

DULCINÉIA DE CARVALHO

MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus grandis* HILL ex MAIDEN
ATRAVÉS DA CULTURA IN VITRO DE
SEGMENTOS NODAIS

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do grau de "MESTRE".

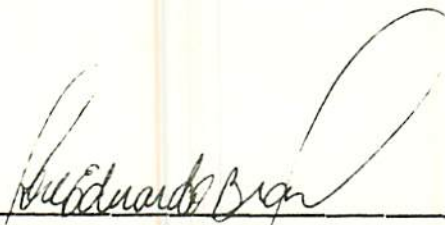
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS

LAVRAS - MINAS GERAIS

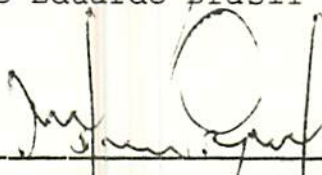
1988

MICROPROPAGAÇÃO DE Eucalyptus grandis HILL ex MAIDEN ATRAVÉS DA
CULTURA IN VITRO DE SEGMENTOS NODAIS

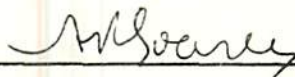
APROVADA:



Prof. José Eduardo Brasil Pereira Pinto



Prof. Moacir Pasqual



Prof. Antônio Resende Soares



Prof. Sebastião Carlos da Silva Rosado

À memória de meu pai,

João Antônio

e meu avô

Anthero

HOMENAGEM

À minha mãe Irene,

à minha família,

pelo incentivo, carinho e esperança

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Às seguintes instituições, pela oportunidade do curso e facilidades no desenvolvimento do trabalho de tese:

- . Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL);
- . Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- . Laboratório de Cultura de Tecidos da ESAL;
- . Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEPE);
- . Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- . Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

À amizade, incentivo, apoio e colaboração de:

- . Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto;
- . Dr. Moacir Pasqual;
- . Ph.D. Marcos Paiva;
- . M.Sc. Sebastião Carlos da Silva Rosado;
- . Dr. Antônio Resende Soares;

- . Dr. Nelson Ventorim;
 - . Ph.D. Yara Ikemori;
 - . M.Sc. Francisco Augusto Alves Câmara;
 - . Eng^o Agr^o Márcio de Castro Silva Filho;
 - . Eng^o Agr^o Leda Gonçalves;
 - . M.Sc. João Maurício Cavalcante Alves;
 - . Eng^o Agr^o Paulo Henrique Pereira Peixoto;
 - . M.Sc. Sérgio Alves de Carvalho;
 - . Acadêmico de graduação José César Nascimento Carval-
- lho;
- . Acadêmico de graduação Patrícia Andrade Lopes;
 - . Laboratorista Evaldo de Souza Arantes;
 - . Laboratorista Vantuil Antônio Rodrigues;
 - . Bibliotecário Luiz Carlos de Miranda.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

DULCINÉIA DE CARVALHO, filha de João Antônio de Carvalho e Irene Maria de Carvalho, nasceu em Carrancas, Estado de Minas Gerais, a 09 de agosto de 1961.

Concluiu o curso superior na Escola Superior de Agricultura de Lavras, Minas Gerais, no ano de 1985, recebendo o título de Engenheiro Florestal.

Em março de 1986, iniciou o curso de pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, à nível de Mestrado, na Escola Superior de Agricultura de Lavras.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	(1)
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. <u>Eucalyptus grandis</u> Hill ex Maiden	3
2.2. Sistema de gemas do <u>Eucalyptus</u>	4
2.3. Cultura de <u>Eucalyptus</u> em sistemas <u>in vitro</u>	6 x
2.3.1. Cultura de calo e suspensão de células ...	6
2.3.2. Cultura de órgãos	7
2.3.2.1. Cultura de raiz	7
2.3.2.2. Cultura de brotos	7
2.3.2.3. Cultura de embrião	8
2.3.2.4. Cultura de antera	9
2.4. Fatores que afetam a cultura <u>in vitro</u> de órgãos de <u>Eucalyptus grandis</u>	10
2.4.1. Oxidação fenólica	(10)
2.4.2. Contaminação	14
2.5. Clonagem de <u>Eucalyptus</u>	16

	Página
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Assepsia	19
3.2. Meio de cultura	20
3.3. Condições ambientais de cultura	22
3.4. Testes experimentais	22
3.5. Cultura de segmentos nodais	24 X
3.5.1. Estabelecimento da cultura de segmentos no dais	24 X
3.5.2. Controle químico da contaminação fúngica .	24
3.5.3. Prevenção da oxidação fenólica	25
3.6. Propagação clonal de <u>Eucalyptus grandis</u>	26
3.6.1. Multiplicação <u>in vitro</u> de segmentos nodais	26 X
3.6.2. Obtenção de plântulas	27 X
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Contaminação fúngica e sobrevivência	28
4.2. Oxidação fenólica	33
4.3. Multiplicação	41
4.4. Obtenção de plântulas	48
4.4.1. Número de brotos	48
4.4.2. Altura média de plântulas	54
5. CONCLUSÕES	63
6. RESUMO	65
7. SUMMARY	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
APÊNDICE	76

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
1	Fluxograma utilizado para estabelecimento da cultura <u>in vitro</u> de segmentos nodais de <u>E. grandis</u>	23
2	Taxas de contaminação (%) de explantes de <u>E. grandis</u> inoculados em diferentes concentrações de Benomyl, meio sólido	30
3	Taxas de contaminação (%) de explantes de <u>E. grandis</u> inoculados em diferentes concentrações de Benomyl, meio líquido	31
4	Taxas de sobrevivência (%) de explantes de <u>E. grandis</u> inoculados em diferentes concentrações de Benomyl, meio sólido	34
5	Taxas de sobrevivência (%) de explantes de <u>E. grandis</u> inoculados em diferentes concentrações de Benomyl, meio líquido	35

Figuras

Página

6	Taxa de sobrevivência e correspondente percentagem de contaminação em explantes de <u>E. grandis</u> , sob efeito da concentração de 50 mg.l^{-1} de Benomyl em meio sólido	36
7	Intensidade de oxidação fenólica em explantes de <u>E. grandis</u> sob efeito de diferentes antioxidantes	39
8	Brotos obtidos através de segmentos nodais de <u>E. grandis</u> , em níveis crescentes de ANA	43
9	(a) Brotos de <u>E. grandis</u> inoculados em meio com BAP- $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ e em níveis crescentes de ANA. b) Brotos de <u>E. grandis</u> inoculados em meio com BAP- $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ e níveis crescentes de ANA .	44
10	(a) Brotos de <u>E. grandis</u> inoculados em meio com BAP- $2,0$ e $4,0$ e ANA- $0,0$ e $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$. (b) Brotos de <u>E. grandis</u> inoculados em meio com BAP- $2,0$ e $4,0$ e ANA- $0,2$ e $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$	45
11	Número médio de brotos de <u>E. grandis</u> em diferentes concentrações de BAP e ANA, primeira avaliação	50
12	Número médio de brotos de <u>E. grandis</u> em diferentes concentrações de BAP e ANA, segunda avaliação	51

Figuras

Página

13	Número médio de brotos de <u>E. grandis</u> em diferentes concentrações de BAP e ANA, na terceira avaliação	53
14	Altura média de plântulas obtidas em cultura <u>in vitro</u> de segmentos nodais de <u>E. grandis</u>	58
15	Plântula de <u>E. grandis</u> obtida através da cultura <u>in vitro</u> de segmento nodal.....	60
16	Formação de raízes em plântulas de <u>E. grandis</u> obtidas <u>in vitro</u>	61
17	Escurecimento de plântula de <u>E. grandis</u> obtida <u>in vitro</u>	62

LISTA DE QUADROS

Quadros		Página
1	Composição de fenóis de extratos de folhas de <u>Eucalyptus grandis</u> em luz (8000 lux) e escuro.	12
2	Composição do meio de cultura de FOSSARD	21
3	Avaliação dos tratamentos para explantes de <u>E. grandis</u> , em meio de FOSSARD, suplementado com diferentes concentrações de Benomyl.....	29
4	Avaliação dos tratamentos para explantes de <u>E. grandis</u> em meio de FOSSARD, suplementado com diferentes concentrações de Benomyl.....	33
5	Número e percentagem de explantes de <u>Eucalyptus grandis</u> oxidados e não oxidados em diferentes substâncias antioxidantes	37
6	Número e percentagem de explantes de <u>Eucalyptus grandis</u> oxidados e não oxidados, inoculados em meio sólido e líquido e em diferentes concentrações de polivinilpirrolidona (PVP) ..	40

Quadros

Página

7	Número médio de brotos obtidos em cultura <u>in vitro</u> de segmentos nodais de <u>E. grandis</u> em diferentes concentrações de BAP e ANA	42
8	Número médio de brotos obtidos em cultura <u>in vitro</u> de segmentos nodais de <u>E. grandis</u> utilizando-se 1, 2 ou 3 brotos em concentrações diferentes de BAP	47
9	Número médio de brotos obtidos em culturas <u>in vitro</u> de segmentos nodais de <u>E. grandis</u> , em diferentes concentrações de BAP e ANA, em três avaliações	49
10	Altura média (cm) de plântulas obtidas em cultura <u>in vitro</u> de segmentos nodais de <u>E. grandis</u> , em diferentes concentrações de BAP e ANA em três avaliações	55
11	Altura média (cm) de plântulas obtidas em cultura <u>in vitro</u> de segmentos nodais de <u>E. grandis</u> em diferentes concentrações de GA ₃ e ANA, em três avaliações	57
12	Número médio de brotos com mais de 0,5 cm de comprimento obtidos em cultura <u>in vitro</u> de segmentos nodais de <u>E. grandis</u> em diferentes concentrações de GA ₃ e ANA	59

LISTA DE ABREVIATURAS

A caracterização do meio de cultura e as diversas substâncias que compõem o meio são referidas no decorrer do trabalho através de abreviaturas cujo significado é dado a seguir:

AIB	Ácido indol butírico
ANA	Ácido naftaleno acético
BAP	6-Benzilaminopurina
GA ₃	Ácido giberélico
NaOCl	Hipoclorito de sódio
PVP	Polivinilpirrolidona
Tween 20	Polioxietileno sorbitan monolanato

1. INTRODUÇÃO

O eucalipto, pela sua extensa área plantada no Brasil e pelo seu potencial de utilização como matéria prima para as indústrias madeireiras representa, sem dúvida, o nosso mais importante gênero de espécie florestal exótica.

A cultura do eucalipto é responsável, atualmente, por quase 2 milhões de hectares de florestas plantadas em Minas Gerais, o que representa cerca de 36% da área total reflorestada no Brasil.

Dentre as espécies mais usualmente utilizadas destacam-se: Eucalyptus grandis Hill ex Maiden, Eucalyptus saligna Smith e Eucalyptus urophylla S.T. Blake, sendo que a madeira dessas espécies destina-se principalmente à indústria de celulose e papel, chapas duras e para a produção de carvão. Grande ênfase vem sendo dada atualmente para sua utilização em serraria.

Grande parte dos plantios existentes no Brasil revelam uma mistura de híbridos de diversos graus e entre diversas espécies, devido a grande facilidade de cruzamento entre espécies,

associada à falta de cuidados de talhões inicialmente implantados. Esta hibridação natural difundida ocorre em plantações de importantes espécies de eucaliptos no Brasil e a heterogeneidade das sementes, como resultado, tem embaraçado a seleção de indivíduos puros, RIZZINI (42).

Em virtude dessa realidade, a clonagem de árvores superiores tem sido utilizada como ferramenta nos programas de melhoramento florestal. Entretanto, o uso de métodos usuais de propagação vegetativa tem tido pouco sucesso com eucaliptos, devido à rejeição de enxertos e à produção de inibidores de enraizamento em tecidos adultos, PATON et alii (39).

A cultura de células e de tecidos oferece um método alternativo de propagação vegetativa pois apresenta um grau de multiplicação maior, não apresenta incompatibilidade, exige pouco espaço e tempo e as técnicas são mais confiáveis visto que há um grande controle de fatores físicos e químicos.

Objetivou-se com o presente trabalho: 1) determinar outros meios in vitro para redução da contaminação fúngica e oxidação fenólica nas primeiras subculturas; 2) estabelecer a cultura in vitro de segmentos nodais de E. grandis Hill ex Maiden de explantes oriundos do campo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Eucalyptus grandis Hill ex Maiden

O Eucalyptus grandis é uma espécie de árvore de grande porte, com alturas variando de 42 a 55 m e diâmetros máximos em torno de 1,2 a 1,8 m, em sua área de ocorrência natural. O fuste apresenta-se com boa forma, limpo e boa desrrama natural até cerca de dois terços da altura, HALL et alii (26).

A espécie ocorre naturalmente na Austrália, desde Newcastle, New South Wales até Atherton, Queensland, em forma descontínua e fragmentada por uma longa faixa costeira, estendendo-se por uma faixa latitudinal de 32°35' (NSW) a 17° (Qld), em altitudes variando de 300 (NSW) a 750 m (Qld), HALL et alii (26) e GOLFARI et alii (20).

No Brasil, o E. grandis tem encontrado condições ideais para seu desenvolvimento sob condições ambientais diversas, abrangendo amplas faixas climáticas, GOLFARI et alii (20).

Os primeiros exemplares da espécie foram introduzidos no Brasil, antes de 1914, por Navarro de Andrade. Introduções re-

centes dessa espécie para plantios comerciais foram de materiais existentes na República da África do Sul, Zimbábwe e Angola. Estas recentes introduções foram de grande importância para melhorar a qualidade dos plantios brasileiros, em virtude da espécie possuir qualidades excelentes, superando várias outras em incrementos volumétricos, boa qualidade da madeira para celulose e qualidades razoáveis para carvão e serraria, em condições climáticas adequadas, GOLFARI et alii (20).

2.2. Sistema de gemas do Eucalyptus

As espécies do gênero Eucalyptus possuem três tipos de gemas: nuas, acessórias e proventícias, PENFOLD & WILLIS (40). Na axila de cada folha existe uma gema pedunculada, que por não ter proteção de escamas como as de muitas plantas, é conhecida como gema nua; e duas gemas acessórias, CAREY (11). Sob as gemas nuas, nos tecidos da axila foliar está o tecido meristemático capaz de diferenciar-se em gemas acessórias. Em circunstâncias normais, essas gemas acessórias são suprimidas por hormônios produzidos pelas folhas e gemas nuas. Quando a dominância apical é removida, as gemas nuas distantes das gemas apicais que tem o desenvolvimento inibido, iniciam um processo de diferenciação, retomando o crescimento normal da planta. As gemas acessórias apresentam também a capacidade de inibir o desenvolvimento das gemas nuas (17, 39, 40, 41).

