propagação clonal não se tornam viáveis (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013). A organogênese indireta também atende aos trabalhos de transformação genética com objetivo de inserir caracteres que possam promover propriedades de interesse econômico, não apenas à produtividade, mas também à qualidade de madeira, resistência a herbicidas, pragas e doenças, entre outras (GIRIJASHANKAR, 2012; SILVA et al., 2013).

Na literatura são encontrados diversos estudos de micropropagação em *Eucalyptus* utilizando a técnica da micropropagação por meio da organogênese indireta. A regeneração *in vitro* de espécies de *Eucalyptus* por meio da organogênese é relatada para espécies de *E. tereticornis* (AGGARWAL; KUMAR; REDDY, 2010), *E. grandis* (ARENHART; ZAFFARI, 2008; BRONDANI et al., 2012a; PEREIRA; MONTEIRO; ABREU, 2013), *E. grandis* × *E. urophylla* (ALCANTARA; BESPALHOK FILHO; QUOIRIN, 2011), *E. saligna* (DIBAX et al., 2010a; SILVA et al., 2015), *E. globulus* (NUGENT et al., 2001), *E. camaldulensis* (GIRIJASHANKAR, 2012), *E. benthamii* × *E. dunnii* (OLIVEIRA-CAUDURO et al., 2014), *E. gunnii* (HERVÉ et al., 2001), *E. cloeziana* (OLIVEIRA et al., 2015).

Mesmo com vários estudos com espécies do gênero *Eucalyptus*, observa-se um comportamento distinto durante as etapas da micropropagação, desde a fase inicial utilizando concentrações específicas de fito-reguladores de crescimento, até alcançar o sucesso na fase de enraizamento e aclimatização, sendo fundamental a formulação de protocolos para a correta recomendação das técnicas de micropropagação de acordo com a espécie estudada. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi desenvolver um protocolo efetivo de micropropagação por meio da organogênese indireta em *E. microcorys*, avaliando as interações dos fito-reguladores de crescimento thidiazuron e ácido naftalenoacético em tecidos juvenis do hipocótilo e cotilédone.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Caracterização geral

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultivo *In vitro* de Espécies Florestais, situado no Departamento de Ciências Florestais e no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Medicinais, situado no Departamento de Agricultura. A caracterização molecular foi realizada no Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas, situado no Departamento de Ciências Florestais, as análises histológicas dos tecidos vegetais foram conduzidas no Laboratório de Anatomia Vegetal, situado no Departamento de Biologia. Todos os laboratórios são pertencentes à Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG.

### 2.2. Origem do material vegetal

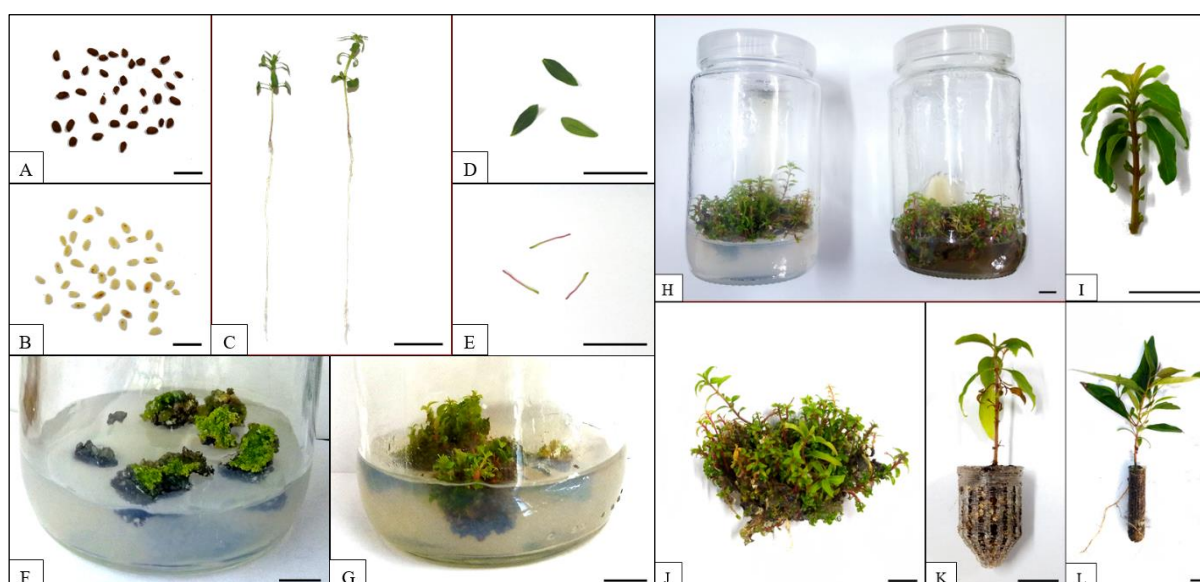
Explantos foram provenientes de plântulas de *E. microcorys* de germinações *in vitro*. As sementes foram coletadas de duas matrizes localizadas no Viveiro Florestal da Universidade Federal de Lavras (21°22'75" S, 44°96'98" W), no município de Lavras-MG, as quais fazem parte de um povoamento implantado no ano de 1974 contendo diferentes procedências de *Eucalyptus* e *Corymbia* (MOURA et al., 1980).

### 2.3. Desinfestação e germinação *in vitro*

O processo de assepsia se iniciou com a lavagem das sementes em água corrente por cinco minutos, e posteriormente desinfestadas utilizando hipoclorito de sódio - NaOCl (2,0-2,5% de cloro ativo, v/v) com adição de três gotas de detergente (0,05 mL) durante 15 minutos sob agitação.

Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada e autoclavada, em câmara de fluxo laminar, mediante a inoculação em meio de cultura *in vitro*. As sementes selecionadas para o cultivo foram aquelas que apresentarem estado de turgência e coloração branca (Figura 1B). As sementes foram inoculadas *in vitro* em tubos de ensaio de vidro (2×15 cm) contendo 10 mL de meio de cultura constituído apenas com água destilada e ágar. A germinação ocorreu em 12 dias e o estabelecimento do material aos 30 dias após a inoculação *in vitro* (Figura 1C).

Figura 1 - Detalhe das fases da organogênese indireta de *Eucalyptus microcorys*. (A e B) sementes utilizadas para germinação *in vitro* com detalhe a (B) coloração branca após a assepsia em NaOCl; (C) Plântulas *in vitro* após 30 dias da inoculação; (D e E) Cotilédones e hipocótilo utilizados como fontes de explantes para a cultura calogênica; (F) Explantes com calos formados inicializando a fase de regeneração de gemas; (G) Calos apresentando regeneração de brotações adventícias *in vitro* no meio de regeneração; (H) Explantes na fase de alongamento destacando-se o nível de oxidação no meio de cultura devido ao grande volume de biomassa nos frascos; (I) Padrão das brotações coletadas para enraizamento *in vitro*; (J) Calo regenerado apresentando brotações alongadas ao 4º subcultivo (120 dias); (K) Enraizamento *in vitro* de microestaca no microtubete após 45 dias da fase de enraizamento; (L) Microestaca aclimatizada com sistema radicial formado, após 30 dias da fase de aclimatização. Barras = 1 cm.



Fonte: O Autor (2020).

#### 2.4. Preparo do meio de cultura e condições *in vitro* dos experimentos

O meio de cultura foi constituído por água destilada, 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar, 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>/342,30 g) e pH ajustado para 5,8. O pH do meio de cultura foi ajustado utilizando HCl 0,1M e NaOH 0,1M antes da adição do ágar e, em seguida, o meio foi autoclavada a 121°C (~1,0 kgf.cm<sup>-2</sup>) por 20 minutos. Antes do meio de cultura ser autoclavado, foram adicionados os fito-reguladores de crescimento das plantas. Os explantes foram cultivados em sala de

crescimento com temperatura de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), fotoperíodo de 16 horas e intensidade de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## 2.5. Cultura calogênica

Segmentos do hipocótilo medindo 0,5 cm de comprimento, e cotilédones com o pecíolo, foram inoculados em frascos circulares de vidro (6×7 cm) contendo 40 mL com meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) (Tabela A – Anexos), suplementado com diferentes combinações e concentrações de fito-reguladores de crescimento, sendo eles o thidiazuron (TDZ) e o ácido naftalenoacético (ANA) (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição das combinações de fito-reguladores de crescimentos empregados na cultura calogênica em explantes de *Eucalyptus microcorys* inoculados *in vitro*.

Tratamento	TDZ (mg.L <sup>-1</sup> )	ANA (mg.L <sup>-1</sup> )
1	0	0
2	0	2
3	0	4
4	1	0
5	1	2
6	1	4
7	2	0
8	2	2
9	2	4
10	3	0
11	3	2
12	3	4

TDZ: Thidiazuron; ANA: Ácido naftalenoacético.

Fonte: O Autor (2020).

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento na ausência de luminosidade por 60 dias, com subcultivo aos 30 dias. Cada tratamento foi composto por três repetições, contendo cinco explante por frasco de vidro, os quais foram organizados em um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2×12), avaliando a interação de dois tipos de tecidos e 12 combinações de fito-reguladores de crescimento. Após os 60 dias da aplicação dos tratamentos foi avaliada a porcentagem de calogênese dos tecidos.

## 2.6. Regeneração de gemas adventícias

Os explantes resultantes da cultura calogênica foram transferidos para o meio de regeneração de gemas adventícias, constituído pelo meio de cultura WPM suplementado com 1 mg.L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP) e 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. Estes foram mantidos em frascos circulares de vidro (6×7 cm) contendo 40 mL do meio de cultura, e subcultivos a cada 30 dias.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°C (±1°C), fotoperíodo de 16 horas e intensidade de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Os tratamentos constituídos pelas culturas calogênicas (tipo de explante e combinações de fito-reguladores de crescimento) foram avaliados após 90 dias, sendo contabilizados as porcentagens de explantes com gemas adventícias induzidas.

## 2.7. Alongamento de brotações

Os explantes oriundos da fase de regeneração de gemas adventícias, com 3 a 5 iniciações de brotações foram transferidos para meio de cultura WPM suplementado com 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. Estes foram inoculados em frascos circulares de vidro (6×7 cm) contendo 40 mL do meio de cultura, com subcultivos realizados a cada 30 dias.

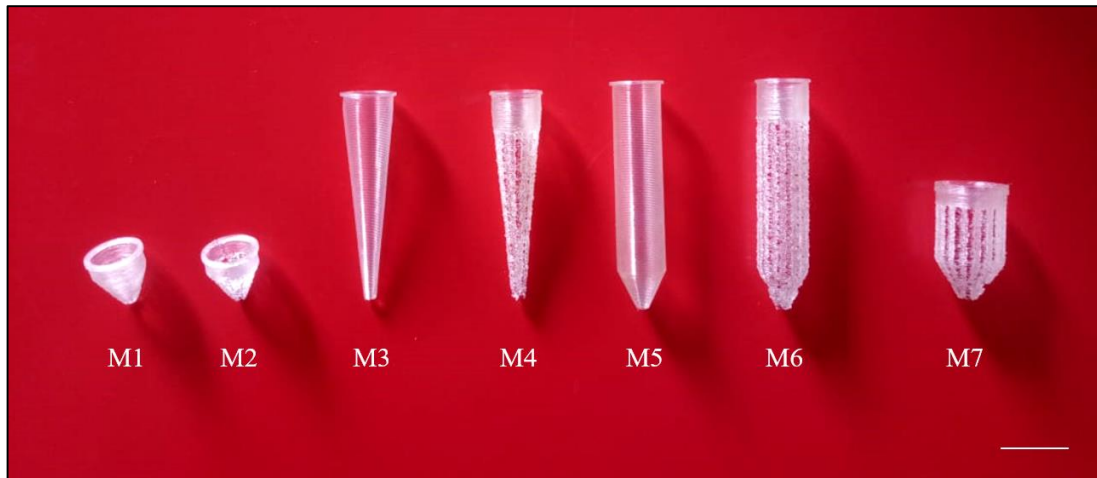
Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°C (±1°C), fotoperíodo de 16 horas e intensidade de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Os tratamentos constituídos pelas culturas calogênicas (tipo de explante e fito-reguladores) foram avaliados após 90 dias, sendo contabilizados o total de brotações e as brotações alongadas (>1cm) dos explantes.

## 2.8. Enraizamento e aclimatização

As microestacas possuindo comprimento superior a 1 cm foram coletadas e transplantadas em microtubetes *in vitro*, com o auxílio do sistema em mini-estufim (BRONDANI et al., 2012b; BRONDANI et al., 2018).

Sete modelos de microtubetes foram utilizados na fase de enraizamento. Os microtubetes foram produzidos em impressora 3D (Orion Delta) utilizando como material o polímero PLA (poli(ácido láctico)), que nada mais é que um poliéster termoplástico feito com ácido láctico a partir de materiais de origem natural (amido de milho, mandioca, beterraba, cana-de-açúcar) e que apresenta biodegradabilidade (Figura 2).

Figura 2 - Modelos dos microtubetes utilizados na fase de enraizamento e aclimatização de microestacas cultivadas *in vitro* de *Eucalyptus microcorys*. Barra = 1cm.



Fonte: O Autor (2020).

Os modelos dos microtubetes apresentaram duas formas distintas (cilíndrica e cônica) com quatro alturas (variando de 1,5 a 6,0 cm) e dois diâmetros (1,0 e 1,5 cm), com volumes variando de 0,75 a 5,30 cm<sup>3</sup>. As principais características dos modelos dos microtubetes, como o formato, o número de estrias, a dimensão, o volume, o peso e o tempo de impressão estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Detalhes do formato, número de estrias, dimensões, peso e tempo na confecção dos três modelos de microtubetes utilizados nas fases de enraizamento *in vitro* e aclimatização de microestacas de *Eucalyptus microcorys*.

Modelo	Formato	Número de estrias	Dimensões		Volume (cm <sup>3</sup> )	Peso (g)	Tempo de impressão* (minutos)
			Altura (cm)	Diâmetro (cm)			
1	Cônico	0	1,5	1,0	0,75	0,53	2
2	Cônico	8	1,5	1,0	0,75	0,40	6
3	Cônico	0	5,5	1,0	2,60	1,92	8
4	Cônico	8	5,5	1,0	2,60	1,00	19
5	Cilíndrico	0	6,0	1,0	5,30	1,42	12
6	Cilíndrico	16	6,0	1,0	5,30	1,00	23
7	Cilíndrico	16	3,0	1,5	4,90	0,80	20

\* Utilizado a impressora 3D marca Orion Delta.

Fonte: O Autor (2020).

O mini-estufim consistiu de uma estrutura plástica contendo uma bandeja de células retangulares (utilizadas na horticultura) com dimensões 47×17×3 cm. Cada célula foi preenchida com areia autoclavada servindo de suporte para os microtubetes. O mini-estufim foi vedado para evitar variações na umidade relativa do ar, sendo controlado semanalmente com a adição de 20-50 mL de água destilada, depositada no fundo do recipiente plástico (BRONDANI et al., 2012b; BRONDANI et al., 2018).

O substrato utilizado nos microtubetes, para promover o enraizamento das microestacas, foi constituído pela mistura de substrato orgânico comercial a base de casca de pinus decomposta e vermiculita média, na proporção igual a 1:1 (v/v).

O mini-estufim foi mantido em ambiente com temperatura de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), fotoperíodo de 16 horas e intensidade de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), contendo sete modelos de microtubetes com 15 repetições cada, totalizando 105 microestacas. Após 45 dias, foram contabilizados a porcentagem de enraizamento adventício das microestacas.

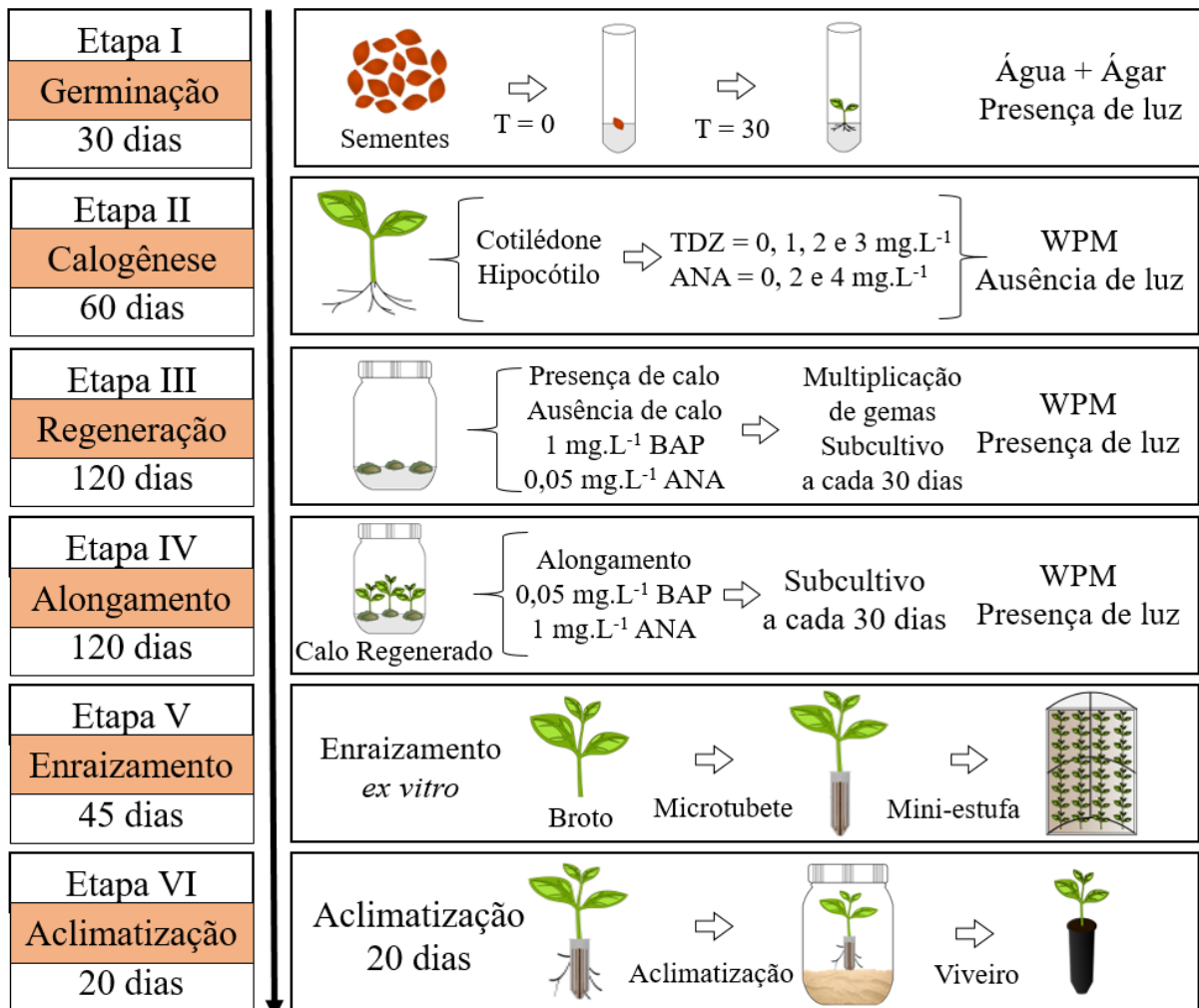
Para a aclimatização, as microestacas enraizadas inseridas nos microtubetes foram transferidas para frascos circulares de vidro vedados com papel filme, mantendo o ambiente úmido e realizando pequenas aberturas a cada 2 dias, a fim de minimizar possíveis estresses acondicionados pela diferença dos ambientes.

Após 10 dias, as microestacas foram levadas para viveiro e imersas diretamente em tubetes de polietileno (110 cm<sup>3</sup>) contendo a mesma proporção do substrato utilizado na fase do enraizamento (substrato orgânico comercial a base de casca de pinus decomposta e vermiculita média, na proporção 1:1; v/v).

Durante a fase de aclimatização no viveiro, as microestacas permaneceram em casa de sombra coberta com tela permitindo passagem de 50% da luminosidade, sendo irrigadas por aspersão com sistema automático quatro vezes ao dia. A aclimatização ocorreu em torno de 10 dias, sendo avaliada a sobrevivência das mudas.

As etapas apresentadas na metodologia estão ilustradas pelo fluxograma abaixo (Figura 3).

Figura 3 – Fluxograma com os métodos utilizados desde inoculação das sementes *in vitro* até a fase de aclimatização de plantas de *Eucalyptus microcorys* (total de 395 dias).



Fonte: O Autor (2020).

## 2.9. Análise histológica

Estudos anatômicos foram conduzidos para evidenciar o local de diferenciação das células na raiz adventícia das microestacas de *E. microcorys*. Segmentos caulinares com formação de raízes adventícias foram coletadas e fixadas em FAA70 (formaldeído 37% + etanol 70% + ácido acético glacial) (JOHANSEN, 1940), por 48 horas, e logo após, desidratadas em série etílica de 70, 80 e 95%, em intervalos regulares de 24 horas. Na sequência, os materiais permaneceram sete dias em resina de infiltração Leica Historesin® na mistura de 1:1 (resina:álcool) e logo após, transferidos para resina pura, por mais sete dias, e então foram emblocados em historesina.



Os cortes transversais foram realizados em micrótomo de mesa regulado na espessura de 8µm. As seções foram desidratadas em álcool etílico, coradas com solução aquosa azul de toluidina – pH 4,7. Para a confecção das lâminas permanentes foi utilizado meio de montagem Acrilex®, misturado em glicerina 50% (PAIVA et al., 2006).

## 2.10. Diversidade genética

Extrações de DNA foram realizadas após a aclimatização das microestacas em viveiro, de acordo com protocolo adaptado de Doyle e Doyle (1990). Para avaliar a diversidade genética foram utilizadas cinco mudas aclimatizadas provenientes do método *in vitro* de organogênese indireta, oriundos de explantes de plântulas *in vitro* de duas matrizes de *E. microcorys*. Amostras contendo 20 mg de tecido foliar foram coletadas, armazenadas em microtubos e maceradas com o auxílio de nitrogênio líquido. Adicionou-se 700 µL de tampão de extração CTAB 2% e, então, as amostras foram submetidas à agitação 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), submetendo-as novamente à agitação vigorosa, seguida por centrifugação a 12.000 rpm durante 7 minutos. Transferiu-se 500 µL do sobrenadante para novos tubos contendo 500 µL de isopropanol, deixando-as 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 ressuspensas 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 também avaliadas qualitativamente conforme razão de absorvância entre os comprimentos de onda A260 e A280, utilizando o espectrofotômetro NanoVue Plus™ (Biochrom).

Para avaliar a diversidade genética dos materiais, foram utilizados 16 primers, cujas especificações são apresentadas na Tabela 3. As amplificações 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 segundos 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).

Os fragmentos amplificados foram comparados com marcador de peso molecular conhecido Ladder 1Kb Plus. Utilizando apenas bandas bem definidas, foi avaliado o polimorfismo existente em cada indivíduo. Para isso, foi gerada uma matriz de dados binários, onde 1 indicava a presença e 0 indicava ausência no indivíduo e, a partir dela, calculou-se 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).

$$PIC = 1 - \sum p_i^2$$

Tabela 3 - Especificações dos primers utilizados nas análises de fidelidade genética de *Eucalyptus microcorys*.

Nº	Primer	Sequência	Nº	Primer	Sequência
1	Becky	(CA)7-YC	9	814	(CT)8-TG
2	Chris	(CA)7-YG	10	827	(AC)8G
3	John	(AG)7-YC	11	835	(AG)8-YC
4	Manny	(CAC)4-RC	12	848	(CA)6-RG
5	807	(AG)8-T	13	880	(GGAGA)3
6	808	(AG)8-C	14	889	DBD(AC)7
7	810	(GA)8-T	15	898	(CA)6-RY
8	813	(CT)8-T	16	901	(GT)6-YR

R = purina (A ou G) e Y = pirimidina (C ou T).

Fonte: O Autor (2020).

A análise da diversidade genética foi realizada pela estimativa dos seguintes parâmetros: número total de alelos ( $N_a$ ), número efetivo de alelos [ $N_e = 1 / (p^2 + q^2)$ ], heterozigosidade esperada de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e = 2pq$ ) e Índice de Shanon  $\{-1 \times [p \times \ln(p) + q \times \ln(q)]\}$ , onde  $p$  é a frequência da banda presente em cada marcador e  $q$  representa a banda ausente (alelo alternativo). As análises foram realizadas no GenAlix (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

## 2.11. Análise estatística

Os dados mensurados foram submetidos ao teste de Hartley ( $p > 0,05$ ) e Shapiro-Wilk ( $p > 0,05$ ), a fim de verificar a homogeneidade de variância entre os tratamentos e a distribuição normal dos dados, respectivamente. Os dados foram transformados conforme a necessidade por meio do teste Box-Cox. Em seguida, foi realizada análise de variância (ANOVA,  $p < 0,05$ ). De acordo com a significância da ANOVA, os dados dos fatores qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Foi utilizado para a análise estatística dos dados o software estatístico R versão 3.5.2, pacote ExpDes (R Core Team, 2018).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Cultura calogênica

Sementes de *E. microcorys* foram inoculadas *in vitro* para obtenção dos tecidos cotilédone e hipocótilo como fontes de explantes para a cultura calogênica (Figura 1D e E), sendo selecionados dos cultivos sem manifestação microbiana visível (bactérias e/ou fungos).

De acordo com a análise de variância, houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação a interação dos fatores testados nas duas fases iniciais da organogênese indireta, tanto para porcentagem de calogênese, como para a regeneração de gemas (Tabela 4).

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para a calogênese (CAL) e a regeneração de gemas adventícias (RG) dos explantes de *Eucalyptus microcorys* em relação a fonte dos tecidos e os fito-reguladores de crescimento aos 60 e 120 dias, respectivamente.

Causas da variação	GL	Quadrados médios	
		CAL	RG
Origem dos tecidos	1	0,0029*	0,0024*
Fito-reguladores	11	0,0035*	0,0035*
Fonte × fito-reguladores	11	0,0004*	0,0005*
Resíduo	48	0,0002	0,0003
Média (%)	-	81,38	24,16
CV (%)	-	14,80	23,60

<sup>ns</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. \* Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. Dados transformados por  $[(n+0,5)/100]^{0,5}$ , onde n = dado amostrado. GL = grau de liberdade, CV = coeficiente de variação.

Fonte: O Autor (2020).

Após 60 dias, foi observada indução à calogênese com média geral de 81,38%. As porcentagens de calogênese foram de 40-100% nos tecidos de origem do cotilédone e 13,30-100% para os tecidos de origem do hipocótilo (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios (%) de explantes de *Eucalyptus microcorys* que apresentaram calo *in vitro* em relação aos tecidos cotilédone e hipocótilo nas diferentes combinações de fito-reguladores de crescimento na indução à calogênese, após 60 dias da instalação do experimento.

Tratamento	TDZ (mg.L <sup>-1</sup> )	ANA (mg.L <sup>-1</sup> )	Cotilédone	Hipocótilo
T1	0	0	40,00 (±13,09) Ba	13,30 (±9,09) Db
T2	0	2	73,30 (±11,82) Aa	66,60 (±12,60) BCa
T3	0	4	93,30 (±6,67) Aa	86,60 (±9,09) ABa
T4	1	0	100,00 (±0,00) Aa	100,00 (±0,00) Aa
T5	1	2	86,60 (±9,09) Aa	80,00 (±10,69) ABa
T6	1	4	86,60 (±9,09) Aa	86,60 (±9,09) ABa
T7	2	0	100,00 (±0,00) Aa	100,00 (±0,00) Aa
T8	2	2	86,60 (±9,09) Aa	60,00 (±13,09) BCb
T9	2	4	93,30 (±6,67) Aa	80,00 (±10,69) ABa
T10	3	0	100,00 (±0,00) Aa	100,00 (±0,00) Aa
T11	3	2	100,00 (±0,00) Aa	93,30 (±6,67) Aa
T12	3	4	93,30 (±6,67) Aa	53,30 (±13,33) Cb

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e, nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média ± erro padrão.

Fonte: O Autor (2020).

Em relação a interação do fator tecido sobre as concentrações de fito-reguladores de crescimento, observa-se que o cotilédone respondeu estatisticamente igual a maioria dos fito-reguladores, diferindo apenas em T1 (0 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA), sendo estatisticamente inferior aos demais. O hipocótilo apresentou uma variação maior na formação da calogênese, estando os maiores valores médios presentes em T3, T4, T5, T6, T7, T9, T10 e T11. Assim como no tecido de origem do cotilédone, os explantes resultantes do hipocótilo apresentaram a menor porcentagem média na formação de calos em T1, o qual não utilizou nenhum fito-regulador na composição do meio de cultura.

Pôde-se notar uma similaridade nos valores estatístico entre os dois tecidos utilizados como explantes sob as concentrações dos fito-reguladores de crescimento, resultando diferença apenas nos meios formulados em T1(0 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA), T8 (2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) e T12 (3 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> de ANA), estando os explantes oriundos do hipocótilo com os menores valores estatísticos (Tabela 5).

A eficiência da organogênese *in vitro* depende principalmente da fonte do explante, dos componentes do meio de cultura e das condições ambientais (BHOJWANI; DANTU, 2013; MRIDULA et al., 2017; HESAMI; DANESHVAR, 2018). Outro fator que influencia as respostas organogênicas é o equilíbrio hormonal endógeno e exógeno entre a citocinina e a auxina presentes no tecido da planta, que servem como agentes indutores da morfogênese *in vitro* (FEHÉR, 2015). Muitos estudos relatam o efeito favorável do fito-regulador TDZ em diferentes estágios da formação de calos (ARAB et al., 2014; JAFARI; DANESHVAR; LORFI, 2017; HESAMI; DANESHVAR; LORFI, 2017). Concentrações de TDZ abaixo de 2,5 mg.L<sup>-1</sup>, são recomendadas para aplicações eficazes em tecido de espécies lenhosas, uma vez que altas concentrações podem limitar a organogênese indireta, reduzindo a indução da formação de gemas e brotações e aumentando a hiperidricidade (HESAMI; DANESHVAR, 2018).

No presente estudo, as concentrações dos fito-reguladores de crescimento em T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ), T7 (2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) e T10 (3 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ) destacaram-se dentre os demais, apresentando explantes com 100% de formação de calogênese em ambos os tecidos utilizados. Pôde-se notar dois aspectos similares entre esses meios de indução, estando (1) os calos com maior vigor e tamanho, ocupando grande área dentro dos frascos circulares de vidro, e sendo (2) todos eles meios preparados com ausência do fito-regulador ANA. O meio formulado em T1 (0 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) apresentou as menores porcentagens na formação de calos, para ambos os tecidos utilizados como explantes de *E. microcorys* (Tabela 5).

### 3.2. Regeneração de gemas

Os tecidos do cotilédone e do hipocótilo de *E. microcorys* que formaram calos foram transferidos para meio de cultura visando a regeneração de gemas e brotos adventícios, sendo dispostos em meio de cultura WPM com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de ANA.

Os tratamentos foram constituídos pelos tecidos e combinações de fito-reguladores que deram origem aos calos organogênicos. A interação do fator tecido sobre as concentrações de

fito-reguladores, apresentou grande amplitude nos resultados da regeneração de gemas, estando os explantes de origem do cotilédone com porcentagens entre 0 a 73,30% e do hipocótilo com porcentagens entre 0 a 80,00% (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores médios (%) de explantes de *Eucalyptus microcorys* que apresentaram regeneração adventícia da parte aérea *in vitro* no meio de indução à organogênese, em relação aos tecidos cotilédone e hipocótilo nas diferentes combinações de fito-reguladores de crescimento, após 120 dias.

Tratamento	TDZ (mg.L <sup>-1</sup> )	ANA (mg.L <sup>-1</sup> )	Cotilédone	Hipocótilo
T1	0	0	0,00 (±00,00) Ca	6,67 (±6,67) Ca
T2	0	2	0,00 (±00,00) Ca	0,00 (±00,00) Ca
T3	0	4	13,30 (±9,09) BCa	0,00 (±00,00) Ca
T4	1	0	73,30 (±11,82) Aa	80,00 (±10,69) Aa
T5	1	2	6,67 (±6,67) Ca	26,60 (±11,82) BCa
T6	1	4	6,67 (±6,67) Cb	33,30 (±12,60) BCa
T7	2	0	20,00 (±10,69) BCb	66,60 (±12,60) ABa
T8	2	2	13,30 (±9,09) BCa	6,67 (±6,67) Ca
T9	2	4	20,00 (±10,69) BCa	26,60 (±11,82) BCa
T10	3	0	40,00 (±13,09) ABa	33,30 (±12,60) BCa
T11	3	2	20,00 (±10,69) BCa	40,00 (±13,09) BCa
T12	3	4	20,00 (±10,69) BCa	33,30 (±12,60) BCa

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e, nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média ± erro padrão.

Fonte: O Autor (2020).

Os explantes de origem do cotilédone apresentaram os maiores valores estatísticos nos tratamentos T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> TDZ) e T10 (3 mg.L<sup>-1</sup> TDZ), com 73,30% e 40% de regeneração de gemas, respectivamente. Os demais tratamentos apresentaram calos com regeneração abaixo de 20%, estando T1 (0 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) e T2 (2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) com 0%. Os explantes de origem do hipocótilo apresentaram as maiores médias nos tratamentos T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ) e T7 (2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ) resultando, respectivamente, em 80% e 66,60% de regeneração de gemas. Os demais tratamentos apresentaram calos com regeneração abaixo de 40%, estando T2 (2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) e T3 (4 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) com 0%. Pôde-se notar diferença estatística na porcentagem de regeneração de gemas nos explantes formados dos meios de

calogênese T6 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) e T7 (2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ), sendo os explantes do hipocótilo estatisticamente superiores aos do cotilédone (Tabela 6).