As gemas proventícias ou epicórmicas originam-se de tecidos da gema acessória, como uma pequena "flecha" que cresce radialmente, deste modo o caule ou galhos aumentam em área e podem ser vistos na superfície da madeira como uma pequena estrutura em formato de um "olho".

Os brotos epicórmicos normalmente não se desenvolvem em virtude do efeito inibidor dos brotos que estão acima deles. Entretanto, se a árvore for desfolhada, esta inibição é removida e os brotos surgem destes "olhos".

JACOBS (29), interpretou o sistema de gemas de Euca - lyptus como sendo o conjunto de gemas nuas e acessórias proventícios e não adventícios, pelo fato de terem origem definida. Verificou ainda que o tecido meristemático acessório da folha acompanha o crescimento cambial dando origem a um ou mais pontos de gemas dormentes ou epicórmicas, sendo que estas podem se fundir na base dando origem a uma estrutura bulbosa, chamada nó epicórmico.

Após completa desfoliação, os eucaliptos normalmente são cobertos com brotos epicórmicos em espécies que possuem "lignotuber", entretanto, isto não se verifica em espécies que possuem casca fina devido à ocorrência da morte do câmbio e gemas dormentes. Em espécies que não possuem "lignotuber", a desfoliação pode causar a morte de gemas proventícias, como em E. regnans ou não prejudicar as gemas epicórmicas, como em E. grandis, que possuem uma casca rude na base do tronco.

Fisiologicamente, a formação de brotos é difícil de ser interpretada devido à interrelação entre vários efeitos ambi-

entais como: injúria, temperatura, luz, água e nutrientes. A teoria mais aceitável com relação à formação de brotos, baseia-se no controle do hormônio inibidor, provavelmente a auxina, produzido na copa da árvore (3, 38, 40).

2.3. Cultura de Eucalyptus em sistemas in vitro

Nos programas de melhoramento de árvores, a propagação vegetativa permite a manutenção de características superiores, obtendo-se clones, ou seja, material geneticamente uniforme, constituindo uma base conveniente para trabalhos. Nos casos em que métodos de propagação vegetativa como a estaquia se tornam difíceis ou impraticáveis, abrem-se novas perspectivas com a cultura de células, tecidos ou órgãos vegetais, BAJAY (5).

Encontram-se na literatura, numerosos trabalhos sobre o emprego da cultura in vitro de essências florestais, utilizando diferentes espécies, diversos tipos de explantes, meios de cultura e condições de crescimento, relatando sucesso variável na regeneração de plântulas (9, 14, 24, 28, 31).

2.3.1. Cultura de calo e suspensão de células

Os trabalhos iniciais com Eucalyptus concentraram-se

nas culturas de calo. A cultura de calo foi estabelecida em várias espécies de eucaliptos utilizando-se diversos explantes e diferentes meios de cultura (1, 7, 10, 43, 44, 45).

Poucos trabalhos foram feitos com suspensão de células, porém SUSSEX (47) fez um estudo detalhado referente a friabilidade de calos de E. camaldulensis, estabelecendo cultura de suspensão de células, usando meio White suplementado com 5 μ m de 2,4-D e 15% de água de coco.

2.3.2. Cultura de órgãos

2.3.2.1. Cultura de raiz

A cultura de raízes isoladas de plantas lenhosas é geralmente mais difícil que em plantas herbáceas. Utilizando diversos meios de cultura e fatores de crescimento indefinidos BACHELARD & STOWE (3) não obtiveram diferenciação em raiz de E. camaldulensis. CRESSWELL & NITSCH (12), obtiveram um crescimento limitado em raízes de E. grandis em diferentes meios de cultura que não continham componentes indefinidos.

2.3.2.2. Cultura de brotos

Vários autores (14, 15, 16, 22, 28, 33, 45) estabeleceram brotos de várias espécies de Eucalyptus, a partir de diferentes meios de cultura e tipos de explantes. As taxas de multiplicação conseguidas variaram em função da espécie, do estado fisiológico do explante (juvenil ou adulto) e das condições ambientais de cultivo.

Diferentes meios de cultura, tais como os meios de MURASHIGE & SKOOG (37), DE FOSSARD (13) e WOODY PLANT MEDIUM (46) e suas modificações foram utilizados para induzir multiplicação de brotos. Geralmente a indução é feita em meio solidificado com ágar, mas algumas espécies podem requerer meio líquido para estimular a proliferação, GUPTA et alii (24).

As taxas de multiplicação quando se utiliza material juvenil, por exemplo seedlings, é mais elevada, dependendo da espécie pode atingir entre 3 a 20 vezes em 4 semanas, enquanto que com material de árvores adultas essa taxa pode variar entre 2 a 7 vezes, BAJAJ (5).

O meio físico pode refletir diferentes condições para espécies distintas. Em vários trabalhos, a temperatura tem sido em torno de 25°C e o fotoperíodo de 8 a 16 horas, HARTNEY & BARKER (27), DURAND-CRESSWELL & NITSCH (16).

2.3.2.3. Cultura de embrião

Os estágios de desenvolvimento do embrião da maioria

das espécies de Eucalyptus são pouco conhecidos, sendo portanto a cultura de embriões imaturos pouco pesquisada, entretanto recentemente MURALIDHARAN & MASCARENHAS (36), obtiveram sucesso na regeneração de plantas a partir de embriões zigóticos de E. citriodora.

A extração e cultura de embriões é de grande importância pois reduziria o tempo requerido para obter seedlings de polinizações controladas, McCOMB & BENNETT (32).

2.3.2.4. Cultura de antera

A cultura de anteras em plantas lenhosas que possuem uma baixa capacidade de maturação e tem um ciclo de vida longo, é uma técnica de grande potencial, devido a obtenção de indivíduos haplóides seguidos de sua diploidização através de substâncias químicas (por ex. colchicina). Esta técnica associada ao melhoramento de plantas pode permitir a obtenção de híbridos num menor espaço de tempo.

A morfologia das flores de Eucalyptus favorece a utilização desta técnica. Os estames são encobertos por um opérculo rude e uma desinfestação severa pode ser aplicada sem danificar as anteras. O número de pequenas anteras é adequado para ser utilizado em sistemas de culturas em agitação. Apesar dos grandes benefícios da cultura de anteras para espécies do gênero Eucalyptus, pouco é conhecido a respeito da fenologia do desenvolvimento game

tofítico masculino em eucaliptos, McCOMB & BENNETT (32).

2.4. Fatores que afetam a cultura in vitro de órgãos de Eucalyptus grandis

Vários são os fatores que afetam a obtenção de plantas a partir de culturas in vitro, destacando-se a oxidação fenólica, contaminação de material vindo do campo e meio de cultura. No caso particular do Eucalyptus grandis a idade da matriz constitui um dos fatores limitantes, influenciando sobre a capacidade morfo genética do material cultivado, GONÇALVES (23).

2.4.1. Oxidação fenólica

Algumas espécies de plantas, especialmente as espécies tropicais contêm altas concentrações de substâncias fenólicas, que são oxidadas quando as células são lesadas ou quando atingem a senescência, fazendo com que o tecido isolado torne-se marrom ou preto, havendo paralização do crescimento, THORPEL & PATEL (48), GEORGE & SHERRINGTON (19). Tecidos que contêm alta concentração de componentes fenólicos são difíceis, de serem cultivados, devido à ação de enzimas polifenases que oxidam as substâncias fenólicas inibindo o crescimento.

A oxidação fenólica ocorre através da produção ou síntese de enzimas oxidases, como polifenoloxidase e tirosinase, devido à ação do conteúdo de cobre. A partir da injúria dos tecidos, criam-se condições propícias para a oxidação dos mesmos, Lerch citado por GEORGE & SHERRINGTON (19).

A inibição do crescimento ocorre quando os componentes fenólicos são oxidados para compostos de quinonas altamente ativos que sofrem um processo de ciclização, polimerização e/ou oxidação de proteínas para formar compostos resultantes da oxidação (flavonóides, taninos e fenóis simples), Harmis et alii citado por GEORGE & SHERRINGTON (19).

O escurecimento dos tecidos, especialmente dos explantes recém-excisados e o meio onde eles são inoculados, frequentemente podem ser prevenidos por um dos diferentes métodos, GEORGE & SHERRINGTON (19):

- a) Remoção de substâncias fenólicas
 - dispersão
 - absorção por carvão ativo
 - absorção por polivinilpirrolidona (PVP)
- b) Modificação do potencial redox
 - agentes redutores
 - menor disponibilidade de oxigênio
- c) Inibição da ação de enzimas fenoloxidases
 - agentes quelantes
- d) Atividade da fenolase e disponibilidade de substrato

- baixo pH
- adições ao meio
- escuro

A oxidação fenólica em espécies de eucaliptos tem sido relatada em vários trabalhos (2, 4, 13, 22).

A exsudação em tecidos cortados de E. grandis, CRESSWELL & NITSCH (12), aparece dentro de poucas horas e pode ser reduzida ou eliminada se: a) forem selecionadas hastes de tecidos sadios de diâmetro menor que 5 mm e que o processo de desinfestação não danifique os tecidos; b) for feito um pré-tratamento de imersão em água e que as culturas forem iniciadas no escuro.

Uma análise do conteúdo fenólico de extratos de folhas preparados em luz (8000 lux) e escuro forneceu os resultados mostrados no Quadro 1, CRESSWELL & NITSCH (12).

QUADRO 1 - Composição de fenóis de extratos de folhas de Eucalyptus grandis em luz (8000 lux) e escuro.

	Total de fenóis (mg)	Taninos (mg)	Flavonóides (μ m)	Fenóis Simples (mg)
Luz	16,58	5,1	600	10,88
Escuro	2,5	0,5	20	1,94

Estes resultados indicaram que a enzima que cataliza a síntese de fenóis (fenilalanina amonialiase) é ativada pela luz,

portanto, quando as culturas são iniciadas no escuro a produção de fenóis é reduzida.

A imersão ou lavagem em água, para remoção dos fenóis antes da desinfestação, diminui a concentração de fenóis e são necessários sete dias iniciais no escuro para inibir a formação de fenóis, CRESSWELL & NITSCH (12).

Além destes tratamentos, vários compostos têm sido utilizados para reagir com os fenóis e reestabelecer a atividade enzimática. O PVP é o poliamido mais valioso para este propósito. Os fenóis são absorvidos pelo PVP através das pontes de hidrogênio, prevenindo a oxidação, Loomis & Battaile, citados por GEORGE & SHERRINGTON (19).

Vários trabalhos foram feitos utilizando diferentes concentrações de PVP em várias espécies (2, 4, 6), mostrando que o PVP reduziu o escurecimento dos explantes recém-cortados, aumentando a taxa de sobrevivência.

Alguns agentes redutores (antioxidantes) tais como: ácido ascórbico, ácido cítrico, α -cisteína HCl e metabissulfito de sódio, foram utilizados em culturas in vitro para evitar a oxidação fenólica (4, 30, 48).

O uso de antioxidantes tem sido uma experiência comum em plantas lenhosas, onde os explantes recém-cortados tornam-se escuros, devido a grande quantidade de fenóis, fazendo com que o meio fique tóxico e inadequado para o crescimento e diferenciação de culturas, ARYA & SHEKHAWAT (2).

2.4.2. Contaminação

As superfícies de plantas trazidas do campo carregam uma flora microbiana, que é inofensiva às plantas, mas multiplica-se rapidamente em meio de cultura, modificando a composição do meio e produzindo condições onde os explantes não se desenvolvem, DE FOSSARD et alii (13).

Grandes perdas de material inoculado são devidas a contaminação por fungos, principalmente Aspergillus e Penicillium, GONÇALVES (22).

A contaminação é um problema que tem prejudicado a condução de vários experimentos em função do reduzido número de explantes obtidos. Este fato tem conduzido o desenvolvimento de novas estratégias, tais como: experimentos com seedlings para conseguir informações sobre condições de cultivo; obtenção de um maior número de subculturas assépticas de material adulto para posteriores experimentos; tentativas de se encontrar novos métodos de desinfestação de material adulto crescido no campo, DE FOSSARD et alii (14).

Gemas apicais e axilares do caule de plantas lenhosas é o explante usado pela maioria das culturas in vitro. Essas gemas abrigam uma variedade de microflora endógena, incluindo bactérias e fungos, que persiste mesmo após os procedimentos tradicionais de desinfestação. É importante avaliar o grau e a natureza de contaminantes residuais que escapam da desinfestação tradicional para que possa ser feito um tratamento com fungicida e/ou an-

tibiótico adequados, HALDEMAN et alii (25).

Os protocolos para propagação in vitro geralmente empregam material juvenil de plantas onde a contaminação não é problema, CRESSWELL & NITSCH (12). No entanto, recentemente a aplicação de protocolos de plantas testadas no campo é um objetivo desejado. Embora, o emprego de fungicidas não tem sido recomendado como rotina em culturas in vitro, ele mostra um potencial para aumentar a quantidade de explantes livres de contaminação que são difíceis de serem obtidos pelos métodos normais de desinfestação, CRESSWELL & NITSCH (12) DE FOSSARD et alii (14).

HALDEMAN et alii (25), usaram Benomyl nas concentrações de 1, 2 e 4 mg.l⁻¹ em brotos apicais de Camellia sinensis e C. japonica, sendo que as concentrações mais baixas foram mais efetivas, produzindo em média 95% e 85% de explantes não contaminados, respectivamente. Os autores observaram ainda, que houve uma contaminação latente de 10% para ambas as espécies. Baseando-se nos resultados, concluíram que quando comparado ao controle (100% de explantes contaminados), a concentração de 1mg.l⁻¹ de Benomyl representou um aumento de 80% ou mais na capacidade de se obter explantes axênicos de material oriundo do campo.

Usando segmentos nodais, com 1 cm de comprimento, de E. marginata BENNETT & McCOMB (7), verificaram que mesmo com material aparentemente livre de danos causados por insetos ou fungos, a contaminação geralmente foi alta e a maior parte dos brotos não contaminados tornou-se escura e não sobreviveu. Mesmo com uma variação no tempo de desinfestação e na concentração de desinfestante, não houve melhora significativa. A porcentagem de explantes

obtida foi de 0-10%, o que mostra que o alto nível de contaminação inicial é um problema quando se utiliza explantes oriundos do campo.

Na Austrália, está sendo testado um protocolo para minimizar a contaminação de material do campo, BARKER et alii (6). O procedimento baseia-se no corte da árvore para induzir novas brotações, colocando-as em um saco semelhante ao utilizado em polinizações, pulverizando-se com inseticidas e fungicidas. Estas brotações posteriormente serão cortadas e cultivadas em laboratório seguindo o método padrão de desinfestação.

2.5. Clonagem de Eucalyptus

Os primeiros autores a relatarem sucesso na regeneração de plantas de eucaliptos através da cultura de células e tecidos, usando explantes de "lignotuber" de E. citriodora, foram ANEJA & ATAL (1). No entanto, DE FOSSARD et alii (14), utilizando-se "lignotuber" de E. bancroftii não conseguiram regeneração de plantas, o que mostra que as espécies respondem de modo diferenciado com relação à fonte de explante.

Vários protocolos têm sido desenvolvidos para multiplicação in vitro de espécies de Eucalyptus de grande interesse comercial, a partir de seedlings germinados assepticamente. Através das diferentes partes de seedlings - cotilédones, brotos apicais, hipocótilos e raiz principal - clones foram obtidos (6, 9,

13, 21, 34). O sucesso dependeu da espécie, do meio de cultura utilizado e das condições de crescimento. As taxas de multiplicação variaram em função principalmente da espécie e dos meios de cultura utilizados.

O uso de material de seedlings, como fonte de explante, é feito com objetivo de definir condições básicas de cultura in vitro, tais como meio nutritivo básico e tratamentos hormonais, uma vez que este material vegetal é menos susceptível à problemas de contaminação por microorganismos, o que permite o isolamento de grande número de explantes para montagem de experimentos com concentração de sais minerais e composição hormonal dos meios nutritivos.

Devido a segregação que ocorre em sementes, podendo levar a variabilidade genética, o emprego de técnicas de cultura de tecidos e órgãos vegetais proporciona a multiplicação de materiais selecionados.

Vários autores (4, 6, 9, 13, 18, 23) trabalharam com material rejuvenescido em espécies distintas de Eucalyptus, usando diferentes meios de cultura, relatando sucesso variável na obtenção de clones, em virtude de fatores tais como genótipo, contaminação por microorganismos e oxidação fenólica. Entretanto, o uso de material rejuvenescido é mais prolífico que material oriundo de árvore adulta, BURGER (8).

O interessante com relação a micropropagação de espécies de Eucalyptus é utilizar explantes oriundos de material adulto, sem a necessidade de cortar a árvore, mantendo-se assim a ár-

vore matriz. Este procedimento tem sido realizado com sucesso utilizando-se de brotações epicórmicas induzidas em galhos (3, 12, 28).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras - ESAL, Lavras, MG.

Os segmentos nodais utilizados para a instalação dos experimentos, foram coletados de brotações em cepas de árvores de Eucalyptus grandis Hill ex Maiden de procedência de Queensland , Austrália, plantadas no campus da ESAL.

3.1. Assepsia

Para obtenção de propágulos isentos de contaminação e oxidação fenólica, os segmentos nodais foram submetidos as seguintes etapas de assepsia:

a) pulverização das brotações, no campo, com fungicida comercial (Benomyl - 50% a 250 mg.l^{-1}) e cobertura com sacos plásticos por duas semanas;

- b) coleta das brotações em cepas no campo;
- c) desfolhamento das brotações, no laboratório;
- d) lavagem das brotações com detergente comercial;
- e) lavagem das brotações em água corrente por um dia;
- f) remoção dos segmentos nodais;
- g) lavagem dos segmentos nodais em água corrente por 30 minutos;
- h) em câmara de fluxo laminar, tratamento dos segmentos nodais com solução 0,2% de NaOCl e duas gotas de Tween-20 para 100 ml de água destilada;
- i) lavagem dos segmentos nodais com água destilada e autoclavada por três vezes;
- j) seccionamento dos segmentos nodais em torno de 1,5 cm de comprimento;
- l) inoculação.

Todo o material utilizado durante a condução do experimento foi previamente autoclavado a 120°C e 1,3 kg/cm por 20 minutos.

3.2. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o DE FOSSARD (Quadro 2) com 10 ml por tubo de ensaio (2,5 x 1,5 cm), vedado com tampa

QUADRO 2 - Composição do meio de cultura DE FOSSARD.

Solução estoque	Compostos	Concentração final (mg.l ⁻¹)
A	(NH ₄ NO ₃)	804,00
B	(KNO ₃)	1.011,00
C	(H ₃ BO ₃)	3,10
	KI	0,50
	CoCl.6H ₂ O	0,10
	Na ₂ MoO.2H ₂ O	0,02
D	CaCl ₂	222,00
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	369,00
	MnSO ₄ .7H ₂ O	8,50
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	5,70
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,02
F	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,20
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,80
G	Na ₂ SO ₄	92,00
H	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	138,00
Mio-inositol		108,00
Tiamina-HCl		13,50
Piridoxina		1,20
Ácido nicotínico		4,00
Biotina		0,25
Glicina		3,80
Cisteína-HCl		18,90
Sacarose g.l ⁻¹		40,00
Ágar g.l ⁻¹		7,00

plástica.

Em alguns casos foram usados meios líquido e sólido; o pH foi ajustado para 5,0 e $5,7 \pm 0,1$, respectivamente.

3.3. Condições ambientais de cultura

As culturas foram mantidas no laboratório por 7 dias no escuro e posteriormente sob um fotoperíodo de 16/8, com luz complementar de 3000 lux, fornecida por lâmpadas Gro-lux. A temperatura foi em torno de 27°C .

3.4. Testes experimentais

Os testes experimentais empregados neste trabalho foram: a) cultura de segmentos nodais; b) propagação clonal de Eu - calyptus grandis e c) obtenção de plântulas in vitro.

O procedimento experimental pode ser visualizado através da Figura 1.

As análises empregadas foram baseadas em modelos matemáticos apropriados para o delineamento adotado que foi o Inteiramente Casualizado. Todos os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se os níveis de significância de 1 a 5% para o teste F. Para comparação de médias, aplicou-se o teste de Tu

1945

1945

1945

1945

1945

1945

1945

1945

1945

1945

1945

1945

1945

1945

1945

1945

1945

1945

1945

1945

1945

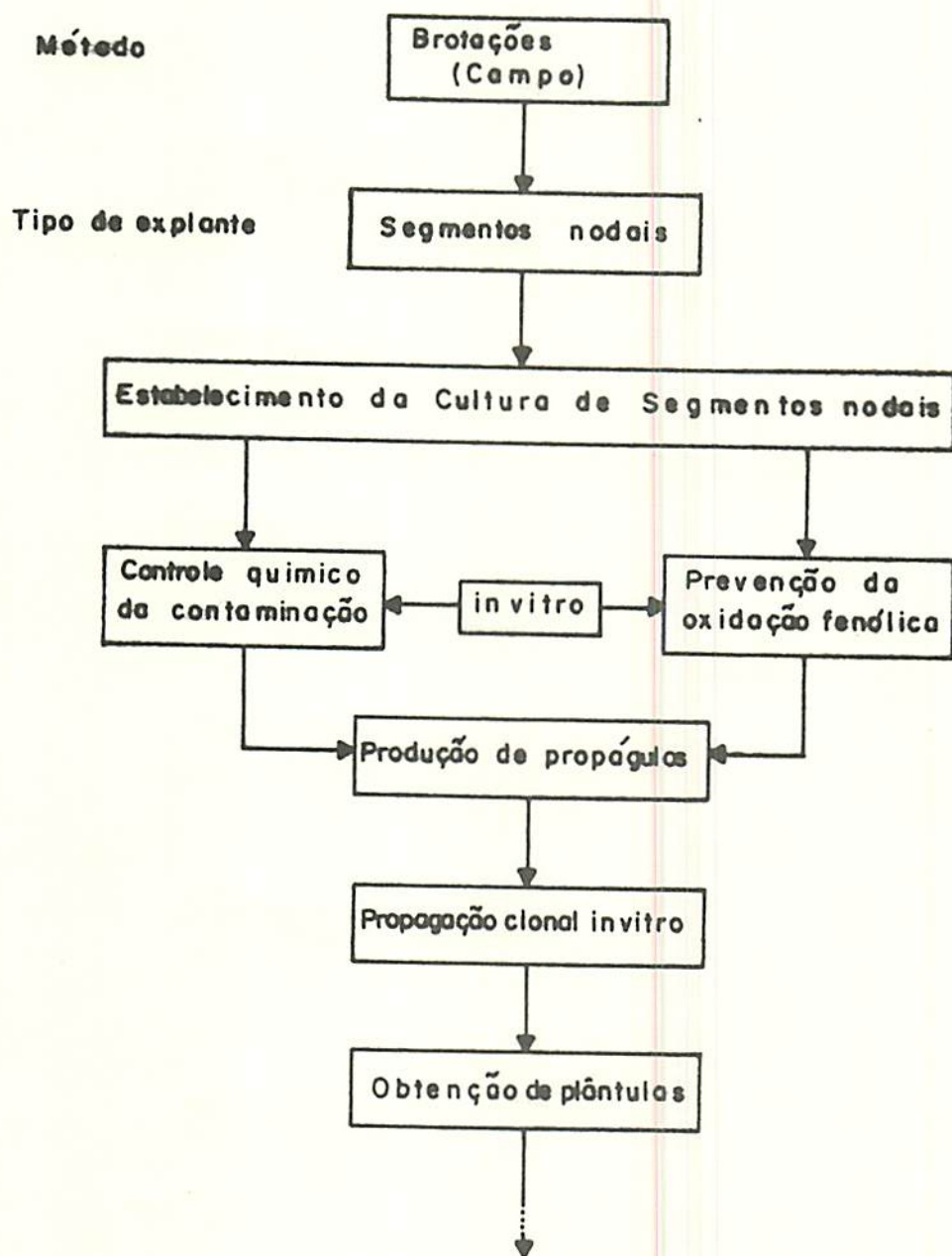


FIGURA 1 - Fluxograma utilizado para estabelecimento da cultura in vitro de segmentos nodais de E. grandis. ESAL, Lavras-MG. 1988.

key a 5%. Para efeitos de análise estatística os dados de contagem foram transformados para $(x + 0,5)^{1/2}$.

3.5. Cultura de segmentos nodais

3.5.1. Estabelecimento da cultura de segmentos nodais

A fase de estabelecimento da cultura de segmentos nodais se constituiu de duas etapas: a) controle químico da contaminação fúngica e b) prevenção da oxidação fenólica.

Com o auxílio de bisturi e pinça metálica, os segmentos nodais foram cortados em aproximadamente 1,5 cm de comprimento, em condições assépticas. Os explantes foram colocados individualmente em tubos de ensaio, contendo 10 ml de meio DE FOSSARD (13) adicionado de (mg.l^{-1}) BAP 1,0 e IBA 0,5. Foram feitas 10 repetições, utilizando-se meios sólido e líquido.

3.5.2. Controle químico da contaminação fúngica

Os explantes foram submetidos às seguintes concentrações de Benomyl (mg.l^{-1}): 0,0; 50,0; 100,0; 500,0 e 1000,0.

As avaliações foram feitas aos 7, 15 e 30 dias de cultura e os parâmetros foram (em %): a) contaminação fúngica e b)

sobrevivência. Os explantes que apresentaram contaminação tanto por fungos e/ou bactérias foram descartados.

3.5.3. Prevenção da oxidação fenólica

Para evitar o escurecimento dos explantes recém-cortados, foram utilizados compostos que atuam como antioxidantes, os quais constituíram os tratamentos. Os compostos utilizados foram: polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico, ácido cítrico e metabisulfito de sódio na concentração de 1 g/100 ml respectivamente. Foram feitas 10 repetições para cada tratamento.

O meio de cultura utilizado foi o DE FOSSARD (13), acrescentado de $0,05 \text{ g.l}^{-1}$ de Benomyl.

Aos 45 dias de cultura foi feita a avaliação dos seguintes parâmetros: a) oxidação fenólica; b) contaminação por fungos e c) desenvolvimento dos explantes.

Outro experimento foi montado com concentrações diferentes de PVP (em mg.l^{-1}): 0,00; 0,005; 0,01; 0,015 e 0,02. Foram feitas 10 repetições.

A avaliação deste experimento foi conforme mencionado acima.

3.6. Propagação clonal de Eucalyptus grandis

3.6.1. Multiplicação in vitro de segmentos nodais

Explantes secundários (provenientes da cultura in vitro), desenvolvidos nas etapas anteriores (3.5.2. e 3.5.3.), que produziram brotos foram submetidos à uma desinfestação em 0,5% de água sanitária, enxaguados por três vezes em água destilada e autoclavada. Em câmara de fluxo laminar, as partes necrosadas foram eliminadas com auxílio de bisturi e pinça metálica e os brotos foram transferidos para meio de cultura suplementado com os reguladores de crescimento BAP nas concentrações de 0,0 ; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.l⁻¹ e ANA 0,0; 0,1; 0,2 e 0,4 mg.l⁻¹, no total de 20 tratamentos com 7 repetições para cada tipo de explante (1, 2 ou 3 brotos).

A avaliação, estabelecendo-se o número de brotos agregados (tufos), foi realizada 30 dias após a inoculação, quando os brotos foram excisados e transferidos para a fase de obtenção de plântulas. Nesta mesma ocasião, foram feitas observações visuais referentes ao grau de multiplicação, formação de raízes e desenvolvimento foliar, estabelecendo uma percentagem de tubos que deram alguma resposta.

3.6.2. Obtenção de plântulas

Utilizou-se brotos multiplicados in vitro na etapa 3.6.1. Estes foram submetidos à uma desinfestação em 0,5% de solução de água sanitária, enxaguados por três vezes em água destilada e autoclavada. Em câmara de fluxo laminar os brotos agregados (tufos) sofreram pequena "toilete" a fim de eliminar as partes necrosadas e padronizar o tamanho do explante. Brotações com mais de 3 brotos foram inoculadas em meio acrescido dos reguladores de crescimento (em mg.l^{-1}), ANA (0,0; 0,01 e 0,1), BAP (0,0; 0,05 e 0,5) e GA_3 (0,0; 0,1 e 0,5), totalizando 27 tratamentos com 7 repetições cada.