Alguns estudos identificaram o TDZ como uma das citocininas mais eficazes para a regeneração de brotações em espécies do gênero *Eucalyptus*. A eficiência do TDZ na regeneração de brotações foi demonstrada em *E. camaldulensis* (DIBAX et al., 2010b) e *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* (OLIVEIRA et al., 2017). Essa capacidade do calo de se diferenciar em brotos é essencial para que o processo de morfogênese regenere plantas inteiras (SALLA et al., 2018). Além disso, o uso de TDZ em meio de cultura tem sido relatado para indução de embriões somáticos (ZHANG et al., 2001; MAMAGHANI et al., 2009), mas com a espécie *E. microcorys* não foram detectadas nenhuma estrutura embriogênica nos explantes dispostos nos meios de cultura com desse fito-regulador.

Entretanto, observou-se aumento na oxidação no meio de cultura proporcionalmente ao aumento do volume dos calos, principalmente quando os mesmos eram cortados ou fragmentados no momento dos subcultivos. Diversas causas podem estar associadas ao aumento da oxidação, sendo uma delas argumentada por Carvalho et al. (2011) os quais relacionam à presença de TDZ por sua ação na produção de etileno. Pelos resultados no presente estudo acredita-se que o processo de oxidação dos explantes não foi influenciado pela presença do regulador de crescimento e sim derivado pelo próprio explante, pelo seu volume em biomassa, ou pela manipulação do mesmo.

### 3.3. Alongamento das brotações

Após a fase de regeneração das gemas dos calos, os explantes foram transferidos para meio de cultura visando o alongamento das brotações, sendo esses transferidos para meio de cultura WPM com 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, para todos os tratamentos. Os tratamentos foram constituídos pelos tecidos de origem (cotilédone e hipocótilo) e pelas combinações de fito-reguladores de crescimento que deram origem aos calos organogênicos.

Após 120 dias dispostos no meio de alongamento, os explantes foram avaliados por meio do número de brotações totais e pelo número de brotações alongadas (>1cm). De acordo com a análise de variância foram detectadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação a interação dos fatores testados, tanto ao número de brotações totais, como ao número de brotos alongados (>1cm) (Tabela 7).

Tabela 7 - Resumo da análise de variância para o número de brotações totais (NBT) e o número de brotos alongados (NBA) (>1cm) de explantes de *Eucalyptus microcorys* em relação aos tecidos de origem e das combinações de fito-reguladores de crescimento na fase de alongamento, após 120 dias.

Causas da variação	GL	Quadrados médios	
		NBT	NBA (>1cm)
Tecido de origem	1	0,5064*	0,1368*
Fito-reguladores	11	0,4677*	0,0448*
Tecidos × fito-reguladores	11	0,1491*	0,0259*
Resíduo	48	0,0349	0,0027
Média	-	55,69	8,51
CV (%)	-	25,32	5,68

<sup>ns</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. \* Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. Dados transformados por  $1/EXP[(n+0,5)/100]$ , onde n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação.

Fonte: O Autor (2020).

Com relação a interação do fator origem do tecido sobre as combinações de fito-reguladores, os explantes oriundos do cotilédone apresentaram valores entre 0 a 120 brotações por frasco, estando os maiores resultados em T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ) e T6 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> de ANA), sendo ambos estatisticamente iguais. A grande maioria dos tratamentos apresentou médias baixas ou mesmo igual a zero, fato esse decorrente da elevada mortalidade dos explantes na etapa anterior (regeneração de gemas) (Tabela 8). Os explantes oriundos do hipocótilo apresentaram maior amplitude dos dados, estando as maiores médias em T4 (1 TDZ), T6 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> de ANA), T9 (2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) e T11 (3 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA), com resultados acima de 157 brotações por frasco, estando o maior valor absoluto presente em T11 com 275,3 brotações. Assim como relatado nos explantes oriundos do cotilédone, os tratamentos apresentaram médias baixas ou mesmo igual a zero, devido a elevada oxidação dos calos na etapa anterior de regeneração de gemas, ocasionando a mortalidade dos explantes (Tabela 8).

No que concerne a interação do fator concentração dos fito-reguladores sobre a origem dos tecidos utilizados como explantes, pôde-se notar diferença estatística nos principais resultados obtidos no tecido do hipocótilo, sendo eles T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ), T6 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> de ANA), T9 (2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) e T11 (3 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA), estatisticamente superiores ao tecido de origem do cotilédone. Os demais tratamentos foram estatisticamente iguais entre si (Tabela 8).



Tabela 8 - Número de brotações dos calos regenerados *in vitro* de *Eucalyptus microcorys* em relação aos tecidos de origem e as combinações dos fito-reguladores na etapa de alongamento de brotações aos 120 dias.

Tratamento	TDZ (mg.L <sup>-1</sup> )	ANA (mg.L <sup>-1</sup> )	Cotilédone	Hipocótilo
T1	0	0	0,00 (±0,00) Ca	0,00 (±0,00) Ca
T2	0	2	0,00 (±0,00) Ca	0,00 (±0,00) Ca
T3	0	4	34,0 (±8,94) Ba	0,00 (±0,00) Ca
T4	1	0	110,0 (±11,27) Ab	253,30 (±4,88) Aa
T5	1	2	13,3 (±5,96) BCa	11,70 (±5,21) BCa
T6	1	4	120,0 (±16,59) Ab	214,00 (±11,91) Aa
T7	2	0	26,0 (±11,62) Ba	15,00 (±6,70) BCa
T8	2	2	0,00 (±0,00) Ca	0,00 (±0,00) Ca
T9	2	4	0,00 (±0,00) Cb	157,00 (±35,39) ABa
T10	3	0	0,00 (±0,00) Ca	26,30 (±7,11) BCa
T11	3	2	0,00 (±0,00) Cb	275,30 (±6,53) Aa
T12	3	4	52,0 (±11,63) Ba	50,30 (±13,17) BCa

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e, nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média ± erro padrão.

Fonte: O Autor (2020).

Os explantes oriundos do tecido do hipocótilo foram os mais responsivos, apresentando as maiores médias nos números de brotações para *E. microcorys* por organogênese indireta, mostrando uma resposta semelhante à de outros estudos encontrados na literatura (MITTAL; SHARMA 2017; DHARMAPAL et al., 2017). Uma possível causa para essa diferenciação tecidual, considerando que esses eventos podem variar de acordo com o genótipo da planta (SALLA et al., 2018), está relacionada à regulação de processos fisiológicos que favorecem a formação de novos tecidos, pois contêm células com alta juvenilidade e competência celular (HUANG; ZENG; LU, 2010; WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014a; WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014b; WENDLING; BROOKS; TRUEMAN, 2015), levando ao aumento da produção e desenvolvimento de órgãos (GUPTA; KARMAKAR, 2017).

Avaliando o número de brotos alongados (>1cm), não houve interação dos explantes oriundos do cotilédone com os meios de indução calogênica, sendo todos estatisticamente iguais. O hipocótilo apresentou diferença entre os tratamentos, estando as maiores médias em T4, T6 e T11, com, respectivamente 40, 35 e 50 brotos alongados (>1cm). Com exceção ao T9,

todos os demais tratamentos apresentaram as menores médias, sendo considerados estatisticamente iguais entre si (Tabela 9).

No que diz respeito da interação entre os fatores concentração dos fito-reguladores sobre a origem dos tecidos utilizados como explantes, pôde-se notar diferença estatística em T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ), T6 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) e T11 (3 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA), sendo os explantes oriundos do hipocótilo estatisticamente superiores aos de origem do cotilédone. Os demais tratamentos não diferiram (Tabela 9).

Tabela 9 - Número de brotos alongados (>1cm) dos calos regenerados *in vitro* de *Eucalyptus microcorys* em relação aos tecidos de origem e as combinações de fito-reguladores na etapa de alongamento de brotações aos 120 dias.

Tratamento	TDZ (mg.L <sup>-1</sup> )	ANA (mg.L <sup>-1</sup> )	Cotilédone	Hipocótilo
T1	0	0	0,00 (±0,00) Aa	0,00 (±0,00) Da
T2	0	2	0,00 (±0,00) Aa	0,00 (±0,00) Da
T3	0	4	6,30 (±1,78) Aa	0,00 (±0,00) Da
T4	1	0	8,30 (±1,04) Ab	40,70 (±1,29) ABa
T5	1	2	1,30 (±0,59) Aa	2,30 (±1,04) Da
T6	1	4	7,30 (±2,39) Ab	35,00 (±2,69) ABa
T7	2	0	0,70 (±0,29) Aa	1,60 (±0,74) Da
T8	2	2	0,00 (±0,00) Aa	0,00 (±0,00) Da
T9	2	4	0,00 (±0,00) Ab	24,00 (±5,42) BCa
T10	3	0	0,00 (±0,00) Aa	3,00 (±0,68) Da
T11	3	2	0,00 (±0,00) Ab	50,00 (±1,86) Aa
T12	3	4	7,30 (±1,65) Aa	11,30 (±2,54) CDa

Nas colunas, médias seguidas por mesma letra maiúscula e, nas linhas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média ± erro padrão.

Fonte: O Autor (2020).

Assim como relatado na fase de regeneração de gemas, observou-se um aumento na oxidação no meio de cultura proporcionalmente ao aumento de biomassa dos explantes, principalmente quando os mesmos eram cortados ou fragmentados no momento dos subcultivos (Figura 1H). A oxidação fenólica tem sido relatada como um problema associado a micropropagação de espécies lenhosas, principalmente se tratando de espécies da família Myrtaceae, ocorrendo em *E. cloeziana* (OLIVEIRA et al., 2015); *E. benthamii* (BACCARIN et al., 2015); *E. dunnii* (NAVROSKI et al., 2014); *C. citriodora* × *C. torelliana* e *C. torelliana* ×

*C. citriodora* (SOUZA et al., 2019). No presente estudo, os explantes foram mantidos cinco dias no escuro após cada subcultivo, a fim de minimizar a oxidação no meio e assim evitar a morte dos explantes.

### 3.4. Enraizamento e aclimatização

O enraizamento das microestacas de *E. microcorys* foram contabilizados após 45 dias da incubação pelo sistema de mini-estufim. De acordo com a ANOVA, houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) dos modelos de microtubetes com a porcentagem de enraizamento e aclimatização das microestacas de *E. microcorys* (Tabela 10).

Tabela 10 - Resumo da análise de variância para o enraizamento (ENR) e a aclimatização (ACL) de microestacas de *Eucalyptus microcorys* em relação aos modelos de microtubetes.

Causas da variação	GL	Quadrados médios	
		ENR	ACL
Modelo dos microtubetes	6	0,0027*	0,0027*
Resíduo	98	0,0004	0,0004
Média (%)	-	32,38	32,38
CV (%)	-	24,65	24,65

<sup>ns</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. \* Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. Dados transformados por  $[(n+0,5)/100]^{0,5}$ , onde n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação.

Fonte: O Autor (2020).

A fase de enraizamento é uma das mais difíceis na micropropagação de espécies lenhosas e geralmente é realizado sob condições *ex vitro* (QUIALA et al., 2012; RABAIOLLI et al., 2017). No entanto, modificações nos procedimentos de enraizamento permitiram obter resultados em níveis adequados (BRONDANI et al., 2012b), em que várias combinações de reguladores de crescimento de plantas podem ser eficazes na promoção da sobrevivência e enraizamento de plantas através da organogênese indireta (HAJARI et al., 2006; AGGARWAL; KUMAR; REDDY, 2010; MATSUNAGA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017). As microestacas dispostas nos microtubetes 7, 6 e 4 apresentaram as maiores porcentagens estatísticas de enraizamento, destacando-se o modelo 7 com o maior valor absoluto, resultando em 73% de microestacas enraizadas. Os menores resultados foram apresentados nos modelos 1 e 2 dos microtubetes, sendo ambos com o menor volume para preenchimento de substrato (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores médios (%) de enraizamento e aclimatização de microestacas de *Eucalyptus microcorys* em relação aos modelos de microtubetes.

Microtubetes	Enraizamento	Aclimatização
	%	
Modelo 1	0,0 ( $\pm 0,00$ ) d	0,0 ( $\pm 0,00$ ) d
Modelo 2	6,67 ( $\pm 6,67$ ) cd	6,67 ( $\pm 6,67$ ) cd
Modelo 3	26,7 ( $\pm 11,81$ ) bc	26,7 ( $\pm 11,81$ ) bc
Modelo 4	40,0 ( $\pm 13,33$ ) ab	40,0 ( $\pm 13,33$ ) ab
Modelo 5	26,7 ( $\pm 11,81$ ) bc	26,7 ( $\pm 11,81$ ) bc
Modelo 6	46,7 ( $\pm 13,33$ ) ab	46,7 ( $\pm 13,33$ ) ab
Modelo 7	73,3 ( $\pm 11,81$ ) a	73,3 ( $\pm 11,81$ ) a
CV (%)	24,65	24,65

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Dados apresentados como: média  $\pm$  erro padrão. CV = coeficiente de variação.

Fonte: O Autor (2020).

Os resultados demonstraram a importância dos tipos dos microtubetes, notando-se diferença no enraizamento entre os modelos com o mesmo volume e com presença e ausência das estrias. Outro fator que influenciou diretamente na porcentagem de enraizamento foi decorrente do surgimento de microrganismos de natureza fúngica nos tecidos vegetais. As microestacas pertencentes aos modelos 1 e 2 resultaram nas menores médias de enraizamento e conseqüentemente ao maior número dos ataques fúngicos, sendo uma das possíveis causas a maior proximidade das microestacas à umidade presente no fundo do mini-estufim, pelo fato desse modelo apresentar a menor altura entre os demais modelos (Tabela 2).

Embora o enraizamento de microestacas possa ocorrer *in vitro* utilizando meio de cultura, estudos relatam a eficiência dessa etapa quando a mesma ocorre em ambiente *ex vitro* utilizando substrato, garantindo maior sucesso para a etapa de aclimatização, além da vantagem de não precisar utilizar fito-reguladores de crescimento (BRONDANI et al., 2012b; BRONDANI et al., 2018), os quais podem ser eficazes na sobrevivência e no enraizamento de microestacas por meio da organogênese indireta (AGGARWAL; KUMAR; REDDY, 2010; MATSUNAGA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017). O sistema de mini-estufim foi adotado por meio das vantagens destacadas em trabalhos de aclimatização de mudas, principalmente, de *Eucalyptus benthamii* relatados por Brondani et al. (2012b) e Baccarin et al. (2015) e *Eucalyptus cloeziana* por Oliveira et al. (2015).

Após a detecção do enraizamento, as microestacas foram transferidas para frascos de vidro vedados com papel filme (Figura 1K), realizando-se aberturas a cada dois dias. A aclimatização ocorreu aos 20 dias, sendo observado comportamento similar da fase de enraizamento com a fase de aclimatização das microestacas, não havendo nenhuma perda entre as etapas (Tabela 11).

Após os 20 dias da aclimatização, as mudas foram transferidas para viveiro em casa de sombra. Os problemas relacionados às fases de enraizamento e aclimatização de microestacas advindos dos protocolos-padrões da micropropagação podem ser solucionados com o uso dos microtubetes. A principal diferença do uso dos microtubetes comparado com os métodos tradicionais de enraizamento e aclimatização está no aumento produtivo nessas duas etapas da micropropagação. Os ganhos produtivos estão relacionados ao (1) maior percentual de pegamento das mudas transferidas das condições *in vitro* para *ex vitro*, por não haver a necessidade de remover as mudas enraizadas dos microtubetes para outro recipiente, garantindo assim menor estresse causado nas raízes das microestacas, e (2) reduzir o tempo operacional ao acondicionar as mudas ao recipiente final de produção em viveiro, pois os microtubetes se degradam ao longo do tempo.

Na Figura 4, pode-se observar o crescimento do sistema radicial da muda aclimatizada de *E. microcorys* após 60 dias em casa de sombra, demonstrando a importância das estrias para os modelos dos microtubetes, as quais auxiliam tanto para o controle da umidade e aeração do substrato, quanto para a expansão das raízes e a própria degradação dos microtubetes durante a etapa posterior a aclimatização das mudas em viveiro.

Ao final da aclimatização, pôde-se concluir o sucesso no uso dos microtubetes com a espécie florestal *E. microcorys*. O presente estudo teve como principal objetivo prescrever um protocolo de propagação *in vitro* via organogênese indireta até a fase de aclimatização das mudas, não sendo avaliadas as características de crescimentos em viveiro, como altura da parte aérea, diâmetro do coleto, massa seca da parte aérea e radicial, sendo importantes outros estudos a fim de verificar tais parâmetros de qualidade.

Por meio dos resultados do presente estudo, futuros projetos são idealizados para o processo de mecanização de mudas propagadas *in vitro* utilizando os microtubetes como ferramenta para otimização da produção em larga escala em biofábricas.

Figura 4 - Sistema radicial de muda aclimatizada de *Eucalyptus microcorys* inserida em microtubete (modelo 6) após 60 dias em viveiro. Barra = 2cm.