Foram feitas avaliações aos 15, 30 e 45 dias após a inoculação, estabelecendo o número total de brotos e altura média das plântulas alongadas. Na terceira avaliação, estabeleceu-se o número de brotos com mais de 0,5 cm por tubo remanescente. Concomitantemente com as avaliações registrou-se a presença ou não de raízes e primórdios radiculares, desenvolvimento, alongamento e multiplicação de brotos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Contaminação fúngica e sobrevivência

O uso de fungicida foi efetivo para reduzir a taxa de contaminação e os resultados das avaliações constam no Quadro 3.

Sete dias após a inoculação, 40% dos explantes iniciais estavam contaminados, utilizando-se o método padrão de desinfestação, tanto em meio sólido como líquido. Utilizando-se 50 e 100 mg.l⁻¹ de Benomyl, em meio solidificado, houve 10% de explantes contaminados, não ocorrendo contaminação em meio líquido. Quando concentrações mais altas (500 e 1000 mg.l⁻¹) foram utilizadas, não houve contaminação dos explantes, tanto em meio sólido como em meio líquido.

Observou-se um aumento da taxa de explantes contaminados, quinze dias após a inoculação, exceto para as concentrações mais elevadas de Benomyl, em meio sólido.

Trinta dias após a inoculação, observou-se que as concentrações mais altas de Benomyl (500 e 1000 mg.l⁻¹) foram mais efetivas que as outras testadas, o que confirma os resultados obti

QUADRO 3 - Avaliação dos tratamentos para explantes de E. grandis, em meio de Fossard, suplementado com diferentes concentrações de Benomyl. ESAL, Lavras-MG. 1988.

Benomyl (mg.l ⁻¹)	Contaminação (%)						
	Dias	Meio sólido			Meio líquido		
		7	15	30	7	15	30
0,0		40	80	90	40	50	80
50,0		10	20	30	0	30	50
100,0		10	30	40	0	20	20
500,0		0	10	10	0	10	20
1000,0		0	10	10	0	10	10

dos por HALDEMAN et alii (25).

Quando o método padrão de desinfestação foi utilizado, o índice de contaminação foi muito elevado, o que está de acordo com os resultados obtidos por IKEMORI (28) e GONÇALVES (22), onde grandes perdas de material inoculado foram devidas a contaminação por fungos.

Um aumento crescente na percentagem de explantes contaminados foi observado com o decorrer do tempo em quase todas as concentrações de fungicida utilizadas, conforme mostram as Figuras 2 e 3. Fato semelhante foi observado por HALDEMAN et alii(25), onde a contaminação latente foi de 10%, quando 1 g/L de Benomyl foi utilizada em explantes de Camellia japonica e Camellia simen-

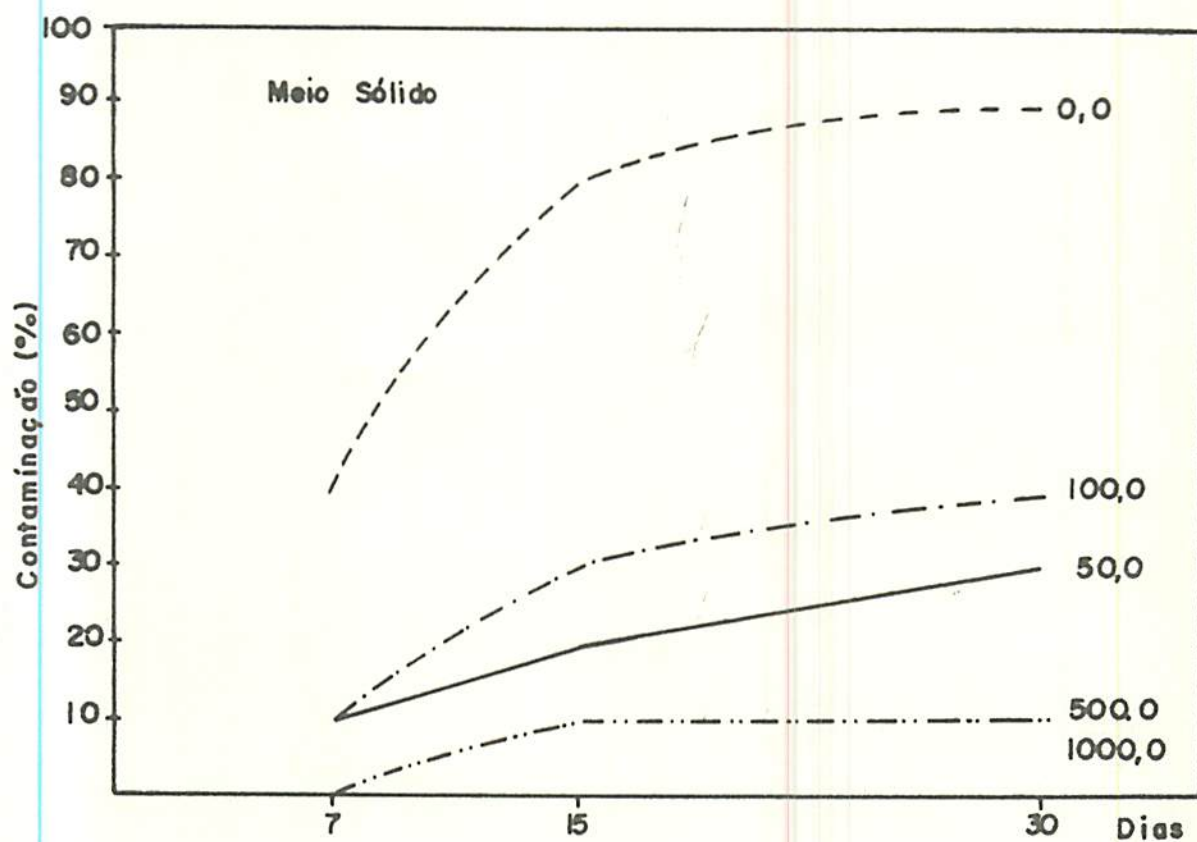


FIGURA 2 - Taxas de contaminação (%) de explantes de *E. grandis* inoculados em diferentes concentrações de Benomyl, meio sólido. ESAL, Lavras-MG. 1988.

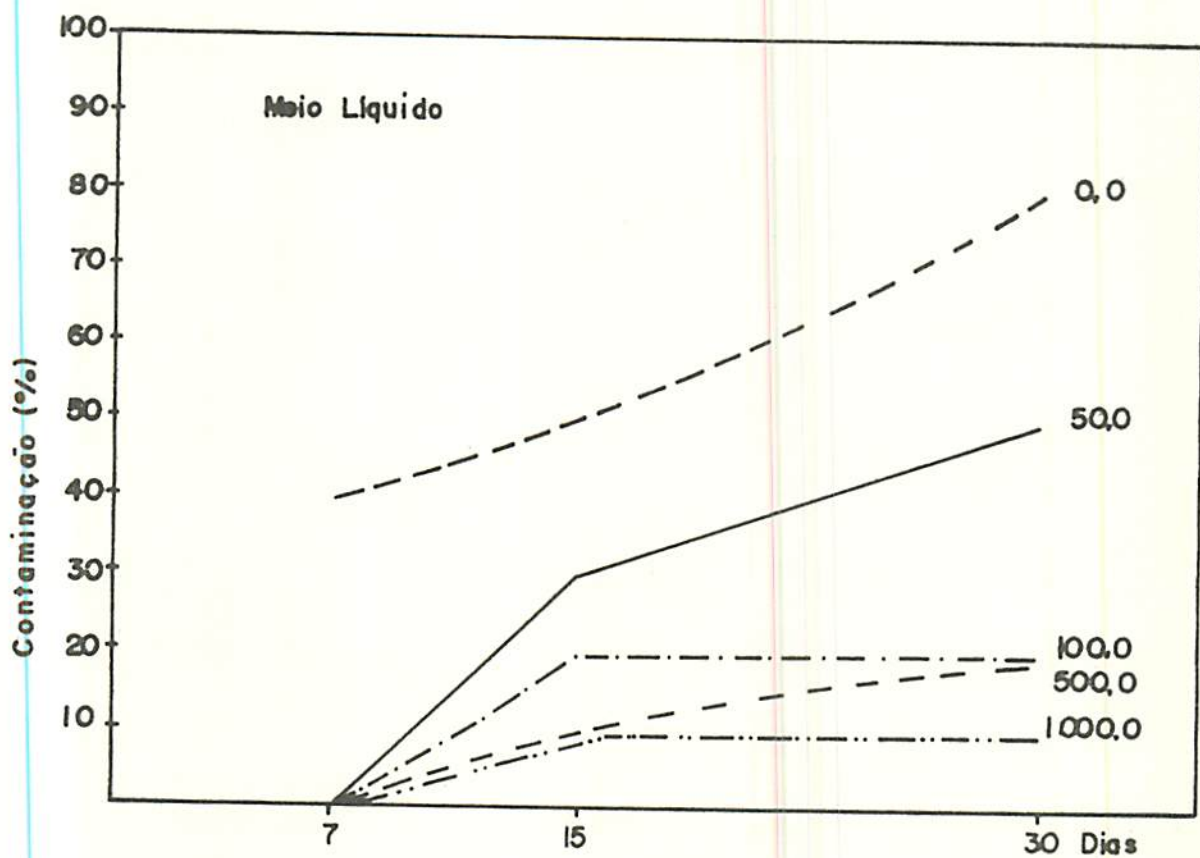


FIGURA 3 - Taxas de contaminação (%) de explantes de E. grandis inoculados em diferentes concentrações de Benomyl, meio líquido. ESAL, Lavras-MG. 1988.

sis.

Observa-se no Quadro 4, que a taxa de sobrevivência dos explantes mostrou-se relacionada com as concentrações de fungicida utilizadas. Quando utilizou-se 50 mg.l^{-1} de Benomyl, observou-se uma taxa de 70% de sobrevivência dos explantes em meio sólido e 50% em meio líquido, aos trinta dias da inoculação, provavelmente devido o explante absorver compostos mais rapidamente em meio líquido, prejudicando desta maneira o desenvolvimento do explante.

Concentrações mais elevadas de fungicida causaram necrose nos explantes, os quais não sobreviveram até o período final de avaliação, o que pode ser observado nas Figuras 4 e 5, confirmando os resultados obtidos por IKEMORI (28) de que necroses são causadas por uma alta concentração de desinfestante.

Apesar das altas concentrações de Benomyl (100, 500 e 1000 mg.l^{-1}) serem as mais efetivas para reduzir o índice de contaminação, elas causam danos prejudiciais aos explantes, não sendo possível uma sobrevivência maior no período de trinta dias, o que concorda com os resultados obtidos por HALDEMAN et alii (25).

Observou-se que a melhor concentração foi de 50 mg.l^{-1} de Benomyl em meio sólido, onde 70% dos explantes não foram contaminados, não causando danos e tendo uma taxa de sobrevivência de 70% aos trinta dias de inoculação. Nesta concentração, houve uma redução da taxa de contaminação, com um índice de sobrevivência satisfatório dos explantes, conforme mostra a Figura 6.

QUADRO 4 - Avaliação dos tratamentos para explantes de E. grandis em meio de Fossard, suplementado com diferentes concentrações de Benomyl. ESAL, Lavras-MG. 1988.

Benomyl (mg.l ⁻¹)	Sobrevivência (%)						
	Dias	Meio sólido			Meio líquido		
		7	15	30	7	15	30
0,0	60	10	10	50	50	20	
50,0	80	70	70	60	50	50	
100,0	40	30	20	50	30	30	
500,0	40	20	20	30	20	10	
1000,0	20	0	0	20	20	0	

4.2. Oxidação fenólica

A utilização de antioxidantes, adicionados ao meio de cultura, mostrou-se importante para reduzir o escurecimento dos explantes, ou seja, a oxidação fenólica.

Observa-se no Quadro 5, que, mesmo seguindo a metodologia citada por DURAND-CRESSWELL & NITSCH (16) e adicionando os antioxidantes ao meio de cultura, houve uma alta taxa de oxidação fenólica, exceto para o polivinilpirrolidona (PVP).

Dos antioxidantes testados, o PVP se sobressaiu aos

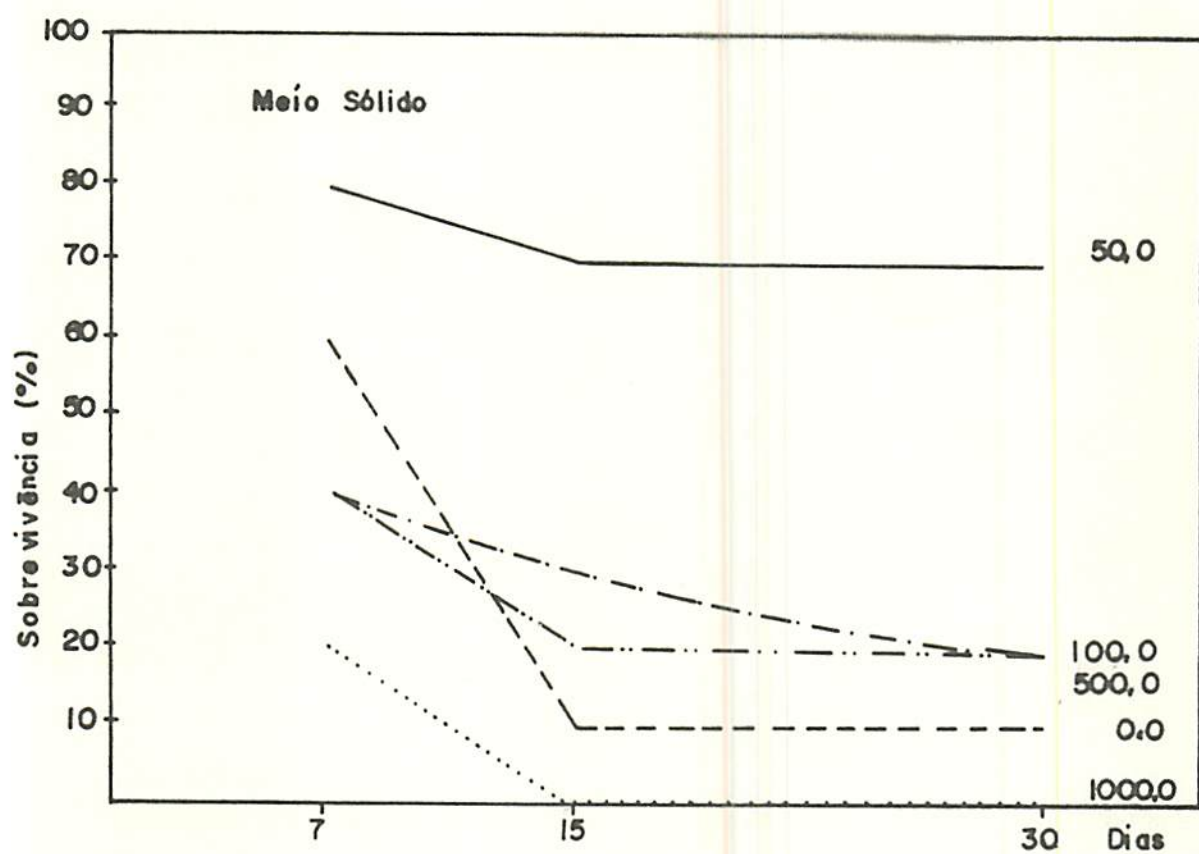


FIGURA 4 - Taxas de sobrevivência (%) de explantes de *E. grandis* inoculados em diferentes concentrações de Benomyl, meio sólido. ESAL, Lavras-MG. 1988.