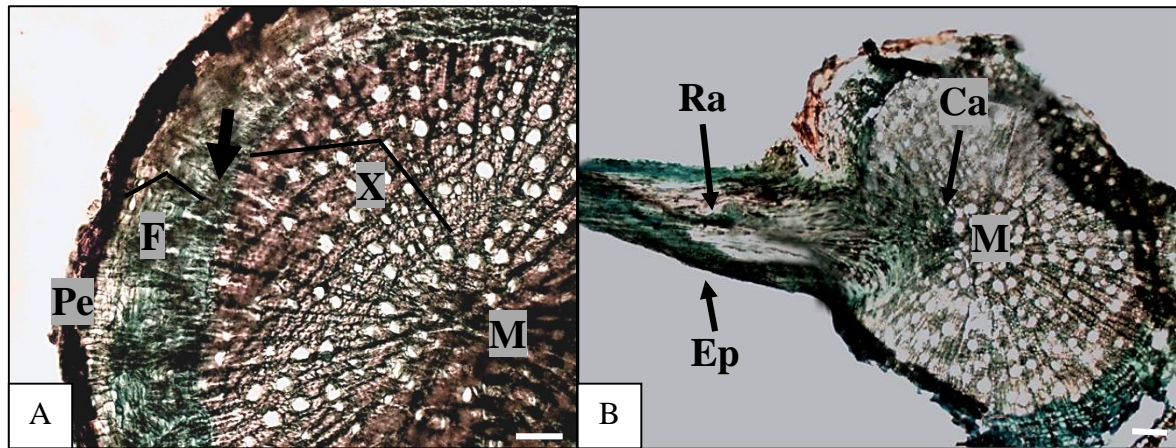
Fonte: O Autor (2020).

Quanto ao tempo de cultivo *in vitro*, considerando a germinação (30 dias), as fases de calogênese (60 dias), regeneração de gemas (120 dias), multiplicação e alongamento de brotações (120 dias), enraizamento (45 dias) e aclimatização das mudas (20 dias), o protocolo proposto (395 dias) é recomendado como uma alternativa para a propagação da espécie *E. microcorys*, podendo ser recomendada para inúmeras aplicações no melhoramento florestal.

### 3.5. Análise histológica

Os cortes anatômicos realizados na região de inserção da microestaca com as raízes adventícias revelou a distribuição dos feixes vasculares formando um anel cilíndrico ao redor do caule (Figura 5A). A figura 5B elucida a conexão vascular estabelecida entre a raiz adventícia e o câmbio do caule. Ressalta-se que, uma vez estabelecida essa conexão, a planta deixa de depender somente das reservas nutricionais da parte aérea e passa a ser suprida também pelos elementos químicos assimilados pela raiz.

Figura 5 - Cortes anatômicos das microestacas aclimatizadas de *Eucalyptus microcorys*. (A) Caule demonstrando a organização dos feixes vasculares. Barra = 100µm; (B) Região da conexão vascular estabelecida entre a raiz adventícia e o câmbio do caule. Barra = 200µm.



Pe = Periderme; F = Floema secundário; (seta) = Faixa cambial; X = Xilema secundário; M = Médula; Ca = Câmbio vascular; Ep = Epiderme; Ra = Raiz adventícia.

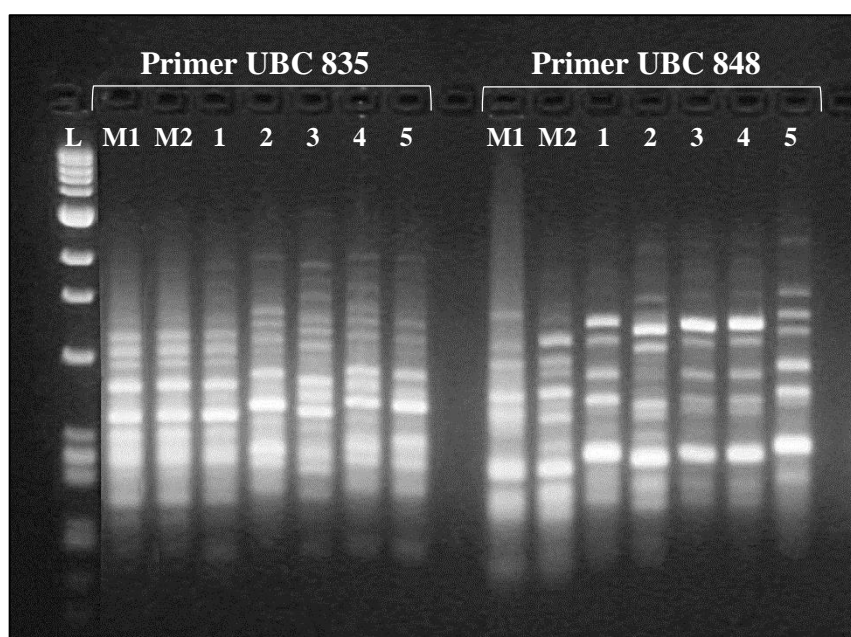
Fonte: O Autor (2020).

### 3.6. Diversidade genética

Para avaliar a diversidade genética foram utilizadas cinco mudas aclimatizadas provenientes de explantes de plântulas *in vitro* de duas matrizes de *E. microcorys*. As amostras dos indivíduos aclimatizados permitiram boa amplificação com os primers utilizados (Figura 6), com exceção dos marcadores UBC 807 e UBC 901, os quais não apresentaram amplificação para interpretação dos géis, sendo descartados das análises. Do total dos 16 primers utilizados, 14 resultaram na amplificação do DNA, apresentando marcadores com no máximo oito e no mínimo três bandas, com média de cinco por primer. A frequência de cada banda e o valor de PIC estão apresentadas na Tabela 12.

Botstein et al. (1980) e Smith et al. (1997) sugeriram que os primers com valores de PIC maiores que 0,5 indicam alto conteúdo de informação, entre 0,5 a 0,25 indicam conteúdo moderado, enquanto valores menores que 0,25 com baixo conteúdo de informação genética, indicando pouca capacidade de discriminar indivíduos. De acordo com este critério, para as mudas propagadas via organogênese indireta de *E. microcorys* são recomendados os primers UBC 835, UBC 848 e UBC 889, sendo esses considerados com conteúdo moderado de informação genética.

Figura 6 - Perfil da eletroforese dos primers UBC 835 e UBC 848 em indivíduos resgatados via organogênese indireta de *Eucalyptus microcorys*.



L = Marcador Ladder 1Kb Plus; M1 = Matriz 1 de *E. microcorys*; M2 = Matriz 2 de *E. microcorys*; 1 a 5 = mudas aclimatizadas propagadas via organogênese indireta de *E. microcorys*.

Fonte: O Autor (2020).

Tabela 12 - Resultados de frequência para cada banda e conteúdo de informação polimórfica (PIC) avaliados dos marcadores ISSR em *Eucalyptus microcorys* propagados via organogênese indireta.

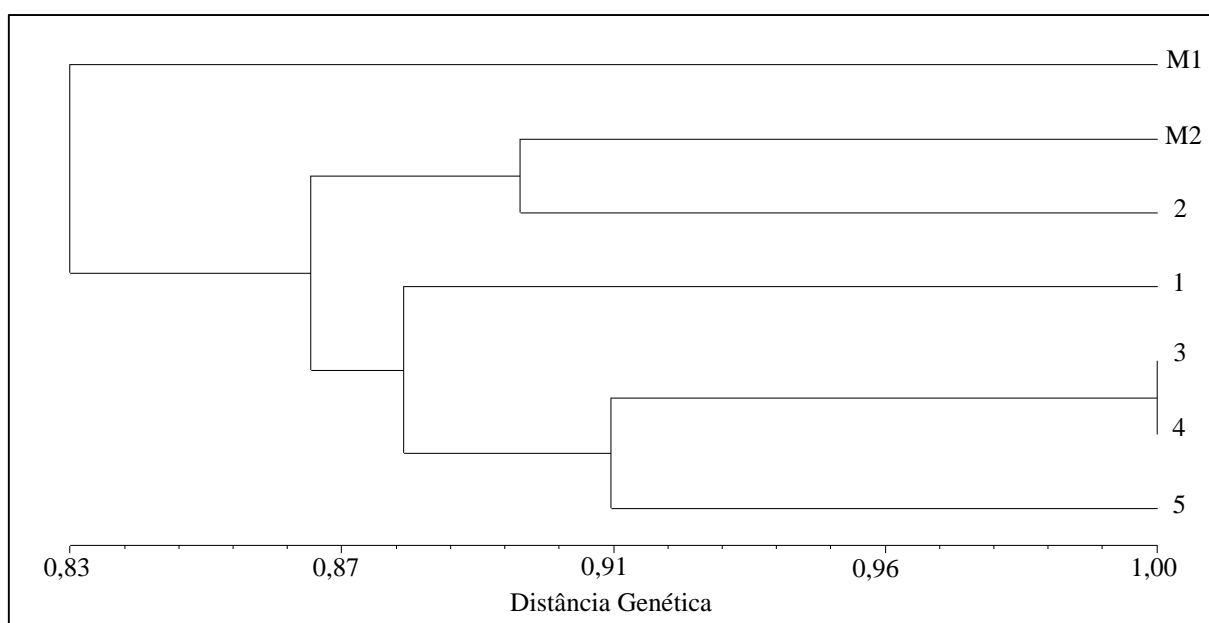
Primer	Frequência de cada banda								PIC
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Becky	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000			0,000
Chris	1,000	1,000	1,000	0,714					0,122
John	0,571	1,000	1,000	1,000	0,429	1,000			0,248
Manny	1,000	1,000	0,571	1,000					0,168
UBC 808	1,000	1,000	1,000						0,000
UBC 810	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000				0,000
UBC 813	1,000	1,000	1,000	0,571	1,000	1,000			0,112
UBC 814	1,000	1,000	0,429	1,000	1,000	0,714	1,000	1,000	0,218
UBC 827	0,714	1,000	1,000	0,714	1,000				0,196
UBC 835	1,000	0,571	1,000	0,286	1,000	0,571			0,378
UBC 848	0,286	0,857	1,000	0,286	0,714	1,000	0,429	1,000	0,371
UBC 880	1,000	1,000	1,000	1,000					0,000
UBC 889	0,857	0,143	1,000	1,000					0,311
UBC 898	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000			0,000

Fonte: O Autor (2020).



O fato das mudas do presente estudo serem materiais propagados por tecidos de plântula de sementes germinadas *in vitro* implica na ocorrência de variabilidade genética entre os indivíduos. Por meio da análise de agrupamento, utilizando a distância genética de Jaccard, observa-se a separação dos indivíduos propagados via organogênese indireta pelas matrizes de origem, formando dois grandes grupos. Os indivíduos propagados apresentaram características genéticas mais próximas as da matriz 2, e dentro do subgrupo foi possível observar que os indivíduos R3 e R4 são muito aparentados, não ocorrendo diferença nos locos avaliados, apresentando alta similaridade genética (Figura 7).

Figura 7 - Dendrograma com os resultados baseados na distância genética entre os indivíduos de *Eucalyptus microcorys* propagados via organogênese indireta.



M1 = Matriz 1 de *E. microcorys*; M2 = Matriz 2 de *E. microcorys*; 1 a 5 = mudas aclimatizadas propagadas via organogênese indireta de *E. microcorys*.

Fonte: O Autor (2020).

O percentual de polimorfismo observado nos indivíduos propagados de *E. microcorys* foi de 25,33%. Sob um ponto de vista biológico, esses resultados indicam baixo polimorfismo, sendo o mesmo observado a partir dos valores PIC da maioria dos primers, revelando baixa diversidade genética (Tabela 12). Também pôde-se verificar baixos níveis de diversidade nos demais índices decorrentes dos parâmetros estatísticos analisados, sendo esses justificados pelo número total de alelos ( $1,25 \pm 0,05$ ), número efetivo de alelos ( $1,18 \pm 0,04$ ), heterozigosidade esperada de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weimberg ( $0,10 \pm 0,02$ ) e Índice de Shanon

(0,15±0,03). Esse fato, provavelmente, pode ser justificado pelo baixo número amostral realizado e/ou à capacidade de hibridização da espécie *E. microcorys*, a qual apresenta como única espécie do subgênero Alveolata (BROOKER, 2000; STEANE et al., 2011). Assim, a baixa diversidade genética associada à restrição de hibridação justifica a falta de estudos genéticos com a espécie, bem como seu uso incipiente em programas de melhoramento.

#### 4. CONCLUSÕES

A competência dos tecidos e as concentrações dos fito-reguladores de crescimento foram efetivas à formação de calos, destacando-se as suplementações no meio de cultura em T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ), T7 (2 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ) e T10 (3 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ).

A fase de multiplicação de gemas (1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de ANA), e a fase de alongamento de brotações (0,05 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) apresentaram os melhores resultados nos explantes oriundos do tecido do hipocótilo.

O uso dos microtubetes dos modelos M4 (volume = 2,60 cm<sup>3</sup>), M6 (volume = 5,30 cm<sup>3</sup>) e M7 (volume = 4,90 cm<sup>3</sup>) destacaram-se na fase de enraizamento e aclimatização das microestacas, formando raízes adventícias normais e de conexão direta com o câmbio vascular.

Por meio dos testes da diversidade genética utilizando marcadores ISSR, detectou-se baixa variabilidade das microestacas aclimatizadas.

As melhores respostas para a produção de microplantas pelo protocolo de organogênese indireta foram observadas nos explantes de origem do hipocótilo, cultivados em T4 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ), T6 (1 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 4 mg.L<sup>-1</sup> de ANA) ou T11 (3 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ + 2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA).

#### 5. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Shoot organogenesis from elite plants of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Boston, v. 102, n. 1, p. 45-52, 2010.

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

ARAB, M. M. et al. Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on *in vitro* multiplication of G × N15 (hybrid of almond × peach) vegetative

rootstock. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, Egypt, v. 12, n. 2, p. 81-87, 2014.

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

BACCARIN, F. J. B. et al. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, Dordrecht, v. 46, p. 465-483, 2015.

BARRUETO CID, L. P. **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 303p.

BHOJWANI, S. S, DANTU, P. K. Micropropagation. In: BHOJWANI S. S., DANTU, P. K. eds. **Plant tissue culture: an introductory text**. New Delhi: Springer, 2013. cap. 17, p. 245-274.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Cambridge, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

BRONDANI, G. E. et al. *In vitro* organogenesis of *Eucalyptus grandis*: effects of boron and calcium. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 34, n. 4, p. 403-411, 2012a.

BRONDANI, G. E. et al. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, England, v. 48, 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**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 2, p. 2409-2423, 2018.

BROOKER, M. I. H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Her. (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, Victoria, v. 13, n. 1, p. 79-148, 2000.

CALONEGO, F. W. et al. Behavior of the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum* on thermally-modified *Eucalyptus grandis* wood. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 20, n. 3, p. 417-423, 2013.

CARVALHO, D. C. et al. Organogênese a partir de segmentos foliares e internodais de videira cv. Merlot. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35 n. 1, p. 108-114, 2011.

DHARMAPAL, S. et al. Callus induction and organogenesis from *Tinospora formanii* Udayan and Pradeep: A rare endemic plant. **Tropical Plant Research**, Kanpur, v. 4, p. 71-76, 2017.

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

- DIBAX, R. et al. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis* dehn and histological study of organogenesis *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 311-318, 2010b.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, p. 13-15, 1990.
- FEHÉR, A. Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, Amsterdam, v. 1849, n. 4, p. 385-402, 2015.
- FERREIRA, M. Escolha de espécies de eucalipto. **Circular Técnica - IPEF**, Piracicaba, v.47, p.1-30, 1979.
- GIRIJASHANKAR, V. *In vitro* regeneration of *Eucalyptus camaldulensis*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, India, v. 18, n. 1, p. 79-87, 2012.
- GUPTA, S. D; KARMAKAR, A. 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 and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 174, p. 162-172, 2017.
- HAJARI, E. et al. Plant regeneration from induced callus of improved *Eucalyptus* clones. **South African Journal of Botany**, South African, v. 72, n. 2, p. 195-201, 2006.
- HERVÉ, P. et al. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. **Plant Science**, Clare Ireland, v. 161, p. 645-653, 2001.
- HESAMI, M.; DANESHVAR, M. H.; LORFI, A. *In vitro* shoot proliferation through cotyledonary node and shoot tip explants of *Ficus religiosa* L. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Dhaka, v. 27, n. 1, p. 85-88, 2017.
- HESAMI, M.; DANESHVAR, M. H. *In vitro* adventitious shoot regeneration through direct and indirect organogenesis from seedling-derived hypocotyl segments of *Ficus religiosa* L.: an important medicinal plant. **HortScience**, Alexandria, v. 53, n. 1, p. 55-61, 2018.
- HUANG, Z. C.; ZENG, F. H.; LU, X. Y. Efficient regeneration of *Eucalyptus urophylla* from seedling-derived hypocotyls. **Biologia plantarum**, Dordrecht, v. 54, n. 1, p. 131-134, 2010.
- IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório Ibá 2019: ano base 2018**. São Paulo: Pöyry Consultoria em Gestão e Negócios Ltda, 2019. 90p.
- JAFARI, M.; DANESHVAR, M. H.; LORFI, A. *In vitro* shoot proliferation of *Passiflora caerulea* L. via cotyledonary node and shoot tip explants. **BioTechnologia - Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology**, Poland, v. 98, n. 2, p. 113-119, 2017.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York and London: McGraw-Hill Book Company, 1ª edition, 1940. 487p.

- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MAMAGHANI, M. S. et al. The effect of thidiazuron level on *in vitro* regeneration type and peroxidase profile in *Eucalyptus microtheca* F. Muell. **Plant growth regulation**, Dordrecht, v. 59, n. 3, p. 199-205, 2009.
- MATSUNAGA, E. et al. Agrobacterium-mediated transformation of *Eucalyptus globulus* using explants with shoot apex with introduction of bacterial choline oxidase gene to enhance salt tolerance. **Plant cell reports**, Germany, v. 31, n. 1, p. 225-235, 2012.
- MITTAL, J.; SHARMA, M. M. Enhanced production of berberine in *in vitro* regenerated cell of *Tinospora cordifolia* and its analysis through LCMS QToF. **3 Biotech**, Germany, v. 7, n. 1, p. 25, 2017.
- MOURA, V. P. G. et al. **Avaliação de espécies e procedências de *Eucalyptus* em Minas Gerais e Espírito Santo: resultados parciais**. Embrapa CPAC, Boletim de pesquisa 1 (INFOTECA-E), Brasília, 1980. 104p.
- MRIDULA, K. et al. *In vitro* organogenesis from *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers—a highly valuable medicinal plant. **South African journal of botany**, South African, v. 113, p. 84-90, 2017.
- 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, 2014.
- NUGENT, G. et al. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus* Labill. **In vitro Cellular Development & Biology-Plant**, England, v. 37, n. 3, p. 388-391, 2001.
- OLIVEIRA-CAUDURO, Y. et al. Indirect organogenesis from leaf explants and *in vitro* shoots multiplication of *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 2, p. 347-355, 2014.
- OLIVEIRA, C. et al. Micropropagation of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* AEC 224 clone. **Journal of Forestry Research**, China, v. 28, n. 1, p. 29-39, 2017.
- OLIVEIRA, F. N. et al. Seasonal influence on the essential oil of *Eucalyptus microcorys*. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 9, n. 4, p. 575-580, 2014.
- 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, 2013.
- OLIVEIRA, L. S et al. Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. **Australian Forestry**, Yarralumla, v. 78, n. 4, p. 219-231, 2015.
- PAIVA, J. G. A. et al. Vernix vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 02, p. 257-264, 2006.

- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, Oxford, v. 28, n 19, p. 2537-2539, 2012.
- PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O.; ABREU, H. S. Callogenesis in stem explants of *Eucalyptus grandis* (Hill ex Miden) showing resilience in oxide calluses. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 20, n. 3, p. 407- 416, 2013.
- QUIALA, E. et al. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Boston, v. 109, n. 2, p. 223-234, 2012.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing, reference index version 3.6.1**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019.
- RABAIOLLI, S. M. S. et al. Agar does not affect *in vitro* rhizogenesis and *ex vitro* acclimatization of *Handroanthus chrysotrichus*. **Cerne**, Lavras, v. 23, n. 2, p. 185-192, 2017.
- REMADE – Revista de Madeira. **Descrição de algumas espécies de eucalipto**. Curitiba, Ed. Porthus Comunicação, v. 75. Agosto de 2003. Disponível em: <[http://www.remade.com.br/revista-madeira](http://www.http://www.remade.com.br/revista-madeira)>. Acesso em: 14 jan. 2018.
- SALLA, T. D. et al. Non-aerated liquid culture promotes shoot organogenesis in *Eucalyptus globulus* Labill. **Journal of Forestry Research**, China, v. 29, n. 3, p. 623-629, 2018.
- SILVA, A. L. L. et al. Expressão transiente do gene uidA em explantes foliares de *Eucalyptus saligna* Sm. transformado via *Agrobacterium tumefaciens*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 1, 2013.
- SILVA, A. L. L. et al. Micropropagation of *Eucalyptus saligna* Sm. from cotyledonary nodes. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 47, n. 1, p. 311-318, 2015.
- SMITH, J. S. C. et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, n. 1/2, p. 163-173, 1997.
- SOUZA, A. P., DELLA LUCIA, R. M., RESENDE, G. C. Estudo da densidade básica da madeira de *Eucalyptus microcorys* F. Muell, cultivado na região de Dionísio, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, v.3, n.1, p.16-27, 1979.
- 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, 2019.
- STEANE, D. A. et al. Population genetic analysis and phylogeny reconstruction in *Eucalyptus* (Myrtaceae) using high-throughput, genome-wide genotyping. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 59, n. 1, p. 206-224, 2011.
- 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.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry—part I: concepts, regulation and consequences of phase change. **New Forests**, Dordrecht, v. 45, n. 4, p. 449-471, 2014a.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry—part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, Dordrecht, v. 45, n. 4, p. 473-486, 2014b.

WENDLING, I.; BROOKS, P. R.; TRUEMAN, S. J. Topophysis in *Corymbia torelliana* × *C. citriodora* seedlings: Adventitious rooting capacity, stem anatomy, and auxin and abscisic acid concentrations. **New Forests**, Dordrecht, v. 46, n. 1, p. 107-120, 2015.

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

XAVIER, A.; WENDLING, L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Ed. UFV, 2ª edição, 2013. 279 p.

ZHANG, C. L. et al. Thidiazuron-induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, New York, v. 37, p. 305–310, 2001.

**CAPÍTULO 3:**  
**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL, PEROXIDASE E pXRF PARA A**  
**DETERMINAÇÃO DO REJUVENESCIMENTO E/OU REVIGORAMENTO DE**  
**TECIDOS DE *Eucalyptus microcorys***

**RESUMO**

O presente estudo teve por objetivo investigar possíveis indicativos do rejuvenescimento e/ou revigoração em diferentes materiais propagados de *Eucalyptus microcorys* por meio dos testes de proteína total, peroxidase e pelo pXRF. Primeiramente, foram avaliadas sete técnicas de produção de mudas para a espécie *E. microcorys*, sendo elas: estaquia, alporquia, enxertia, micropropagação com brotações do ano, micropropagação com brotações epicórmicas, micropropagação via organogênese indireta e via seminal. Após análise inicial dos resultados, verificou-se que as técnicas de estaquia, alporquia e micropropagação com brotações do ano, não apresentaram potencial para a propagação dos materiais, ocorrendo 100% de mortalidade. A propagação via seminal, via enxertia, via micropropagação com brotações epicórmicas e via organogênese indireta resultaram na emissão de novas brotações, apresentando materiais de boa qualidade. A partir desses materiais foram realizadas as análises de proteína total, peroxidase e avaliação nutricional pelo pXRF, a fim de investigar possíveis indicativos do rejuvenescimento e/ou revigoração dos materiais. Por meio dos métodos testados foi possível verificar que os indivíduos propagados via enxertia apresentaram resultados diferenciados com as demais técnicas de propagação, mas seu comportamento possivelmente não condiz com o maior rejuvenescimento e/ou revigoração dos tecidos. O teste de proteínas totais (TCA/Acetona/Fenol) proporcionou um grande número de bandas no gel SDS descontínuo, destacando-se as amostras obtidas pela enxertia dentre as demais técnicas de propagação, as quais resultaram em duas bandas em regiões distintas. A maior atividade enzimática do teste de peroxidase foi observada na amostra via micropropagação por brotos epicórmicos, demonstrando um indicativo do rejuvenescimento de tecidos. Com relação as leituras das concentrações nutricionais pelo equipamento pXRF, foi detectada uma amplitude nas concentrações dos elementos, sendo as melhores respostas para a distinção dos materiais propagados de *E. microcorys* verificadas em K, Ca, Zn, Fe, Mn, Si. Dentre os testes realizados para investigação de possíveis indicativos do rejuvenescimento e/ou revigoração de tecidos de *E. microcorys*, a atividade de peroxidase proporcionou as melhores respostas associadas a tais eventos. Novos estudos são recomendados a fim de buscar outros métodos que apresentem similaridades com as respostas ao enraizamento em espécies florestais e assim otimizar o resgate e clonagem de plantas com distintos estágios ontogenéticos.

**Palavras-chave:** Resgate não-destrutivo. Enxertia. Micropropagação. Proteína total. Peroxidase. pXRF.



## **EVALUATION OF TOTAL PROTEIN, PEROXIDASE AND pXRF TO DETERMINE REJUVENATION AND/OR REINVIGORATION OF *Eucalyptus microcorys* TISSUES**

The present study investigated possible indications of rejuvenation and/or reinvigoration in different materials propagated from *Eucalyptus microcorys* by analysing total protein, peroxidase and nutritional evaluation by pXRF equipment. First, seven propagation techniques for *E. microcorys* were evaluated, namely: cuttings, layering, grafting, micropropagation with buds of the year, micropropagation with epicormic buds, micropropagation via indirect organogenesis and seminal propagation. After initial analysis, it was found that cutting, layering and micropropagation techniques with shoots of the year were not suitable, resulting in 100% mortality. The propagation through seminal and grafting technique, micropropagation with epicormic shoots and via indirect organogenesis resulted in the emission of new shoots, presenting adequate tissues. From the propagated materials, analysis of total protein, peroxidase and nutritional evaluation by pXRF were carried out, in order to investigate possible indications of the rejuvenation and/or reinvigoration of tissues. Through the tested methods, it was verified that the individuals that propagated via grafting presented different results with the other propagation techniques, but their behaviour may not match the greater rejuvenation and/or reinvigoration of tissues. The total protein test (TCA/Acetone/Phenol) provided a large number of bands in the discontinuous SDS gel, highlighting the samples obtained by grafting, resulting in two distinct regions. The highest enzymatic activity of the peroxidase test was observed in the sample via micropropagation by epicormic shoots, demonstrating an indication of tissue rejuvenation. Regarding the readings of the nutritional concentrations by the pXRF, an amplitude in the concentrations of the elements was detected, while the best responses for the distinction of the propagated materials of *E. microcorys* were verified in K, Ca, Zn, Fe, Mn, Si. Among the tests performed to investigate possible indications of rejuvenation and/or reinvigoration of *E. microcorys* tissues, the peroxidase activity provided the best responses. Further studies are recommended in order to uncover new methods that have similarities with the responses to rooting in forest species and thus optimize the rescue in materials with different ontogenetic stages.

**Keywords:** Non-destructive rescue. Grafting. Micropropagation. Total protein. Peroxidase. pXRF.

## 1. INTRODUÇÃO

A maioria das espécies lenhosas apresentam mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas durante a transição da fase juvenil para a adulta, sendo um dos maiores desafios para a propagação clonal o envelhecimento ontogenético dos tecidos, os quais possuem relação direta com a capacidade de enraizamento dos propágulos (SCHUCH et al., 2008; SCHWAMBACH et al., 2008; HARTMANN et al., 2011; XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013; BELLINI; PACURAR; PERRONE, 2014). Isto gera problemas na propagação porque, muitas vezes, as características desejadas de uma planta matriz são expressas depois da maturidade (HARTMANN et al., 2011).

Contudo, as características relacionadas à maturação dos tecidos vegetais podem ser estáveis e reversíveis, podendo variar em função do nível de juvenilidade dos materiais. O rejuvenescimento consiste em reverter plantas ou parte delas de um estado maduro para um estado juvenil (WENDLING; XAVIER, 2005), enquanto o revigoramento consiste na aplicação de técnicas que visem retornar a planta para um estado de alto vigor fisiológico (WENDLING; XAVIER, 2001). Assim, diferentes técnicas são empregadas em espécies lenhosas para induzir o crescimento de brotos juvenis e aumentar a produção de propágulos com maior potencial de enraizamento. Dentre os métodos utilizados para resgatar o rejuvenescimento dos tecidos, ou mesmo levar a respostas mais próximas possíveis de materiais propagados via sementes, incluem a enxertia, miniestaquia e a micropropagação (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013), o anelamento ou o uso do fogo na base do caule da árvore, o uso de galhos podados para a indução de brotações (WENDLING et al., 2013; BACCARIN et al., 2015) e a miniestaquia e enxertia seriadas (WENDLING; XAVIER, 2005).

No Brasil é raro encontrarmos testes de progênies e procedências de espécies florestais com idade avançada de plantio. Na cidade de Lavras, estado de Minas Gerais, encontra-se um dos poucos plantios experimentais de espécies do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia*, sendo este implantado no ano de 1974 e mantido até os dias atuais pela Universidade Federal de Lavras (UFLA) (MOURA et al., 1980). Dentre as espécies desse povoamento o *Eucalyptus microcorys* F. Muell destaca-se entre as demais, apresentando matrizes com excelentes características morfológicas de crescimento.

Com o uso de ferramentas apropriadas ao estudo do rejuvenescimento e revigoramento de tecidos vegetais, é possível analisar como as técnicas de propagação agem nas rotas metabólicas e nutricionais como facilitadores ao resgate do material de interesse, verificando a

aptidão dos propágulos ao enraizamento adventício. Dessa forma, o presente estudo teve a seguinte pergunta de pesquisa: É possível investigar a ocorrência do rejuvenescimento e/ou revigoramento em materiais propagados de origem adulta de *E. microcorys* por meio dos testes de proteínas totais, peroxidase e pXRF?

Uma predição mais assertiva sobre as mudanças bioquímicas que induzem o enraizamento adventício pode ser alcançada por meio da análise de expressão de proteínas totais, principalmente quando comparados com materiais de diferentes idades ontogenéticas (AHSAN et al., 2007; AHSAN; RENAUT; KOMATSU, 2009; RENAUT; KOMATSU, 2009; AGRAWAL et al., 2012). O estudo em nível de proteínas permite ampla percepção sobre as interações funcionais de diferentes rotas metabólicas (COX; MANN 2007). Assim, análises como a eletroforese de proteínas totais permite entender melhor as respostas celulares das plantas aos estímulos ocasionados ao enraizamento adventício. Dentre as metodologias dispostas na literatura, o método baseado na associação do ácido tricloroacético (TCA) com acetona possibilita uma extração rápida, com baixo custo, alto rendimento e produção de extrato protéico com alta qualidade, apresentando resultados satisfatórios em materiais advindos de espécies lenhosas (AHSAN; RENAUT; KOMATSU, 2009; KOSOVÁ et al., 2011).

Em rotas mais específicas durante a fase de enraizamento, temos um significativo aumento na atividade das peroxidases, as quais são enzimas envolvidas no metabolismo de compostos fenólicos pela presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), atuando no processo de regulação na formação de raízes (GASPAR et al., 1992; PASSARDI; PENEL; DUNAND, 2004; SCHWAMBACH et al., 2008). Estudos apontam que as diferenças do acúmulo entre os radicais superóxido e o peróxido de hidrogênio afetam significativamente o crescimento e diferenciação das raízes (ZANOL et al., 1997; DUNAND; CRÈVECOEUR; PENEL, 2007), sendo relatados na propagação de *Cucumis sativus* e *Vigna radiata* (LI et al., 2007, 2009), em *Ebenus cretica* L. (SYROS et al., 2004), em estacas semi-lenhosas de *Olea europaea* L. (SEBASTIANI; TOGNETTI, 2004) e em miniestacas de *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* (BOAVA et al., 2010; GOULART; XAVIER; DIAS, 2010; PRADO et al., 2014).

Embora seja reconhecida a importância dos nutrientes no processo de enraizamento adventício, estes ainda são relativamente pouco estudados em função da dificuldade em determinar e esclarecer o papel dos mesmos durante a rizogênese, devido à complexidade bioquímica e fisiológica envolvida no processo (CUNHA et al., 2009a, b; BRONDANI et al., 2014). Uma das formas de verificar esses elementos em materiais vegetais é por meio dos analisadores portáteis de fluorescência de raios-X (pXRF), os quais são capazes de quantificar

ou qualificar praticamente qualquer elemento de forma rápida e não destrutiva, diretamente no campo ou no laboratório (MCGLADDERY et al., 2018; PEARSON et al., 2017). Cada elemento tem uma assinatura espectral característica e a intensidade da energia é proporcional à concentração do elemento no material, portanto, o valor característico da energia é usado para identificação do elemento e a intensidade da fluorescência permite a quantificação (WEINDORF; BAKR; ZHU, 2014). Na literatura alguns estudos relatam previamente a aplicação do pXRF na avaliação de teor de nutrientes em materiais vegetais (MCLAREN; GUPPY; TIGHE, 2012; PALTRIDGE et al., 2012a, b; TOWETT; SHEPHERD; LEE DRAKE, 2016; SACRISTÁN; ROSSEL; RECATALÁ, 2016; MCGLADDERY et al., 2018).

A partir do exposto, o presente estudo teve por objetivo investigar possíveis indicativos do rejuvenescimento e/ou revigoramento de tecidos de *E. microcorys* propagados por meio da produção de mudas por sementes, por enxertia, por micropropagação e por organogênese indireta.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Caracterização geral**

Os experimentos foram conduzidos no Viveiro Florestal, no Laboratório de Cultivo *In vitro* de Espécies Florestais, situados no Departamento de Ciências Florestais e no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Medicinais, situado no Departamento de Agricultura. A análise de proteínas totais foi realizada no Laboratório de Sementes Florestais, situado no Departamento de Ciências Florestais, a análise de peroxidase no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, situado no Departamento de Fisiologia Vegetal, e a análise com o equipamento pXRF no Departamento de Solos. Todos os laboratórios são pertencentes à Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG.

### **2.2. Origem do material vegetal**

Os materiais de estudo foram provenientes de indivíduos adultos de *E. microcorys* localizados em um povoamento implantado no ano de 1974 contendo diferentes procedências de *Eucalyptus* e *Corymbia*, no Viveiro Florestal da Universidade Federal de Lavras (21°22'75" S, 44°96'98" W), município de Lavras-MG.

### **2.3. Técnicas de propagação**

Sete técnicas de propagação, de caráter não-destrutivo, foram realizadas para a espécie *E. microcorys*, sendo elas: estaquia, alporquia, enxertia, micropropagação com brotações do ano, micropropagação com brotações epicórmicas, micropropagação via organogênese indireta e via seminal (Figura 1).

#### **2.3.1. Estaquia**

Estacas de brotações laterais do ano foram coletadas, apresentando tamanho médio de 3 cm com um par de folhas reduzidas pela metade, as quais receberam aplicação de AIB ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) na base da estaca por 15 segundos. As estacas foram conduzidas em tubetes de  $120 \text{ cm}^3$  contendo vermiculita e material orgânico (1:1, v/v) acondicionados em casa de vegetação climatizada, com umidade relativa do ar e temperatura controlados ( $\text{UR} > 80\%$ ; temperatura entre  $20$  e  $35^\circ\text{C}$ ) e sistema de nebulização intermitente com bicos de alta pressão e baixa vazão, controlados automaticamente por umidostato. Após 90 dias em casa de vegetação, foram avaliadas a sobrevivência e enraizamento das estacas.

#### **2.3.2. Alporquia**

Os alporques foram realizados diretamente nas matrizes do povoamento, utilizando ramos lenhosos do último período vegetativo medindo de 1 a 2 cm de diâmetro. A casca de cada ramo foi removida pela metade com o auxílio de um canivete, formando um semi-anel com aproximadamente 1,0 a 1,5 cm de largura. Posteriormente, os ramos foram cobertos com substrato contendo vermiculita e material orgânico (1:1, v/v), vedados com plástico transparente com dimensões de  $10 \times 20 \text{ cm}$ . As extremidades foram amarradas ao ramo e o substrato mantido úmido. Após 150 dias, foram avaliadas a sobrevivência e enraizamento dos alporques.

#### **2.3.3. Enxertia**

Mudas de origem seminal das matrizes foram utilizadas como porta-enxerto, sendo essas produzidas em tubetes de  $110 \text{ cm}^3$ , com idade de 120 dias mantidas em casa de sombra.

Os enxertos foram obtidos por meio da coleta de brotações do ano das matrizes do povoamento. A enxertia realizada foi do tipo fenda cheia, com auxílio de uma tesoura alicate de enxertia, realizando a união dos tecidos com fita de Micropore (2 mm de largura). As mudas enxertadas foram acondicionadas em casa de vegetação climatizada, com umidade relativa do ar e temperatura controlados (UR>80%; temperatura entre 20 e 35°C) e sistema de nebulização intermitente com bicos de alta pressão e baixa vazão, controlados automaticamente por umidostato. Após 45 dias as mudas enxertadas foram avaliadas quanto ao pegamento dos tecidos e emissão de novas brotações.

#### **2.3.4. Micropropagação com brotações do ano**

As coletas dos materiais ocorreram diretamente nas matrizes, tendo como padrão explantes de segmentos nodais coletados da porção mediana das brotações epicórmicas, com tamanho entre 1,0 a 1,5 cm de comprimento, contendo gemas axilares e com as folhas removidas. Os explantes passaram pelo processo de assepsia por 10 minutos em água corrente, seguidos por 5 minutos imersos em hipoclorito de sódio (NaOCl) à 50% (água:hipoclorito, v/v, 2,0-2,5% de cloro ativo), sendo ao final desse processo, conduzidos em câmara de fluxo laminar lavados por três vezes com água deionizada e autoclavada (tríplice lavagem). Posteriormente, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (2×15 cm) contendo 12 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com ausência de fito-reguladores (Tabela A – Anexos), sendo mantidos em sala de crescimento. O estabelecimento e contaminação dos explantes foram avaliados após 30 dias de inoculação *in vitro*.

#### **2.3.5. Micropropagação com brotações epicórmicas e via organogênese indireta**

Os materiais obtidos pela técnica de micropropagação com brotações epicórmicas e pela micropropagação via organogênese indireta foram os mesmos descritos pelas metodologias presentes nos capítulos 1 e 2 da presente tese.

#### **2.3.6. Propagação via seminal**

Sementes das matrizes de *E. microcorys* foram coletadas para a semeadura em tubetes com capacidade para 110 cm<sup>3</sup>, acondicionados em bandejas de polipropileno dispostas em

canteiros suspensos a 80 cm do solo em casa de sombra coberta com tela permitindo passagem de 50% da luminosidade. A irrigação foi por aspersão com sistema automático, sendo irrigadas quatro vezes ao dia (duas na parte da manhã e duas na parte da tarde), e cessada em dias chuvosos. As mudas permaneceram na casa de sombra durante 30 dias seguidas em área de pleno sol por 120 dias até a rustificação. O raleio foi realizado com auxílio de tesoura após 60 dias da sementeira, deixando uma muda por recipiente, sendo essa a mais centralizada no tubete e com melhor crescimento da parte aérea.

## **2.4. Análises para investigação do rejuvenescimento e revigoração**

A partir dos materiais propagados foram realizadas as análises de proteína total, peroxidase e avaliação pelo pXRF, a fim de investigar possíveis indicativos do rejuvenescimento e/ou revigoração dos materiais. Com excessão da árvore matriz, os demais materiais propagados foram transferidos para estrutura em sistema semi-hidropônico tipo “canaletão”, a fim de padronizar o ambiente para as análises realizadas.

### **2.4.1. Extração de proteína total - TCA/Acetona/Fenol**

Folhas foram utilizadas como material de análise de cada fonte distinta de propagação da espécie *E. microcorys*, sendo realizadas duas repetições de cada. As folhas foram maceradas em almofariz com pistilo, usando nitrogênio líquido. Foram utilizados 200 mg de macerado para 1,5 mL 10% TCA em acetona. Para cada etapa as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 4°C (14000 rpm), sendo o sobrenadante descartado. As etapas consistiram na adição de 1,5 mL de metanol 80% contendo 0,1M de acetato de amônio e posteriormente 1,5 mL de acetona 80%. Deixou-se o pelete secar em estufa 50°C por 10 minutos, sendo adicionado 0,5 mL de fenol (pH 8,0) e 0,5mL de tampão SDS (30% de sacarose, 2%SDS, 0,1 Tris-HCl pH 8,0, 5% 2-B-mercaptoetanol). Homogeneizou e incubou as amostras por 5 minutos, sendo centrifugadas na sequência. Os sobrenadantes foram transferidos para novos recipientes, adicionando 1,5 mL de metanol com 0,1M de acetato de amônia e foram incubadas a -20°C por 10 minutos. Posteriormente os peletes foram formados, sendo esses lavados com metanol 100% e acetona 80%. O pelete foi dissolvido em tampão de uréia.

Uma alíquota de cada amostra foi utilizada para quantificação pelo método de Bradford (1976). Amostras de 50 µL foram aplicadas em canaletas, em gel SDS descontínuo

(concentrador a 6,0% e o separador a 7,5% de acrilamida), em duas repetições técnicas. O conjunto foi imerso em tampão de corrida SDS 1X (solução de tris base 0,052 M, glicina 0,053M e SDS 0,0035M), no qual foi aplicada uma corrente de 150V por 7 horas. O gel foi corado com Comassie Blue 1% (solução de ácido acético 10% e etanol 50%) por 24 horas, sendo posteriormente descolorido com solução de ácido acético 10% e etanol 5%, por 5 horas. As imagens foram comparadas com o padrão do marcador (Kaleidoscope® Precision Plus Protein Standards) e digitalizadas usando um escâner (Imagescanner - Amersham Biosciences).

#### 2.4.2. Peroxidase

Folhas foram utilizadas como material de análise de cada fonte distinta de propagação da espécie *E. microcorys*, sendo realizadas cinco repetições de cada. Macerou-se 200 mg de material fresco em nitrogênio líquido com 50% de PVPP. Após maceração, foram adicionados 1,5 mL de tampão de extração (solução aquosa de fosfato de potássio 400 mM, pH 7,8; EDTA 10 mM; ácido ascórbico 200 mM; e água). Os tubos contendo a mistura foram agitados em centrífuga (8500 rpm, temperatura de 4°C, por 10 minutos) e foram coletados os sobrenadantes, sendo mantidos em geladeira por 24 horas. Para quantificação da atividade de peroxidase foi utilizada a metodologia proposta por Nakano e Asada (1981) com modificações de García-Limones et al. (2002). As amostras foram distribuídas em placa Elisa visível, sendo pipetados 16 µL da amostra, em triplicatas. Adicionou-se 154 µL do mix de reação (solução aquosa de fosfato de potássio 200 mM, pH 6,5; Guaiacol 200 mM; e água). Antes da leitura foram adicionados 30 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,35%). A atividade de peroxidase foi realizada com auxílio do equipamento de espectrofotômetro com leitor de microplacas Epoch da Biotek, configurado para leituras a 470 nm. O equipamento foi conectado a um computador, sendo utilizado o software Gen5 para coleta das leituras. Realizou-se 60 leituras em intervalos de 1 minuto, totalizando 60 minutos para coleta da atividade de peroxidase das amostras.

Os dados da atividade de peroxidase foram submetidos ao teste de Hartley ( $p > 0,05$ ) e Shapiro-Wilk ( $p > 0,05$ ), a fim de verificar a homogeneidade de variância entre os tratamentos e a distribuição normal dos dados, respectivamente. Os dados foram transformados conforme a necessidade por meio do teste Box-Cox. Em seguida, foi realizada análise de variância (ANOVA,  $p < 0,05$ ). De acordo com a significância da ANOVA, os dados foram comparados pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Foi utilizado para a análise estatística dos dados o software estatístico R versão 3.5.2, pacote ExpDes (R Core Team, 2018).



### 2.4.3. Avaliação de nutrientes via pXRF

A leitura das amostras pelo equipamento pXRF foi realizada por meio do escaneamento de um conjunto de cinco folhas para cada material de estudo de *E. microcorys*. Antes da digitalização, o instrumento foi aquecido por 30 minutos e as amostras foliares foram dobradas ao meio ( $\pm 2$  cm de espessura), sendo presas nas extremidades com auxílio de elásticos. A digitalização de cada amostra foi realizada com um espectrômetro DP-6000 (Olympus, Waltham, MA) pXRF, configurado no *Modo Solo* do equipamento (WEINDORF; CHAKRABORTY, 2016). As amostras foram dispostas em raios-X operado a 10-40 keV com uma sequência de três feixes por leitura, com duração de 30 segundos, de modo que uma leitura completa totalizasse 90 segundos. Cada tratamento foi realizado em duplicata sendo computada ao final a média de cada indivíduo. Para validar o desempenho do instrumento, foram utilizados materiais de referência certificados pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST), para estabelecer o fator de correção para cada elemento aplicados ao conjunto de dados (KOCH et al., 2017).

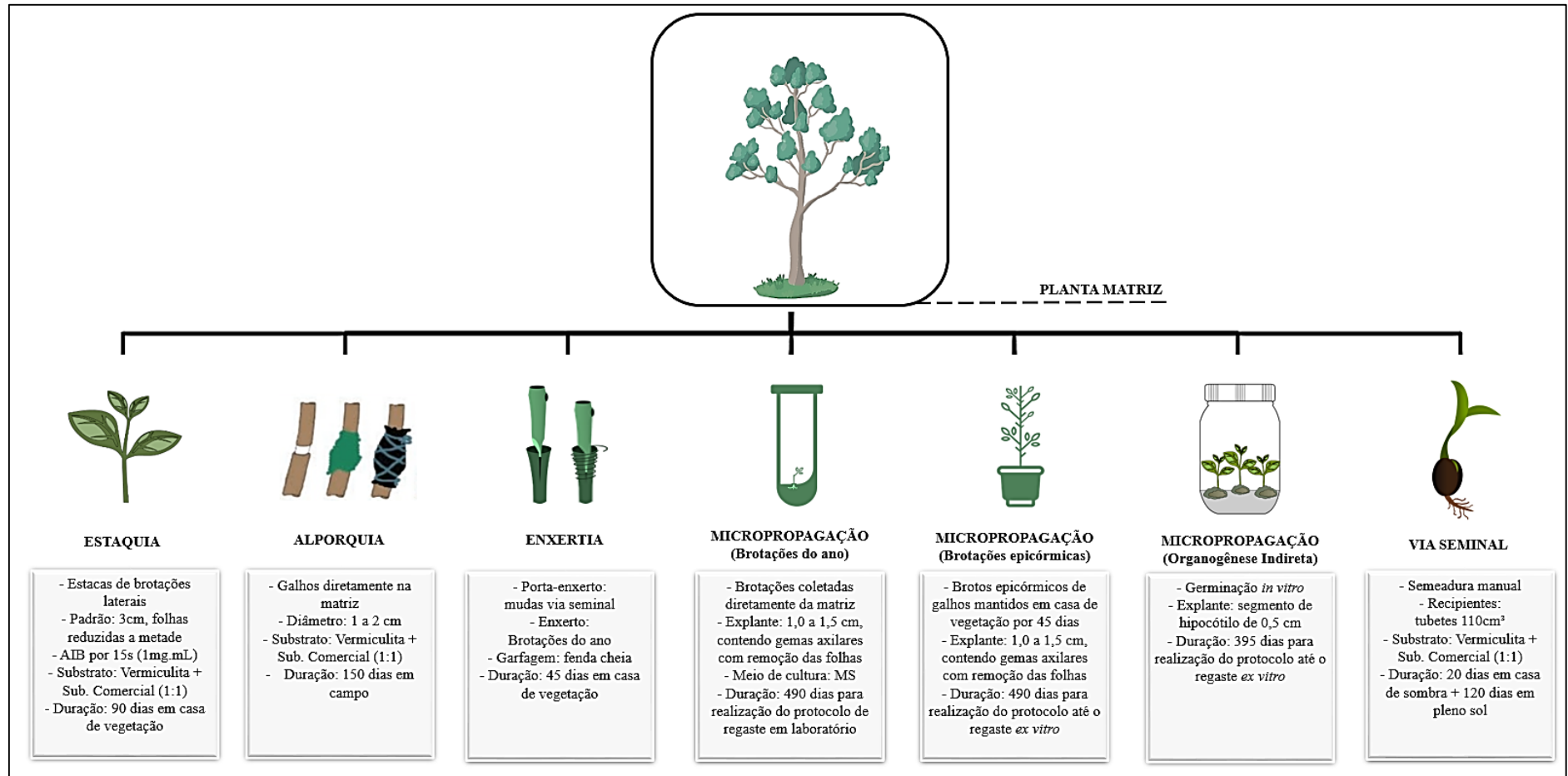
A tabela 1 apresenta as concentrações de macro e micronutrientes considerados adequados, elevados, baixos e deficientes para brotações de *Eucalyptus* em condição de minijardim clonal, segundo recomendações de Higashi, Silveira e Gonçalves (2004), sendo utilizados esses valores como referência para discutir as leituras realizadas pelo equipamento pXRF.

Tabela 1 - Teores de macro e micronutrientes considerados adequados, acima e abaixo dos adequados e deficientes para brotações de *Eucalyptus* cultivados em condição de minijardim clonal.

Teor nutricional	Nutrientes								
	P	K	Ca	Mg	S	Zn	Cu	Fe	Mn
	g.kg <sup>-1</sup>					mg.kg <sup>-1</sup>			
Alto	>4	>30	>7	>4	>2,5	>60	>15	>220	>500
Adequado	2,5-4	15-30	5-7	2-3	2-2,5	30-60	8-15	100-220	250-500
Baixo	1,5-2,5	10-15	3-5	1-2	1,3-2	20-30	5-8	75-100	150-250
Deficiente	<1,5	<10	<3	<1	<1,3	<20	<5	<75	<150

Fonte: Higashi, Silveira e Gonçalves (2004).

Figura 1 – Fluxograma das técnicas de propagação utilizadas na espécie *Eucalyptus microcorys*.



Fonte: O Autor (2020).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a análise inicial dos resultados, verificou-se que as técnicas de alporquia, estaquia e micropropagação com brotações do ano, não apresentaram potencial para o resgate dos materiais, ocorrendo 100% de perda. A propagação via seminal, via enxertia, via micropropagação com brotações epicórmicas e via organogênese indireta apresentaram respostas positivas quanto a emissão de novas brotações, resultando em materiais com boa qualidade (Figura 2).