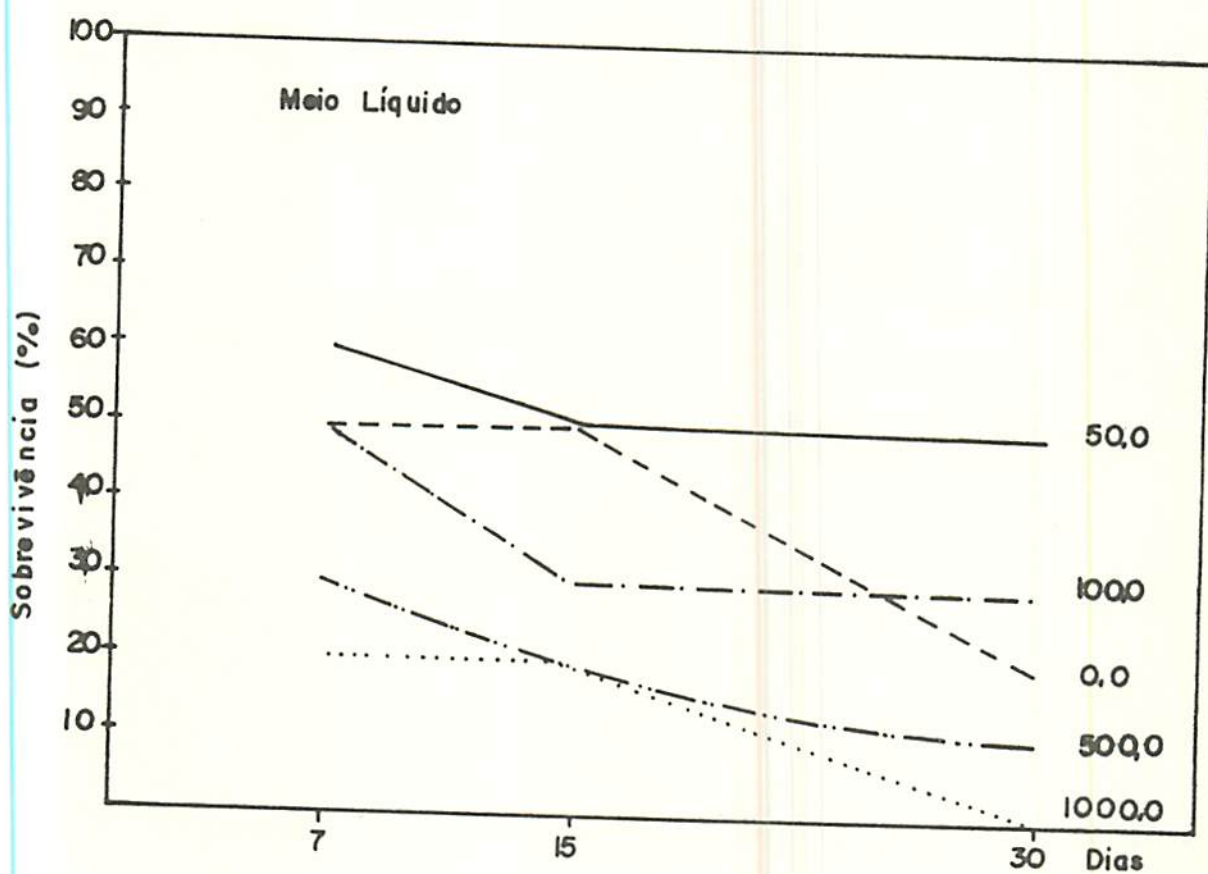


FIGURA 5 - Taxas de sobrevivência (%) de explantes de *E. grandis* inoculados em diferentes concentrações de Benomyl, meio líquido. ESAL, Lavras-MG. 1988.

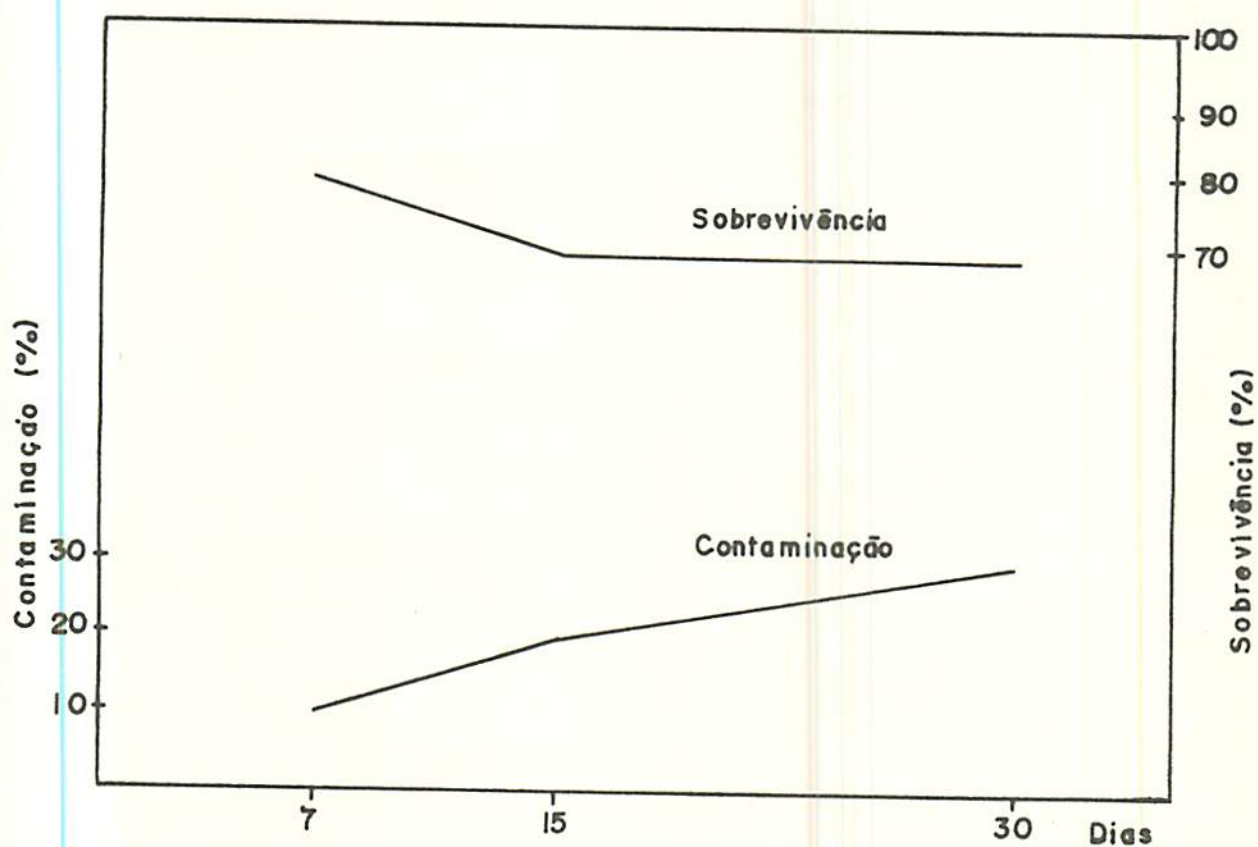


FIGURA 6 - Taxa de sobrevivência e correspondente percentagem de contaminação em explantes de *E. grandis*, sob efeito da concentração de 50 mg.l^{-1} de Benomyl em meio sólido. ESAL, Lavras-MG. 1988.

QUADRO 5 - Número e percentagem de explantes de Eucalyptus grandis oxidados e não oxidados em diferentes substâncias antioxidantes. ESAL, Lavras-MG, 1988.

Antioxidantes	Explantes				
	Remanescentes		Oxidados		Não oxidados ¹
	(nº)	(nº)	(%)	(nº)	(%)
Metabissulfito de sódio	27	25	92,6	2	7,4
Ácido ascórbico	30	14	46,7	16	53,3
Ácido cítrico	30	12	40,0	18	60,0
Polivinilpirrolidona	30	13	10,0	27	90,0

1 - A diferença entre o número total de explantes inoculados (32) e remanescentes, foi devida ao descarte por contaminação (66%) e mortalidade (34%).

demais, resultando ao final de quarenta e cinco dias em 90,0% de explantes não oxidados, o que também foi relatado por ARYA & SHEK HAWAT (2).

O metabissulfito de sódio foi o que apresentou a maior taxa de explantes oxidados (92,6%). O ácido ascórbico e o ácido cítrico apresentaram taxas similares (53,3 e 60,0% respectivamente) de explantes não oxidados; os resultados com o uso de ácido ascórbico não foram satisfatórios e não concordaram com os obtidos por LAMEIRA (30), que na concentração de 25 mg.l⁻¹ obteve resultados excelentes de redução da oxidação em explantes de

bananeira e também com os obtidos por BADIA (4), que usou $10-25 \text{ mg.l}^{-1}$ de ácido ascórbico em explantes de E. rudis, relatando bons resultados e não mencionando a taxa de oxidação fenólica; isto provavelmente deve ser devido a diferença na concentração de fenóis em diferentes espécies.

A Figura 7, mostra intensidade de oxidação fenólica para os antioxidantes testados.

Testes complementares, nos quais se utilizou diferentes concentrações de PVP em meio sólido e líquido, permitiram encontrar uma concentração adequada para reduzir a oxidação fenólica, como mostra o Quadro 6. A eficiência das concentrações mais altas de PVP estava associada com uma alta formação de brotos, mas a morfologia dos brotos se mostrou anormal, com folhas amareladas que posteriormente se tornaram senescentes.

Com relação ao uso de meio sólido e líquido, observou-se que os explantes inoculados em meio líquido, de um modo geral, apresentaram uma taxa de oxidação maior que os inoculados em meio sólido, contrário ao relatado por GEORGE & SHERRINGTON (19), de que os fenóis se dispersavam mais em meio líquido.

A oxidação fenólica foi total para o controle, que somente foi submetido ao processo padrão, contrário ao observado por GONÇALVES (23) de que tratamento em água corrente poderia ser mais eficiente do que tratamento com antioxidantes.

Foi necessário o uso de PVP, quando as culturas foram iniciadas, para que se tivesse um número maior de propágulos para experimentos posteriores, onde a oxidação fenólica não é um pro -

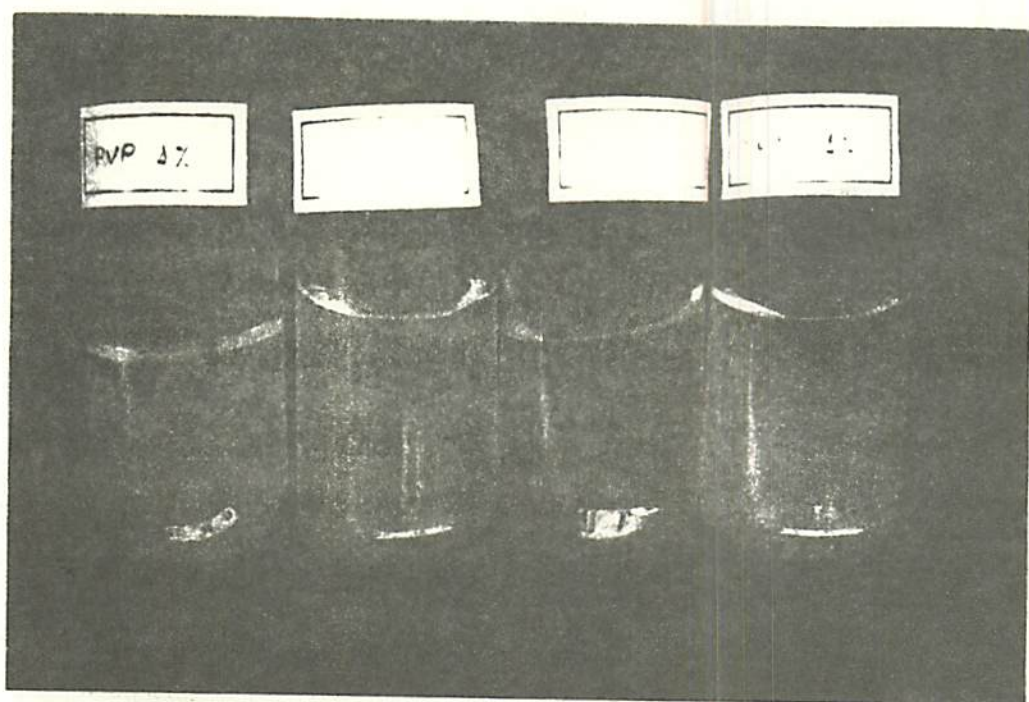


FIGURA 7 - Intensidade de oxidação fenólica em explantes de E. grandis sob efeito de diferentes antioxidantes. ESAL, Lavras-MG, 1988.

QUADRO 6 - Número e percentagem de explantes de Eucalyptus grandis oxidados e não oxidados, inoculados em meio sólido e líquido e em diferentes concentrações de polivinilpirrolidona (PVP). ESAL, Lavras-MG. 1988.

PVP (mg.l ⁻¹)	Meio sólido				Meio líquido			
	Explantes				Explantes			
	Oxidados		Não oxidados		Oxidados		Não oxidados	
	(nº)	(%)	(nº)	(%)	(nº)	(%)	(nº)	(%)
0,0	17	100,0	0	0,0	16	100,0	0	0,0
5,0	7	38,9	11	61,1	8	40,0	12	60,0
10,0	2	11,1	16	88,9	3	16,7	15	83,3
15,0	1	5,3	18	94,7	2	11,1	16	88,9
20,0	1	5,0	19	95,0	1	5,3	18	94,7

- 1 A diferença entre o número de explantes inoculados (20) e os remanescentes, foi devida ao descarte por contaminação.
- 2 Percentagem de explantes oxidados e não oxidados em relação ao total remanescente.

blema. A ocorrência de distúrbios no desenvolvimento dos brotos, quando se utiliza antioxidantes, foi relatada por GONÇALVES (23) e isto não ocorreu quando se utilizou concentrações baixas de PVP.

4.3. Multiplicação

A adição de citocinina e auxina, promoveu de um modo geral, um aumento no processo de desenvolvimento do número de brotos de E. grandis cultivados in vitro. Observa-se no Quadro 7 e Figura 8 que, na ausência de BAP, não houve diferença significativa entre os níveis de ANA para número de brotos agregados.

Melhores resultados foram observados em presença de BAP-0,5 e ANA-0,0; 0,1 e 0,2 mg.l⁻¹, ilustrados na Figura 9a. Com a adição de BAP-1,0 e ANA-0,0; 0,1; 0,2 e 0,4 mg.l⁻¹, houve também uma formação acentuada de brotos, o que pode ser observado na Figura 9b. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por BURGER (9), em que segmentos nodais de E. sideroxylon formaram um maior número de brotos em meio contendo BAP (0,5-1,0 mg.l⁻¹) e ANA (0,1 e 0,2 mg.l⁻¹) que em níveis mais altos destes reguladores de crescimento.

Concentrações superiores de BAP (2,0 e 4,0 mg.l⁻¹) foram prejudiciais para o desenvolvimento de um maior número de brotos, principalmente quando combinadas com concentrações mais altas de ANA (0,2 e 0,4 mg.l⁻¹). Esses resultados ilustrados nas Figuras 10a e 10b indicam existir um nível ótimo de reguladores de crescimento que determina a capacidade de uma maior proliferação de brotos, coincidindo com os resultados obtidos por BURGER (8).

Os dados evidenciaram que para indução de um maior número de brotos em E. grandis foi necessária a adição de uma citocinina (BAP), na concentração de 0,5 ou 1,0 mg.l⁻¹, na presença

ou não de auxina (ANA), na concentração de 0,1 ou 0,2 mg.l⁻¹.

QUADRO 7 - Número médio de brotos obtidos em cultura in vitro de segmentos nodais de E. grandis em diferentes concentrações de BAP e ANA. ESAL, Lavras-MG. 1988.

BAP (mg.l ⁻¹)	ANA (mg.l ⁻¹)			
	0,0	0,1	0,2	0,4
0,0	2,0 cA	2,7 bA	3,5 bA	2,4 cA
0,5	16,3a A	13,9a A	16,3a A	9,7a B
1,0	14,7ab A	11,7a A	16,3a A	12,5a A
2,0	11,0 b A	13,2a A	3,1 b B	4,0 bc B
4,0	8,5 b A	11,0a A	3,5 b B	5,0 b A

1 As médias seguidas da mesma letra (minúscula para níveis de BAP e maiúscula para níveis de ANA) não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

Os reguladores de crescimento influenciam o desenvolvimento vegetal. No processo de multiplicação por segmentos nodais, torna-se muito importante conhecer a possível influência do meio de cultura e reguladores de crescimento nesta característica.

Com a utilização de BAP-0,5 ou 1,0 mg.l⁻¹ e nas combinações possíveis de ANA, observou-se uma intensa multiplicação, com internódios curtos e as gemas crescendo em grupos (tufos), sendo que estas cresceram em todas as direções.

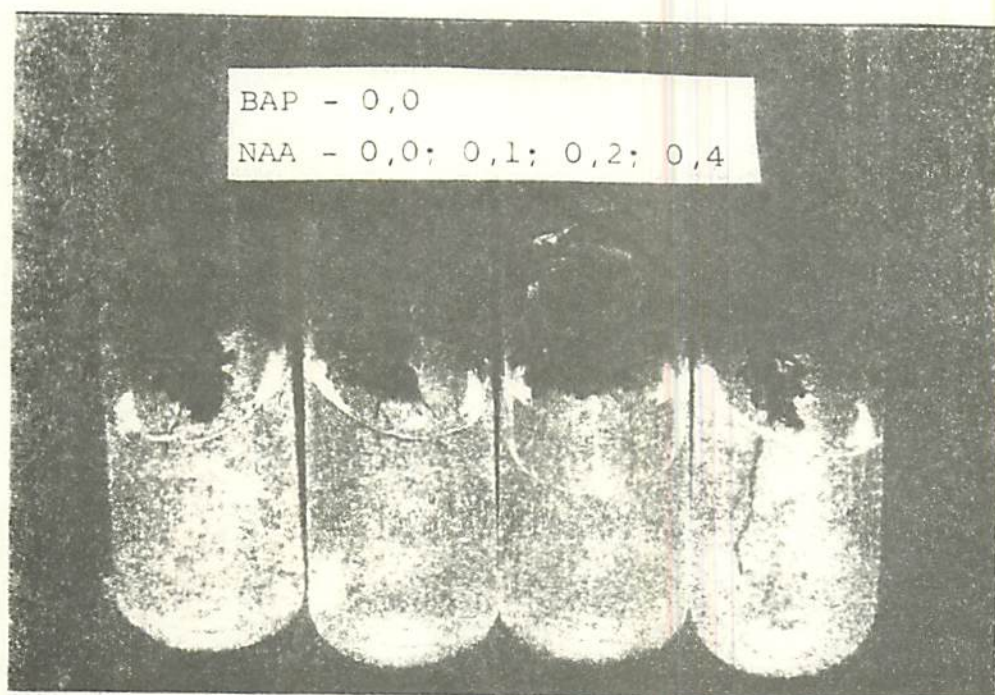


FIGURA 8 - Brotos obtidos através de segmentos nodais de E. grandis, em níveis crescentes de ANA. ESAL, Lavras-MG.1988.

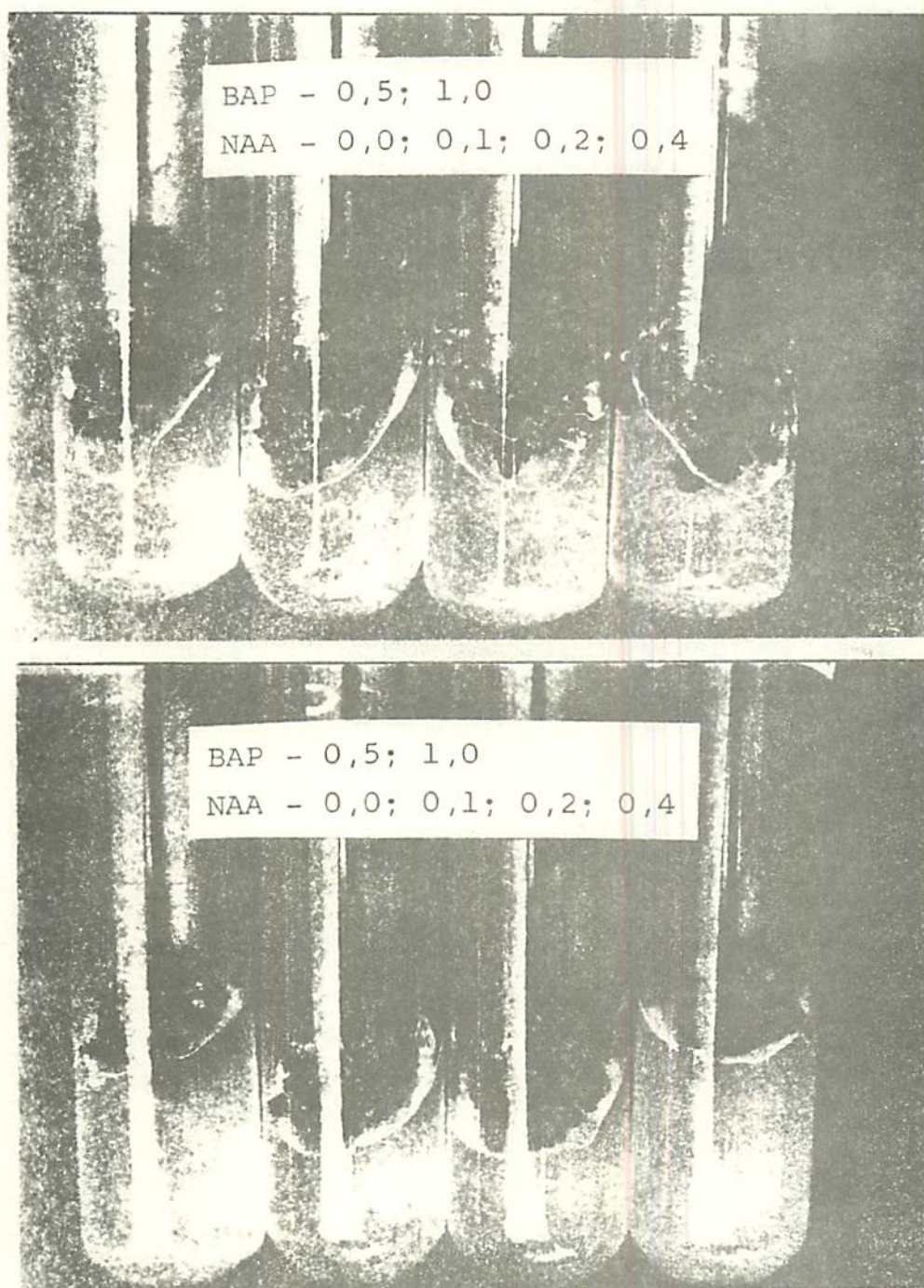


FIGURA 9 - (a) Brotos de *E. grandis* inoculados em meio com BAP - $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ e em níveis crescentes de ANA.

(b) Brotos de *E. grandis* inoculados em meio com BAP - $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ e níveis crescentes de ANA. ESAL, Lavras-MG. 1988.

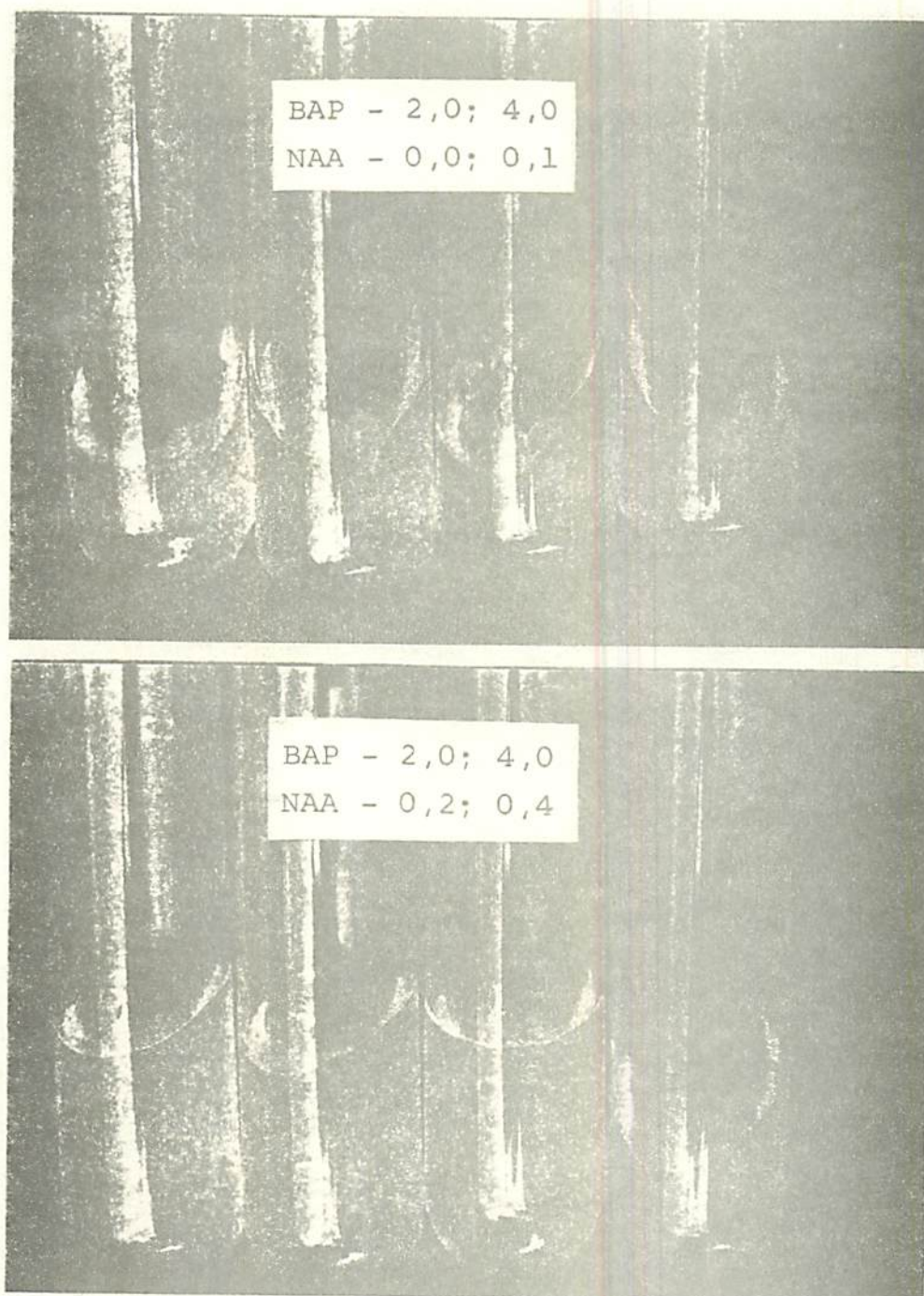


FIGURA 10 - (a) Brotos de E. grandis inoculados em meio com BAP - 2,0 e 4,0 e ANA-0,0 e 0,1 mg.l^{-1} .

(b) Brotos de E. grandis inoculados em meio com BAP - 2,0 e 4,0 e ANA-0,2 e 0,4 mg.l^{-1} . ESAL, Lavras-MG, 1988.

Os resultados obtidos estão de acordo com os descritos por FRANCKET & BOULAY (18), que primeiramente utilizaram um balanço hormonal de BAP-1,0 e ANA-0,01 mg.l⁻¹, conseguindo uma intensa multiplicação, com a morfologia das folhas pequenas e carnudas e coloração violeta nas partes inferiores.

Durante a dissecação, para instalação do experimento posterior, foi requerida uma cuidadosa manipulação para se dividir os tufos de gemas, para que não houvesse perdas de brotações.