A partir dos materiais propagados foram realizadas as análises de proteínas totais, peroxidase e avaliação de nutrientes pelo pXRF, a fim de investigar possíveis indicativos do rejuvenescimento e/ou revigoramento dos materiais. Para realização dos testes, foram utilizados tecidos de origem foliar dos indivíduos de *E. microcorys*: (1) planta matriz; (2) via seminal; (3) via enxertia; (4) via micropropagação por brotações epicórmicas; (5) via micropropagação por organogênese indireta; (6) explantes *in vitro* da micropropagação por brotações epicórmicas; e (7) explantes *in vitro* da micropropagação por organogênese indireta.

Com excessão da árvore matriz e dos materiais *in vitro*, os demais indivíduos propagados foram transferidos para estrutura em sistema semi-hidropônico tipo “canaletão”, a fim de padronizar o ambiente e assim evitar esse fator para as análises realizadas.

#### 3.1. Proteína total - TCA/Acetona/Fenol

Por meio da imagem do gel (Figura 3) foi possível observar uma padronização da maioria das proteínas extraídas com o método TCA/Acetona/Fenol nas diferentes técnicas de propagação em *E. microcorys*. A separação das proteínas por peso molecular foi eficiente, formando grande número de bandas entre as faixas de 100 a 25 kD (Figura 3).

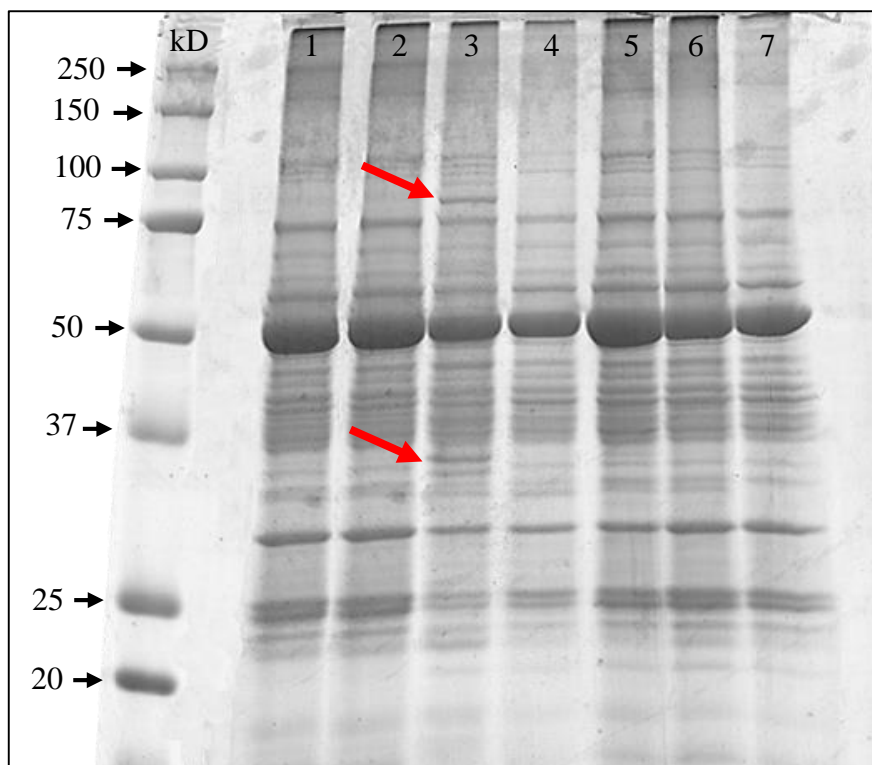
De forma geral, observou um maior número de bandas entre as regiões de 75 a 37 kD em todas as técnicas de propagação de *E. microcorys*, sendo possível observar no resgate via enxertia duas regiões distintas dentre as demais, estando uma delas entre 100 a 75 kD e a outra entre 37 a 25 kD (Figura 3).

Figura 2 – Detalhe das técnicas de propagação adotadas nos indivíduos adultos de *Eucalyptus microcorys*, sendo: (A) Padrão do material utilizado para a técnica de estaquia e (B) Falha no resgate, indicando morte das estacas após 90 dias em casa de vegetação (Barra = 3 cm); (C) Padrão dos alporques utilizados nos galhos das matrizes e (D) Falha no resgate, indicando seca e morte dos galhos após 150 dias em campo (Barra = 6 cm); (E) Padrão de explantes utilizados para o cultivo *in vitro* e (F) Falha no resgate, indicando explante contaminado após 30 dias *in vitro* (Barra = 1 cm); (G) Sucesso na técnica de propagação via enxertia, indicando novas brotações no enxerto (Barra = 6 cm); (H) Padrão dos brotos epicórmicos utilizados como explantes para técnica de micropropagação (Barra = 2 cm); (I) Explante oriundo de brotos epicórmicos cultivados *in vitro* durante a fase de multiplicação de gemas (Barra = 1 cm); (J) Calos regenerados via organogênese indireta oriundos do tecido do hipocótilo de plântulas *in vitro* (Barra = 1 cm); (K) Padrão das plantas aclimatizadas via micropropagação (brotações epicórmicas) e via organogênese indireta, após 490 e 395 dias sob cultivo *in vitro* (Barra = 1 cm); (L) Produção de mudas via sementes após 150 dias da germinação.



Fonte: O Autor (2020).

Figura 3 - Perfil da eletroforese de proteínas totais pelo método TCA/Acetona/Fenol em amostras foliares obtidas por meio de diferentes técnicas de propagação de *Eucalyptus microcorys*.



Legenda: 1. Planta matriz; 2. Via seminal; 3. Via enxertia; 4. Via micropropagação (brotos epicórmicos); 5. Via micropropagação (organogênese indireta); 6. Explantes *in vitro* (brotos epicórmicos); 7. Explantes *in vitro* (organogênese indireta). Setas vermelhas indicando duas regiões distintas na amostra 3.

Fonte: O Autor (2020).

A propagação por meio da técnica de enxertia é considerada um mecanismo complexo, podendo apresentar diversas variações nos tecidos da planta, influenciando o fluxo de elementos de minerais essenciais, crescimento dos tecidos do enxerto com o porta-enxerto e influenciando na presença de tecido parenquimático ou tecido da casca na região de justaposição (HARTMANN et al., 2011; BARBOSA FILHO et al., 2016), além de fatores genéticos dos materiais. Essas características particulares da técnica de enxertia podem ter contribuído para formação de outras rotas metabólicas quando comparadas com as demais técnicas de propagação com a espécie *E. microcorys*, sendo esse resultado promissor para estudos avançados dentro dos limites nessas regiões.

### 3.2. Peroxidase

Para verificar a atividade de peroxidase foi realizado a quantificação da enzima por meio de amostras foliares das diferentes técnicas de propagação de *E. microcorys*. A análise de variância dos dados revelou efeito significativo dos indivíduos propagados com a atividade da peroxidase (Tabela 2).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para a atividade de peroxidase em amostras foliares obtidas por meio de diferentes técnicas de propagação de *Eucalyptus microcorys*.

Causas da variação	GL	Quadrados médios
Técnicas de propagação	4	0,0164*
Resíduo	20	0,0012
Média	-	1,24
CV (%)	-	10,48

\* Valor significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. Dados transformados por  $[(n+0,5)/100]^{0,5}$ ; onde n = dado amostrado. GL = graus de liberdade, CV = coeficiente de variação. Fonte: O Autor (2020).

Os indivíduos resgatados por meio da micropropagação com brotos epicórmicos apresentaram os maiores valores médios na atividade da enzima, sendo estatisticamente superior aos demais. Os indivíduos propagados por meio da enxertia apresentaram a segunda maior atividade de peroxidase, seguidos pelos propagados via organogênese indireta (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores médios da atividade de peroxidase em amostras foliares obtidas por meio de diferentes técnicas de propagação de *Eucalyptus microcorys*.

Indivíduos	Atividade de peroxidase (nMol tetraguaiacol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> MF)
Planta matriz	0,0107 (±0,0017) d
Muda via seminal	0,0864 (±0,0559) d
Enxertia	1,7545 (±0,5730) b
Micropropagação (brotações epicórmicas)	4,0301 (±0,7121) a
Micropropagação (organogênese indireta)	0,3336 (±0,0800) cd
CV (%)	10,48

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Dados apresentados como: média ± erro padrão. CV = coeficiente de variação.

Fonte: O Autor (2020).



A atividade de peroxidase tem sido considerada um indicador bioquímico relacionado ao desenvolvimento de raízes adventícias. Estudos na literatura demonstram variações na atividade de peroxidase de acordo com os níveis de auxinas, sendo observado um aumento na atividade enzimática durante a fase de iniciação das raízes (FETT-NETO et al., 1992; SYROS et al., 2004; SCHWAMBACH et al., 2008).

De acordo com Aumond Jr et al. (2017), estudando eventos associados a competência do enraizamento adventício em plantas adultas de *Eucalyptus globulus*, relatam o aumento da atividade da peroxidase com a perda da competência do enraizamento, associando o aumento da enzima com a diminuição da atividade das auxinas, as quais são importantes fito-reguladores ligados ao enraizamento adventício em estacas. No presente estudo, a peroxidase apresentou relação com os materiais propagados de *E. microcorys*, apresentando maior expressão da enzima nas amostras via micropropagação com brotos epicórmicos, seguidas pelas amostras via enxertia.

A técnica de micropropagação apresenta diversas vantagens para a propagação de espécies florestais, principalmente para materiais adultos de difícil enraizamento, onde outras técnicas não conseguem obter sucesso no resgate de matrizes (JOSHI et al., 2003; OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013; WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014). Na literatura encontram-se estudos recomendando essa técnica de propagação vegetativa utilizando brotos epicórmicos, principalmente em espécies com elevada idade ontogenética, sendo relatado em *Ilex paraguariensis* com 19 anos de idade (WENDLING et al., 2013), *Eucalyptus benthamii* com 13 anos (BACCARIN et al., 2015) e *E. cloeziana* com 26 anos (OLIVEIRA et al., 2015). No presente estudo a atividade de peroxidase nos indivíduos propagados via micropropagação com brotos epicórmicos apresentou as maiores médias dessa enzima, resultando relação direta com o rejuvenescimento do material.

A atividade de peroxidase resultou a segunda maior expressão nas amostras de *E. microcorys* propagados via enxertia. A técnica de enxertia é um processo complexo, o qual contribui para várias rotas metabólicas entre enxerto e porta-enxerto (BARBOSA FILHO et al., 2016). Estudos indicam que em virtude do processo de cicatrização do ponto de enxertia, há um acúmulo de compostos fenólicos que aumentam a atividade de enzimas como a peroxidase, provocando distúrbios nas ligações vasculares entre enxerto e porta-enxerto, podendo tornar a compatibilidade dos tecidos mais difíceis (PINA; ERREA, 2005; ZARROUK et al., 2010). No presente estudo, a porcentagem de pegamento dos enxertos foi relativamente baixa, mas a principal justificativa foi atribuída a elevada idade ontogenética da planta matriz,

sendo a técnica de enxertia a única que resultou sucesso no resgate perante as demais técnicas *in vitro*.

Com relação aos menores valores estatísticos da atividade de peroxidase em *E. microcorys*, esses foram apresentados nas amostras da planta matriz e das mudas via seminal (Tabela 3). A planta matriz apresentou a menor média absoluta na atividade de peroxidase, fato esse decorrente de sua elevada idade ontogenética, que conseqüentemente diminui sua capacidade de enraizamento e suas rotas metabólicas. As mudas propagadas via seminal, possivelmente apresentaram baixa atividade de peroxidase por não necessitarem da formação de raízes adventícias ou cicatrização de tecidos, como ocorrem em outras técnicas de propagação.

### 3.3. Equipamento pXRF

De acordo com a leitura das concentrações elementares dos indivíduos propagados de *E. microcorys* pelo equipamento pXRF, foi confeccionada a tabela 4 demonstrando os teores dos nutrientes de fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), zinco (Zn), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e silício (Si). Não foi possível realizar a análise com os materiais *in vitro* pois o equipamento pXRF não possui capacidade de leitura com amostras de dimensões pequenas.

Tabela 4 - Teores dos macros e micronutrientes realizados pela leitura do equipamento pXRF utilizando amostras foliares obtidas por meio de diferentes técnicas de propagação de *Eucalyptus microcorys*.

Indivíduos	Nutrientes									
	P	K	Ca	Mg	S	Zn	Fe	Cu	Mn	Si
	g.kg <sup>-1</sup>					mg.kg <sup>-1</sup>				
(1) Planta matriz	0,68	7,93	14,01	18,61	1,93	19,5	305	16,5	1.087	1048
(2) Muda via seminal	1,76	18,08	3,1	<0,01	2,47	38,5	219	10,5	276	821
(3) Enxertia	1,25	16,94	3,6	<0,01	1,44	55,5	104	<0,01	141	889
(4) Micropropagação (brotações epicórmicas)	0,75	16,92	6,54	15,03	1,42	25,5	214	31	148,5	848
(5) Micropropagação (organogênese indireta)	2,08	16,6	6,52	16,43	2,49	25,5	178	9	142,5	858

Fonte: O Autor (2020).



Uma das principais vantagens do pXRF é a capacidade de relatar simultaneamente vários elementos, incluindo metais e elementos essenciais das plantas (MCGLADDERY et al., 2018). Avaliando os teores de P, os indivíduos de *E. microcorys* apresentaram comportamento variável entre os métodos de propagação, estando as mudas via seminal e organogênese indireta com os maiores teores médios. Segundo valores propostos por Higashi, Silveira e Gonçalves (2004) nenhum dos indivíduos apresentou teores adequados de P. Os teores de K apresentaram maior similaridade com as técnicas de propagação, estando todos com valores acima de  $16 \text{ g.kg}^{-1}$ , sendo considerados com níveis adequados desse nutriente.

O K é o segundo nutriente mais exigido pelas plantas, tendo como principal função a ativação enzimática e sua deficiência acarreta algumas mudanças químicas, tendo reflexo direto na produção de carboidratos, fonte essencial de energia para indução de raízes (SILVA et al., 2011; SOUZA et al., 2019). No presente estudo apenas a planta matriz de *E. microcorys* apresentou deficiência do elemento K, com teor de  $7,93 \text{ g.kg}^{-1}$  (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2004).

Com relação ao Ca, pôde-se verificar uma variação grande entre os indivíduos de *E. microcorys*, estando o maior valor apresentado pela planta matriz, com média de  $14 \text{ g.kg}^{-1}$ . O Ca tem função constituinte na fotossíntese, no movimento citoplasmático, nos tecidos vegetais e na parede celular, garantindo desenvolvimento da parte aérea e das raízes, de modo que sua deficiência pode interferir no processo de iniciação e expressão da raiz (MÜLLER et al., 2017; SOARES et al., 2018). Higashi, Silveira e Gonçalves et al. (2000) em estudos com *Eucalyptus*, concluíram que as concentrações de cálcio em níveis adequados contribuem para uma maior porcentagem de enraizamento de propágulos clonais. No presente estudo, os resgates por meio das duas formas de micropropagação apresentaram valores adequados de Ca, estando entre  $5$  a  $7 \text{ g.kg}^{-1}$ , enquanto os resgates via enxertia e via seminal foram considerados com teores baixos, com aproximadamente  $3 \text{ g.kg}^{-1}$  (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2004).

De acordo com Higashi, Silveira e Gonçalves (2000) avaliando interação nutricional em *Eucalyptus*, quanto maior a concentração de Mg maiores são os efeitos negativos a formação de raízes. No presente estudo, não foram detectadas a presença de Mg nos indivíduos propagados via enxertia e via seminal (Tabela 4). Os demais indivíduos apresentaram valores superiores a  $15 \text{ g.kg}^{-1}$ , estando a planta matriz com o maior teor absoluto.

Os teores de S apresentaram pouca relação entre os indivíduos propagados de *E. microcorys*, resultando em variações entre  $1,42$  a  $2,49 \text{ g.kg}^{-1}$ . De acordo com valores propostos por Higashi, Silveira e Gonçalves (2004) nenhum dos indivíduos apresentou deficiência ou

excesso de S, estando os propagados via seminal e via organogênese indireta com valores considerados adequados para esse elemento.

Por meio da análise dos macronutrientes, foi possível verificar uma diferenciação entre os indivíduos propagados de *E. microcorys* pelos elementos K e Ca, principalmente com os teores apresentados pela planta matriz. Segundo Alfenas et al. (2009), teores adequados de nutrientes como K e Ca são importantes para o processo de diferenciação e formação de raízes das plantas.

Com relação aos micronutrientes, o elemento Zn apresentou relação com os materiais propagados de *E. microcorys*, podendo caracterizar os dois resgates pela micropropagação com teores baixos desse elemento, e o resgate pela enxertia e via seminal com teores adequados. O menor valor médio foi observado pela planta matriz, com  $19,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , resultando deficiência desse micronutriente (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2004).

Segundo Hartmann et al. (2011), o aumento dos níveis endógenos de ácido indolacético (AIA), auxina ligada ao enraizamento adventício, pode ser favorecido pela presença de Zn por meio de seu efeito no aumento da produção de triptofano, precursor natural do AIA e de substâncias de reserva. Estudos similares foram verificados por Schwambach, Fadanelli e Fett-Neto (2005) com *Eucalyptus globulus* e por Cunha et al. (2009c) com *E. grandis* e *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* quanto ao efeito positivo do Zn ao enraizamento adventício de mini-estacas. No presente estudo os teores de Zn resultaram efeito positivo com os níveis de rejuvenescimento e revigoramento, ao enraizamento dos materiais de *E. microcorys*.

O elemento Fe apresentou valores variando de 104 a  $305 \text{ mg.kg}^{-1}$  nos indivíduos de *E. microcorys*, estando apenas a planta matriz fora dos valores considerados adequados para esse elemento (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2004). Na literatura é relatado que o Fe está relacionado com a biossíntese da enzima ligadas as rotas da peroxidase, a qual está envolvida diretamente no crescimento e expansão celular, diferenciação e desenvolvimento de raízes, catabolismo de auxina e lignificação (FANG; KAO, 2000; KIRKBY; ROMHELD, 2007; CUNHA et al., 2009c). No presente estudo, não foi possível detectar similaridade das análises de peroxidase com os teores de Fe nos indivíduos de *E. microcorys*.

O Cu e Mn apresentaram uma ampla variação entre as amostras dos indivíduos propagados de *E. microcorys*. Não foi detectado a presença de Cu no material propagado via enxertia, enquanto os indivíduos propagados via seminal e via organogênese indireta apresentaram valores adequados desse elemento (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2004). Os teores de Mn resultaram em valores elevados nas amostras da planta matriz,

correspondendo a 1087 mg.kg<sup>-1</sup>, seguido pelas mudas via seminal com 276 mg.kg<sup>-1</sup>, o qual foi a única com níveis adequados. Os demais materiais apresentaram teores com deficiência de Mn (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2004), com resultados próximos a 145 mg.kg<sup>-1</sup> (Tabela 4).

Com relação ao Si, as leituras ocorreram entre 821 a 1048 mg.kg<sup>-1</sup>, estando a planta matriz com o maior teor desse elemento. O Si não é comumente utilizado na avaliação nutricional de plantas, não havendo na literatura uma recomendação adequada de seus teores.

Apesar da importância da nutrição mineral no enraizamento adventício, há carência de informações sobre determinados nutrientes na cultura de *Eucalyptus*. A tabela proposta por Higashi, Silveira e Gonçalves (2004) propõe interpretações de nutrientes em brotações de *Eucalyptus*, porém seus valores considerados como adequados atendem a algumas situações e clones comerciais, não podendo ser extrapolada a todos os materiais genéticos, nem a todos os nutrientes (CUNHA et al., 2009b). Para o estudo em questão, o uso dessa tabela como referência contribuiu ao objetivo proposto para verificar possíveis indicativos do rejuvenescimento e revigoração de materiais propagados de *E. microcorys*.

Por mais que o uso do pXRF seja voltado para análises elementares de solos, estudos demonstram sua eficácia para avaliar a composição elementar de tecidos foliares e de sementes de plantas (MCLAREN; GUPPY; TIGHE, 2012; PALTRIDGE et al., 2012a). Towet et al. (2016) avaliaram a composição das folhas de várias plantas usando pXRF e observaram uma alta correlação ( $R^2 > 0,90$ ) para os teores de Mg, P, S, K, Ca e Mn com os métodos padrões. No presente estudo os elementos que apresentaram as melhores respostas para a distinção dos materiais propagados de *E. microcorys* foram K, Ca, Zn, Fe, Mn, Si.

Dessa forma, por meio dos resultados obtidos pelos testes de proteína total, peroxidase e pelas leituras realizadas pelo pXRF, novos trabalhos nessa temática são recomendados a fim de buscar outros métodos que apresentem similaridades com as respostas ao enraizamento em espécies lenhosas, facilitando assim o melhor entendimento para o resgate de materiais com elevada idade ontogenética.

#### 4. CONCLUSÕES

O teste de proteínas totais (TCA/Acetona/Fenol) proporcionou um grande número na formação de bandas no gel SDS, sendo verificado duas regiões distintas pelo resgate via enxertia.

O teste com peroxidase proporcionou formação de diferentes perfis entre as técnicas de propagação, sendo observado maior atividade enzimática nas amostras via micropropagação por brotos epicórmicos.

As leituras pelo pXRF detectou grande amplitude nas concentrações dos elementos entre as técnicas de propagação com a planta matriz, sendo as maiores diferenças verificadas em K, Ca, Zn, Fe, Mn, Si.

Dentre os testes realizados para investigação de possíveis indicativos do rejuvenescimento e/ou revigoramento de tecidos de *E. microcorys*, a atividade de peroxidase proporcionou as melhores respostas associadas a tais eventos.

## 5. REFERÊNCIAS

AGRAWAL, G. K. et al. Translational plant proteomics: a perspective. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 75, n. 15, p. 4588-4601, 2012.

AHSAN, N. et al. Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 330, n. 10, p. 735-746, 2007.

AHSAN, N.; RENAUT, J.; KOMATSU, S. Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. **Proteomics**, Weinheim, v. 9, n. 10, p. 2602-2621, 2009.

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa: Ed. UFV, 2ª edição, 2009. 500 p.

AUMOND JR, M. L. et al. Events associated with early age-related decline in adventitious rooting competence of *Eucalyptus globulus* Labill. **Frontiers in Plant Science**, Switzerland, v. 8, n. 1734, p. 1-10, 2017.

BACCARIN, F. J. B. et al. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New Forests**, Dordrecht, v. 46, p. 465-483, 2015.

BARBOSA FILHO, J. et al. Propagation of *Khaya anthotheca*: interspecific grafting with *Swietenia macrophylla* and air layering. **Cerne**, Lavras, v. 22, n. 4, p. 475-484, 2016.

BELLINI, C.; PACURAR, D. I.; PERRONE, I. Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 65, n. 1, p. 639-666, 2014.

BOAVA, L. P. et al. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 36, n. 2, p. 168-172, 2010.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRONDANI, G. E. et al. Nutritional content in *Eucalyptus benthamii* mini-stump leaves. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 36, n. 4, p. 465-474, 2014.
- COX, J.; MANN, M. Is proteomics the new genomics? **Cell**, Cambridge, v. 130, n. 3, p. 395-398, 2007.
- CUNHA, A. C. M. C. M. et al. Papel da nutrição mineral na formação de raízes adventícias em plantas lenhosas. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 33-47, 2009a.
- CUNHA, A. C. M. C. M. et al. Relação do estado nutricional de minicepas com o enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 3, p. 591-599, 2009b.
- CUNHA, A. C. M. C. M. et al. Influência do estado nutricional de minicepas no enraizamento de miniestacas de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 607-615, 2009c.
- DUNAND, C.; CRÈVECOEUR, M.; PENEL, C. Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. **New Phytol**, Malden, v. 174, n. 2, p. 332-341, 2007.
- FANG, W. C.; KAO, C. H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. **Plant Science**, Clare, v. 158, n. 1-2, p. 71-76, 2000.
- FETT-NETO, A. G. et al. Biochemical and morphological changes during *in vitro* rhizogenesis in cuttings of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 140, n. 6, p. 720-728, 1992.
- GARCÍA-LIMONES, C. et al. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, n. 6, p. 325-337, 2002.
- GASPAR, T. et al. Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. **Agronomie**, Les Ulis, v. 12, n. 10, p. 757-765, 1992.
- GOULART, P. B.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M. Efeito de antioxidantes no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* clones. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 961-972, 2010.
- HARTMANN, H.T. et al. **Hartmann & Kester's Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Ed. Prentice Hall, 8<sup>a</sup> edition, 2011. 928 p.
- HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. Propagação vegetativa do *Eucalyptus*: princípios básicos e sua evolução no Brasil. **Circular Técnica - IPEF**. Piracicaba, v. 192, p. 1-11, 2000.

HIGASHI, E. N.; ; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. Nutritional monitoring and fertilization in clonal macro, mini and microgardens. In: GONÇALVES, J. L. M.; BENEDETI, V. (Eds.). **Forest nutrition and fertilization**. Piracicaba: IPEF, 2004. cap. 8, p.195-221.

JOSHI, I. et al. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. × *E. grandis* Hill ex Maiden). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.52, n.3-4, p.110-113, 2003.

KIRKBY, E. A.; RÖMHELD, V. Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v. 118, n. 2, p. 1-24, 2007.

KOCH, J. et al. Proximal sensor analysis of mine tailings in South Africa: an exploratory study. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 181, p. 45-57, 2017.

KOSOVÁ, K. et al. Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 74, n. 8, p. 1301-1322, 2011.

LI, S. W. et al. Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber. **Plant Growth Regul**, Dordrecht, v. 52, n. 2, p. 173–180, 2007.

LI, S. W. et al. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 63-71, 2009.

MCGLADDERY, C. et al. Elemental assessment of vegetation via portable X-ray fluorescence (PXRF) spectrometry. **Journal of Environmental Management**, London, v. 210, p. 210-225, 2018.

MCLAREN, T. I.; GUPPY, C. N.; TIGHE, M. K. A rapid and nondestructive plant nutrient analysis using portable x-ray fluorescence. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 76, n. 4, p. 1446-1453, 2012.

MOURA, V. P. G. et al. **Avaliação de espécies e procedências de *Eucalyptus* em Minas Gerais e Espírito Santo: resultados parciais**. Embrapa CPAC, Boletim de pesquisa 1 (INFOTECA-E), Brasília, 1980. 104p.

MÜLLER, C. et al. Nutritional efficiency of *Eucalyptus* clones under water stress. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 41, p. 1-17, 2017.

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

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Japan, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

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, 2013.

- OLIVEIRA, L. S. et al. Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. **Australian Forestry**, Yarralumla, v. 78, n. 4, p. 219-231, 2015.
- PADRO, D. Z. et al. Can hydrogen peroxide and quercetin improve production of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*? **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 13, n. 28, p. 2819-2829, 2014.
- PALTRIDGE, N. G. et al. Energy-dispersive X-ray fluorescence analysis of zinc and iron concentration in rice and pearl millet grain. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 361, n. 1-2, p. 251-260, 2012a.
- PALTRIDGE, N. G. et al. Energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry as a tool for zinc, iron and selenium analysis in whole grain wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 361, n. 1-2, p. 261-269, 2012b.
- PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 11, p. 534–540, 2004.
- PEARSON, D. et al. Water analysis via portable X-ray fluorescence spectrometry. **Journal of Hydrology**, Amsterdam, v. 544, p. 172-179, 2017.
- PINA, A.; ERREA, P. A review of new advances in mechanism of graft compatibility–incompatibility. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 1-11, 2005.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing, reference index version 3.6.1**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019.
- SACRISTÁN, D.; ROSSEL, R. A. V.; RECATALÁ, L. Proximal sensing of Cu in soil and lettuce using portable X-ray fluorescence spectrometry. **Geoderma**, Amsterdam, v. 265, p. 6-11, 2016.
- SCHUCH, M. W. et al. Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar climax. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 814-820, 2008.
- SCHWAMBACH, J.; FADANELLI, C.; FETT-NETO, A. G. Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, Canada, v. 25, n. 4, p. 487-494, 2005.
- SCHWAMBACH, J. et al. Adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* × *maidennii* mini-cuttings derived from mini-stumps grown in sand bed and intermittent flooding trays: a comparative study. **New Forests**, Dordrecht, v. 36, n. 3, p. 261-271, 2008.
- SEBASTIANI, L.; TOGNETTI, R. Growing season and hydrogen peroxide effects on root induction and development in *Olea europaea* L. (cvs ‘Frantoio and ‘Gentile di Larino’) cuttings. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 100, n. 1-4, p. 75–82, 2004.
- SILVA, E. V. et al. Functional specialization of *Eucalyptus* fine roots: contrasting potential uptake rates for nitrogen, potassium and calcium tracers at varying soil depths. **Functional Ecology**, England, v. 25, n. 5, p. 996-1006, 2011.

- SOARES, T. et al. Calcium and potassium imbalance favours leaf blight and defoliation caused by *calonectria pteridis* in *Eucalyptus* plants. **Forests**, Switzerland, v. 9, n. 12, p. 782, 2018.
- SOUZA, N. M. et al. The ideal percentage of K substitution by Na in *Eucalyptus* seedlings: Evidences from leaf carbon isotopic composition, leaf gas exchanges and plant growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 137, p. 102-112, 2019.
- SYROS, T. et al. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 161, n. 1, p. 69-77, 2004.
- TOWETT, E. K.; SHEPHERD, K. D.; LEE DRAKE, B. Plant elemental composition and portable X-ray fluorescence (pXRF) spectroscopy: quantification under different analytical parameters. **X-Ray Spectrometry**, Antuérpia, v. 45, n. 2, p. 117-124, 2016.
- WEINDORF, D. C.; BAKR, N.; ZHU, Y. Advances in portable X-ray fluorescence (pXRF) for environmental, pedological, and agronomic applications. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 128, p. 1-45, 2014.
- WEINDORF, D. C.; CHAKRABORTY, S. Portable X-ray fluorescence spectrometry analysis of soils. **Methods of Soil Analysis**, Madison, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2016.
- WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 8, n. 1, p. 187-194, 2001.
- WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência da miniestaquia seriada no vigor radicular de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 681-689, 2005.
- WENDLING, I. et al. Vegetative propagation of adult *Ilex paraguariensis* trees through epicormic shoots. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 1, p. 117-125, 2013.
- WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry - part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, Dordrecht, v. 45, n. 4, p. 473-486, 2014.
- XAVIER, A.; WENDLING, L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: Ed. UFV, 2ª edição, 2013. 279 p.
- ZANOL, G. C. et al. Escuro e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* e atividade da peroxidase de porta-enxerto de macieira, cv. Marubakaido (*Malus prunifolia*). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 3, n. 1, p. 23-30, 1997.
- ZARROUK, O. et al. Changes in cell/tissue organization and peroxidase activity as markers for early detection of graft incompatibility in peach/plum combinations. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 135, n. 1, p. 9-17, 2010.



## ANEXOS

Tabela A - Composição básica dos meios de cultura MS e WPM utilizados para o cultivo *in vitro* de *Eucalyptus microcorys*.

Nutriente		MS <sup>(1)</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	WPM <sup>(2)</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	
	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	551,71	135,89	
	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	288,61	69,97	
	P	38,69	38,69	
	Ca	119,95	120,54	
	K	783,86	493,11	
	S	55,5	237,67	
	Mg	36,49	36,49	
	B	1,08	1,08	
	Cu	0,006	0,064	
	Fe	5,58	5,58	
	Mo	0,1	0,1	
	Mn	5,49	5,49	
	Zn	1,96	1,96	
	Co	0,006	-	
Fonte de Macro e Micronutrientes		FQ / PM	(mg.L <sup>-1</sup> )	(mg.L <sup>-1</sup> )
	Nitrato de amônio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> / 80,04	1.650,00	400
	Nitrato de potássio	KNO <sub>3</sub> / 101,10	1.900,00	-
	Cloreto de cálcio	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O / 147,02	440	96
	Nitrato de cálcio	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O / 236,15	-	556
	Fosfato de potássio monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / 136,09	170	170
	Sulfato de potássio	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / 174,26	-	990
	Sulfato de magnésio	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O / 246,48	370	370
	Sódio - EDTA	Na <sub>2</sub> -EDTA.2H <sub>2</sub> O / 372,24	37,3	37,3
	Sulfato de ferro	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O / 278,02	27,8	27,8
	Sulfato de manganês	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O / 169,01	16,9	16,9
	Sulfato de zinco	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O / 287,54	8,6	8,6
	Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> / 61,83	6,2	6,2
	Iodeto de potássio	KI / 166,01	0,83	-
	Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O / 249,68	0,025	0,25
	Molibdato de sódio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O / 241,95	0,25	0,25
	Cloreto de cobalto	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O / 237,93	0,025	-
Fonte de Vitamina		FQ / PM	(mg.L <sup>-1</sup> )	(mg.L <sup>-1</sup> )
	Tiamina-HCl	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> C <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> .xH <sub>2</sub> O/337,27	1	1
	Piridoxina-HCl	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>3</sub> / 205,64	0,5	1
	Ácido nicotínico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> / 123,11	0,5	1
	Pantotenato Ca <sup>2+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> CaN <sub>2</sub> O <sub>10</sub> / 476,54	-	1
	Biotina	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S / 244,30	-	1
Fonte de Aminoácido		FQ / PM	(mg.L <sup>-1</sup> )	(mg.L <sup>-1</sup> )
	Glicina	H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> COOH / 75,07	2	1
Fonte de Carbono		FQ / PM	(mg.L <sup>-1</sup> )	(mg.L <sup>-1</sup> )
	Mio-inositol	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> / 180,20	100	100
	Sacarose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> / 342,30	30.000,00	20.000,00
Agente polimerizador			(mg.L <sup>-1</sup> )	(mg.L <sup>-1</sup> )
	Ágar		6.000,00	6.000,00

<sup>(1)</sup>Adaptado segundo Murashige e Skoog (1962). <sup>(2)</sup>Adaptado segundo Lloyd e McCown (1980). FQ = fórmula química, PM = peso molecular.