A formação de raízes foi observada nos tratamentos com ANA-0,0; 0,1; 0,2 e 0,4 mg.l⁻¹ e na ausência de BAP, sendo estas finas e pequenas, com uma taxa de 85% nestas concentrações (Figura 8).

O desenvolvimento da área foliar, de um modo geral, foi bastante prejudicado, com folhas pouco expandidas que após um curto período tornaram-se senescentes. O único tratamento em que as folhas apresentaram-se com morfologia normal foi com a adição de ANA-0,2 mg.l⁻¹, na ausência de BAP.

Em ensaios preliminares havia sido constatado comportamento diferenciado dos explantes com relação ao número de brotações utilizadas. Na repicagem, Quadro 8, quando se utilizou apenas um broto por tubo de ensaio, a proliferação dos brotos foi inferior aos demais, mesmo quando se utilizou BAP em níveis mais elevados. Percebe-se ainda que com a utilização de dois brotos, a adição de BAP-0,5 mg.l⁻¹ foi satisfatória para aumentar a proliferação de brotos, o que não foi verificado quando se utilizou níveis mais elevados de BAP.

QUADRO 8 - Número médio de brotos obtidos em cultura in vitro de segmentos nodais de E. grandis utilizando-se 1, 2 ou 3 brotos em concentrações diferentes de BAP. ESAL, Lavras-MG. 1988.

BAP (mg.l ⁻¹)	Explantes (número de brotações)		
	1	2	3
0,0	1,5 c B	2,7 cAB	3,9 cA
0,5	8,5 C	14,7a B	19,7a A
1,0	7,4ab C	13,9 b B	21,6a A
2,0	3,9 b C	6,8 b B	11,0 b A
4,0	3,5 b C	6,8 b B	11,7 b A

1 As médias seguidas da mesma letra (minúscula para níveis de BAP e maiúscula para tipo de explante) não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

A inoculação de mais brotos (três) por tubo de ensaio para intensificar a multiplicação é mais adequada quando em presença de BAP-0,5 ou 1,0 mg.l⁻¹, o que concorda com os dados obtidos por GUPTA et alii (24).

Provavelmente, isto se deve ao fato que os níveis exógenos de reguladores de crescimento são dependentes dos níveis endógenos que, segundo GEORGE & SHERRINGTON (19), variam com o tipo de tecido, fase de crescimento e genótipo. Portanto, a adição exógena de BAP utilizada aliada a um número maior de brotações foi suficientemente adequada para que os brotos atingissem uma boa ta

xa de proliferação.

4.4. Obtenção de plântulas

4.4.1. Número de brotos

Como se observa no Quadro 9, na primeira avaliação o número de brotos foi reduzido quando estas foram inoculadas em meio DE FOSSARD (13), na ausência de BAP. Com a adição de BAP-0,5 e ANA-0,1 mg.l⁻¹ o número de brotos foi também reduzido, entretanto, isto não foi verificado quando se utilizou BAP-0,05 mg.l⁻¹, onde o número de brotos permaneceu constante quando se elevou os níveis de ANA.

Os melhores balanços hormonais encontrados, foram de BAP-0,05; 0,5 e ANA-0,01 mg.l⁻¹ e BAP-0,05 e ANA-0,1 mg.l⁻¹, o que pode ser observado na Figura 11.

Quando foi efetuada a segunda avaliação, observou-se que o número de brotos permaneceu constante na ausência de BAP, mesmo em níveis crescentes de ANA (Quadro 9).

Com a adição de BAP-0,05 mg.l⁻¹, não houve diferença significativa para número de brotos, com uma tendência, na presença de ANA-0,01 mg.l⁻¹, deste número ser superior, o que está ilustrado na Figura 12. O mesmo foi observado quando 0,5 mg.l⁻¹ de BAP foi adicionado.

QUADRO 9 - Número médio de brotos obtidos em culturas in vitro de segmentos nodais de E. grandis, em diferentes concentrações de BAP e ANA, em três avaliações. ESAL, Lavras MG, 1988.

Avaliações (dias)	BAP (mg.l ⁻¹)	ANA (mg.l ⁻¹)		
		0,00	0,01	0,10
15	0,0	1,5 bA	1,4 bA	1,0 bA
	0,05	3,8a A	5,7a A	5,9a A
	0,5	2,7a B	5,9a A	3,6a AB
30	0,0	1,7 bA	1,7 bA	1,7 bA
	0,05	5,7a A	9,1a A	5,3a A
	0,5	6,3a A	9,7a A	5,3a A
45	0,0	2,4 bA	2,6 bA	1,4 bA
	0,05	7,4a A	10,0a A	7,7a A
	0,5	11,0a A	15,6a A	10,1a A

1 As médias seguidas de mesma letra (minúscula para níveis de BAP e maiúscula para níveis de ANA) não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

Os melhores resultados obtidos foram com BAP-0,05;0,5 em combinação com ANA-0,01 mg.l⁻¹, podendo ser provavelmente devido ao efeito residual do ANA. Na última avaliação (Quadro 9), observou-se que na ausência de BAP houve a formação de um número reduzido de brotos mesmo em níveis crescentes de ANA. Com a adição de BAP-0,05 mg.l⁻¹ em níveis crescentes de ANA, não houve diferen

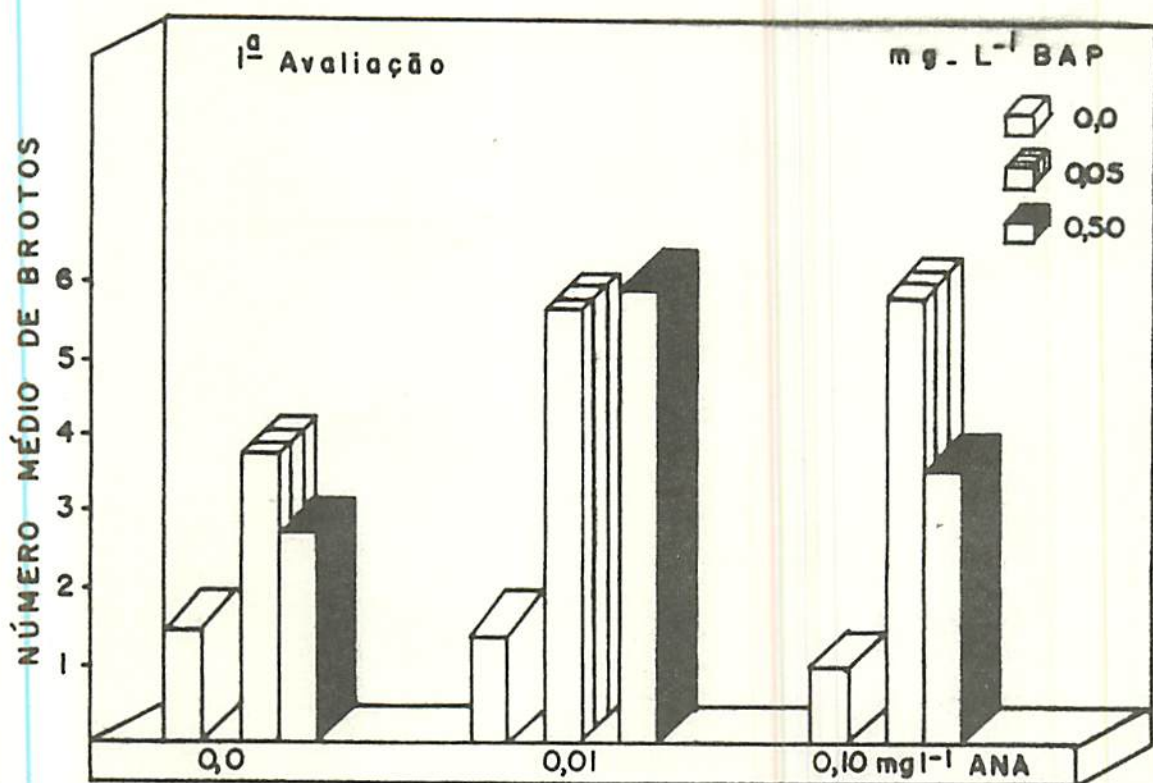


FIGURA 11 - Número médio de brotos de *E. grandis* em diferentes concentrações de BAP e ANA, primeira avaliação. ESAL, Lavras-MG. 1988.

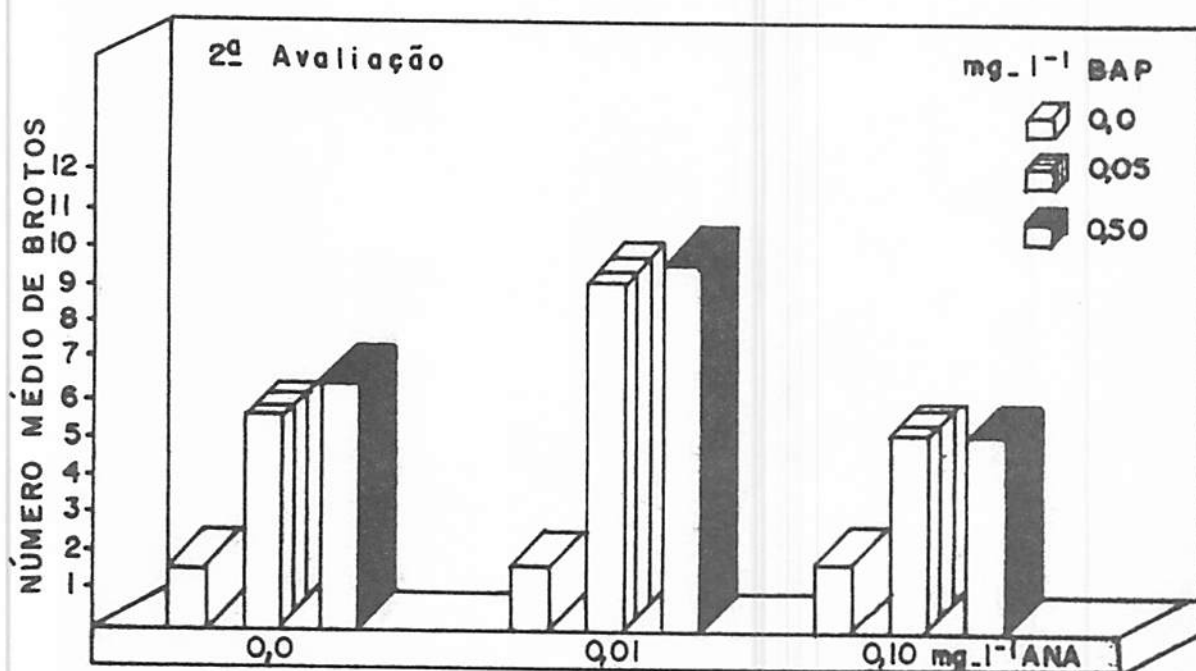


FIGURA 12 - Número médio de brotos de *E. grandis* em diferentes concentrações de BAP e ANA, segunda avaliação. ESAL, Lavras-MG. 1988.

ça significativa, com uma tendência que na presença de ANA-0,01 mg.l⁻¹ deste número ser superior.

O melhor resultado obtido foi com a adição de BAP-0,5 e ANA-0,01 mg.l⁻¹, o que pode ser observado na Figura 13.

Para as três avaliações efetuadas, observou-se que os melhores resultados foram obtidos em níveis constantes, ou seja, BAP-0,50 e ANA-0,01 mg.l⁻¹.

A multiplicação inicial foi muito baixa, onde em média 3,5 brotos foram formados por explante inoculado, o que pode ter sido induzido principalmente pelo traumatismo da adaptação das condições in vitro, como observado por GONÇALVES (22).

Durante a segunda avaliação, a taxa de multiplicação inicial foi em média de 5,2 brotos isolados por explante inoculado, esta taxa foi inferior a obtida por GONÇALVES (22), onde 9-11 brotos isolados foram obtidos durante a segunda subcultura, mas concorda com o relatado por CAMPINHOS & IKEMORI (10), que nas primeiras subculturas a taxa de multiplicação é baixa.

Existiu uma tendência de aumento da taxa de multiplicação após transferências regulares, foram obtidos em média 7,6 brotos, sendo que uma taxa máxima de 15,6 brotos isolados foram obtidos na presença de BAP-0,5 e ANA-0,01 mg.l⁻¹, o que foi semelhante ao obtido por CAMPINHOS & IKEMORI (10).

Foi observado que se a propagação for continuada em meio com altas concentrações de BAP e ANA, as plântulas se apresentavam com uma coloração clara, quase vítrea e transparente com folhas e caules frágeis. Logo, foi necessária uma redução no

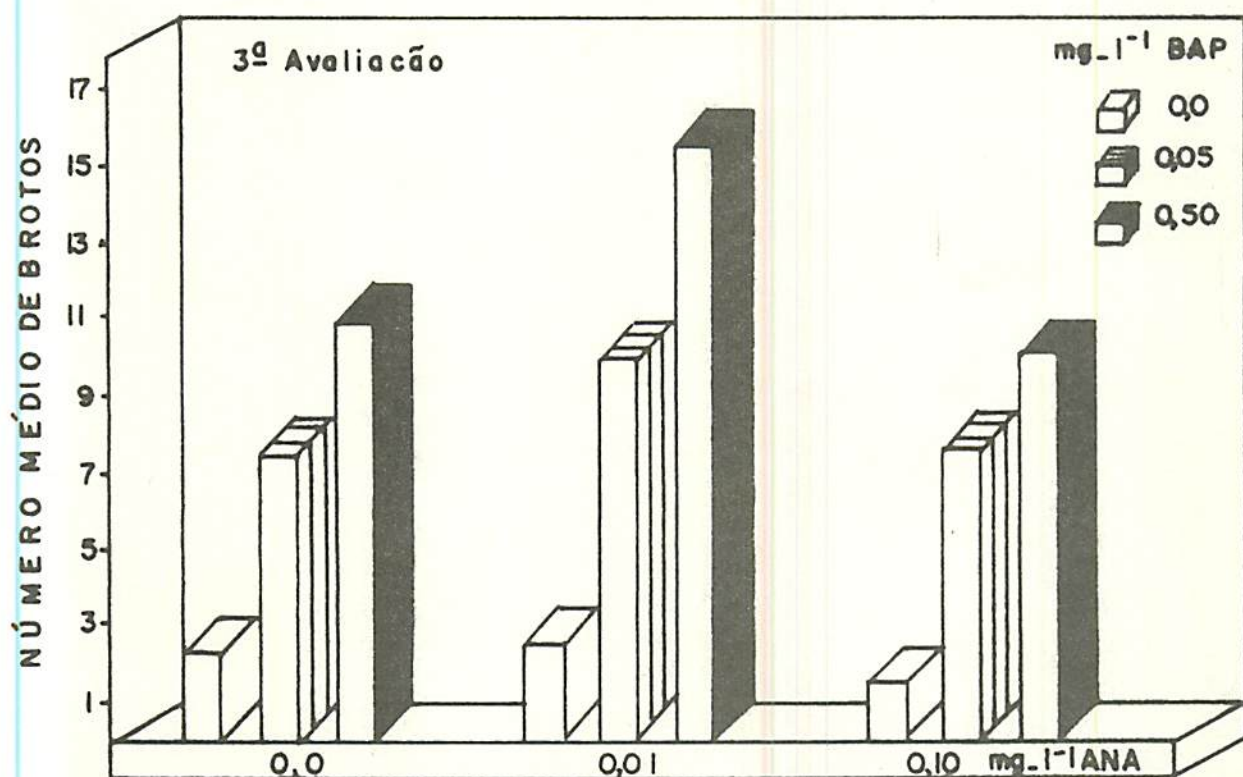


FIGURA 13 - Número médio de brotos de *E. grandis* em diferentes concentrações de BAP e ANA, na terceira avaliação. ESAL, Lavras-MG. 1988.

nível de BAP, mesmo com uma redução da taxa de multiplicação, para que plântulas mais vigorosas fossem formadas, o que também foi relatado por FRANCKET & BOULAY (18).

A variação da taxa de multiplicação em culturas de brotos de E. grandis nas culturas iniciais deve ter sido principalmente efeito do estado fisiológico dos explantes, onde foi necessária uma adaptação as condições de propagação in vitro.

4.4.2. Altura média de plântulas

Quando se utilizou níveis de BAP e ANA, existiu alongamento de alguns brotos entre o tufo de gemas formado.

As maiores alturas médias, na primeira avaliação, foram obtidas quando os brotos estavam inoculados em meio com a presença de BAP-0,05 e ANA-0,01 e 0,1 mg.l⁻¹ (Quadro 10).

Ao se efetuar a segunda avaliação, observou-se que as maiores alturas se encontravam em meio suplementado com BAP-0,05 e ANA-0,01 e 0,1 mg.l⁻¹, o que mostrou seguir a mesma tendência do observado na primeira avaliação (Quadro 10). No Quadro 10 observa-se que, na terceira avaliação, as melhores alturas obtidas foram quando os brotos estavam inoculados em meio com um balanço hormonal de BAP-0,05 e ANA-0,01 e 0,1 mg.l⁻¹.

De um modo geral, para as três avaliações efetuadas, observou-se que na presença de BAP-0,05 e ANA-0,01 e 0,1 mg.l⁻¹,

QUADRO 10 - Altura média (cm) de plântulas obtidas em cultura in vitro de segmentos nodais de E. grandis, em diferentes concentrações de BAP e ANA, em três avaliações. ESAL, Lavras-MG. 1988.

Avaliações (dias)	BAP (mg.l ⁻¹)	ANA (mg.l ⁻¹)		
		0,00	0,01	0,10
15	0,0	0,48a A	0,54abA	0,50 bA
	0,05	0,50a A	0,71a A	0,69abA
	0,5	0,54a AB	0,47 b B	0,75a A
30	0,0	0,59a A	0,72abA	0,52a A
	0,05	0,66a A	0,89a A	0,77a A
	0,5	0,55a A	0,60 bA	0,73a A
45	0,0	0,66a AB	0,83abA	0,49 b B
	0,05	0,71a B	1,01a A	0,80a AB
	0,5	0,58a A	0,66 bA	0,71a A

1 As médias seguidas de mesma letra (minúscula para níveis de BAP e maiúscula para níveis de ANA) não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

existiu uma tendência de se obter as maiores alturas.

Com a adição de altas concentrações de citocinina em níveis crescentes de auxina, foi observado que o número de brotos pode aumentar (Quadro 10), mas o crescimento individual também pode ser muito prejudicado.

Baseando-se nas observações feitas, foi requerido para alongamento in vitro um meio com baixa concentração de auxina na presença de giberelina (Quadro 11).

Os níveis de giberelina utilizados tiveram pequeno efeito no alongamento dos brotos, mas não afetaram o desenvolvimento dos brotos, o que concorda com o relatado por FRANCKET & BOULAY (18).

Embora tenha havido um pequeno aumento de altura quando o meio foi suplementado com $GA_3-0,5$ e ANA $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ (Figura 14), este fato não refletiu de maneira significativa no número de brotos viáveis, pois o aumento da altura ocorreu principalmente por causa do aumento das distâncias internodais. A tendência de os efeitos da giberelina serem maiores nos internódios está de acordo com as observações feitas por MILLER et alii (35) e explica a ausência de significância no número de brotos alongados de E. grandis, aos quarenta e cinco dias após a inoculação em meio contendo $GA_3-0,1$ e $0,5$ e ANA- $0,01$ e $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ (Quadro 12).

No processo de propagação as taxas de multiplicação são influenciadas principalmente pelo número de brotos viáveis, esse parâmetro é o mais importante quando plântulas são multiplicadas através de suas gemas. Embora a altura dê uma idéia geral das taxas de multiplicação, não é, contudo, parâmetro adequado para avaliar o comportamento dos explantes em meio de cultura, nem a eficiência da técnica, pois o que realmente importa é o vigor das plântulas obtidas, com parte aérea e raízes bem formadas e isso pode não ocorrer em meio com citocinina e auxina, implicando às vezes a necessidade de se adicionar giberelina (Figura 15).

QUADRO 11 - Altura média (cm) de plântulas obtidas em cultura in vitro de segmentos nodais de E. grandis em diferentes concentrações de GA₃ e ANA, em três avaliações. ESAL, Lavras-MG. 1988.

Avaliações (dias)	GA ₃ (mg.l ⁻¹)	ANA (mg.l ⁻¹)		
		0,00	0,01	0,10
15	0,0	0,52a B	0,61aAB	0,77a A
	0,1	0,53aA	0,71aA	0,63abA
	0,5	0,46aA	0,40aA	0,53 bA
30	0,0	0,56aA	0,72aA	0,48 bA
	0,1	0,63aA	0,77aA	0,85a A
	0,5	0,61aA	0,80aA	0,69abA
45	0,0	0,60aAB	0,73aA	0,46 b B
	0,1	0,71aA	0,83aA	0,88a A
	0,5	0,64a B	0,94aA	0,66a B

1 As médias seguidas de mesma letra (minúscula para níveis de GA₃ e maiúscula para níveis de ANA) não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

Um bom crescimento das hastes é crítico quando a multiplicação é feita através do cultivo de segmentos nodais, onde a taxa de multiplicação é, na maioria das vezes, diretamente proporcional a elongação e ao número de segmentos nodais viáveis ao final da cultura.

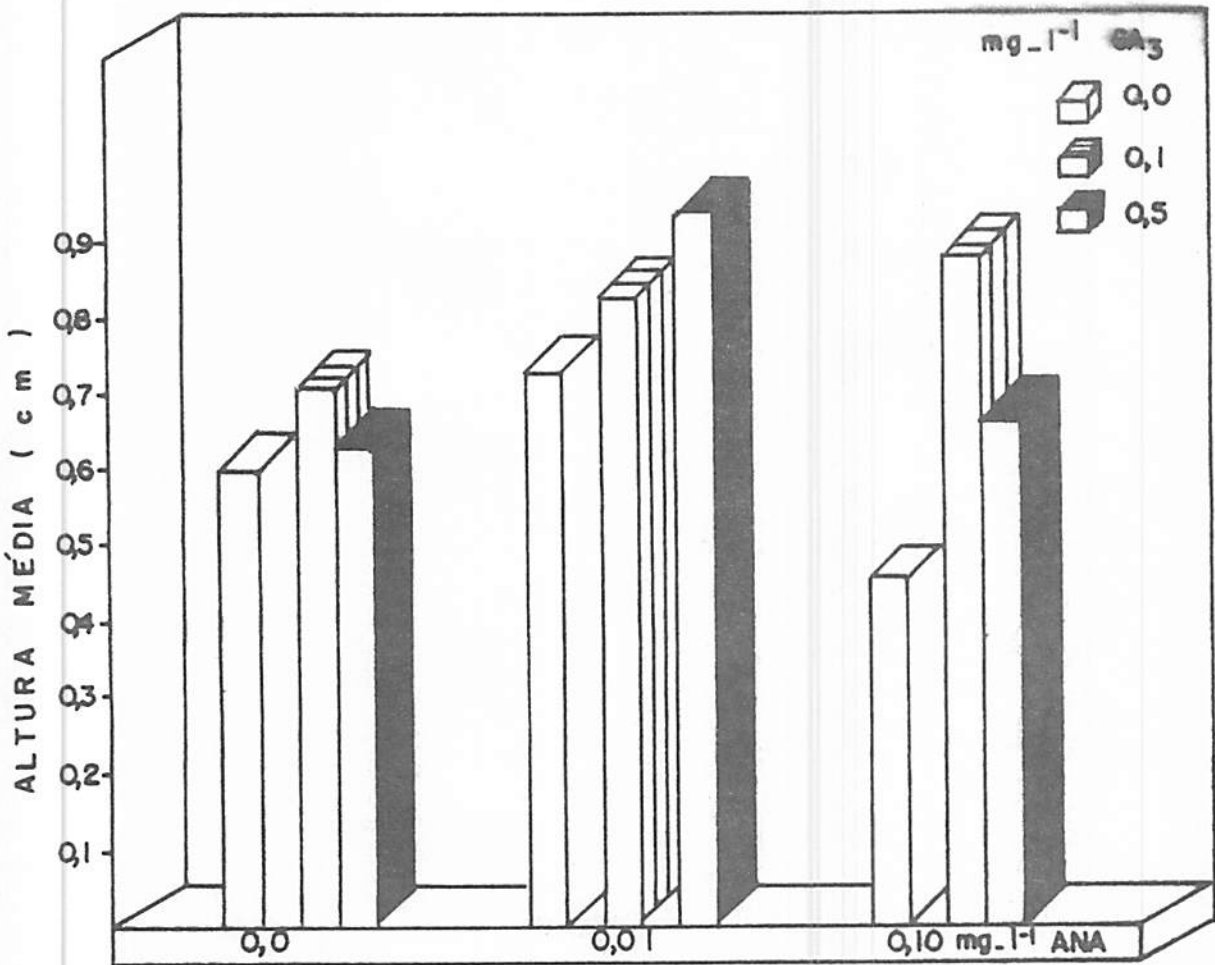


FIGURA 14 - Altura média de plântulas obtidas em cultura in vitro de segmentos nodais de E. grandis. ESAL, Lavras-MG. 1988.

QUADRO 12 - Número médio de brotos com mais de 0,5 cm de comprimento obtidos em cultura in vitro de segmentos nodais de E. grandis em diferentes concentrações de GA₃ e ANA.

GA ₃ (mg.l ⁻¹)	ANA (mg.l ⁻¹)		
	0,0	0,01	0,1
0,0	3,5 bA	3,9 bA	3,5 bA
0,1	9,1a A	11,7a A	7,9a A
0,5	6,3 bA	8,5a A	5,3a A

1 As médias seguidas de mesma letra (minúscula para níveis de GA₃ e maiúscula para níveis de ANA) não diferem entre si pelo teste Tukey 5%.

Quanto ao sistema radicular, foi observado que em meio suplementado com ANA-0,0 e GA₃-0,1 mg.l⁻¹ foi o que proporcionou uma melhor formação do sistema radicular, o que pode ser observado na Figura 16.

Durante as avaliações realizadas, observou-se que muitos brotos se apresentavam com um escurecimento nas partes inferiores, após a repicagem, o que pode ser observado na Figura 17. Este escurecimento pode em alguns casos contribuir para um crescimento lento dos brotos e em outros faz com que os brotos não sobrevivem, provavelmente devido ao fato de substâncias tóxicas serem formadas ou devido ao estresse do tecido provocado pela transferência para um novo meio.

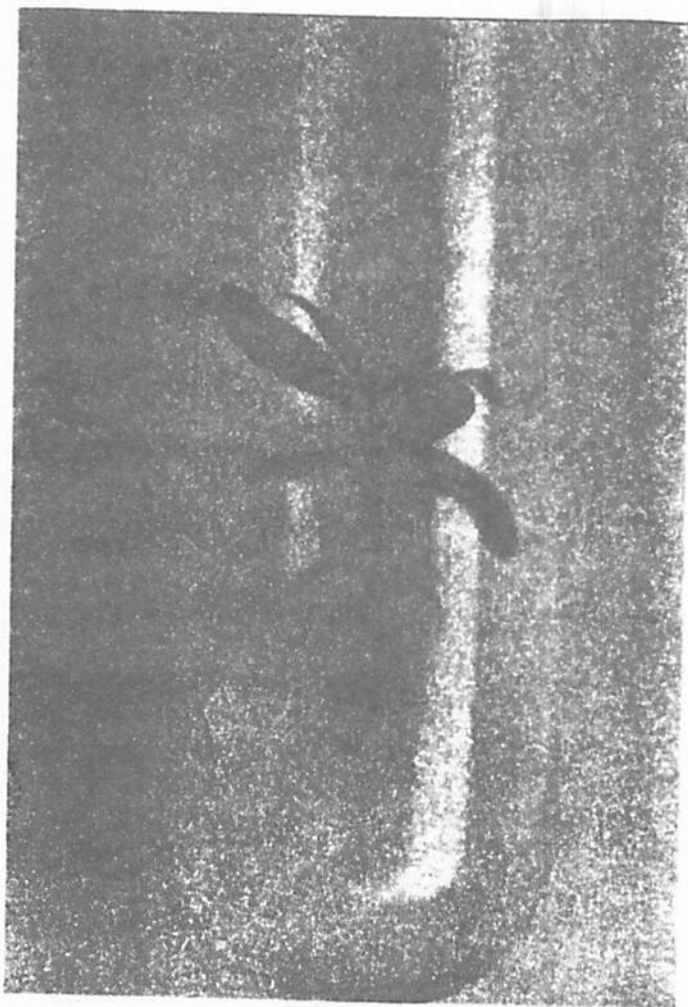


FIGURA 15 - Plântula de E. grandis obtida através da cultura in vitro de segmento nodal. ESAL, Lavras-MG. 1988.



FIGURA 16 - Formação de raízes em plântulas de E. grandis obtidas in vitro. ESAL, Lavras-MG. 1988.

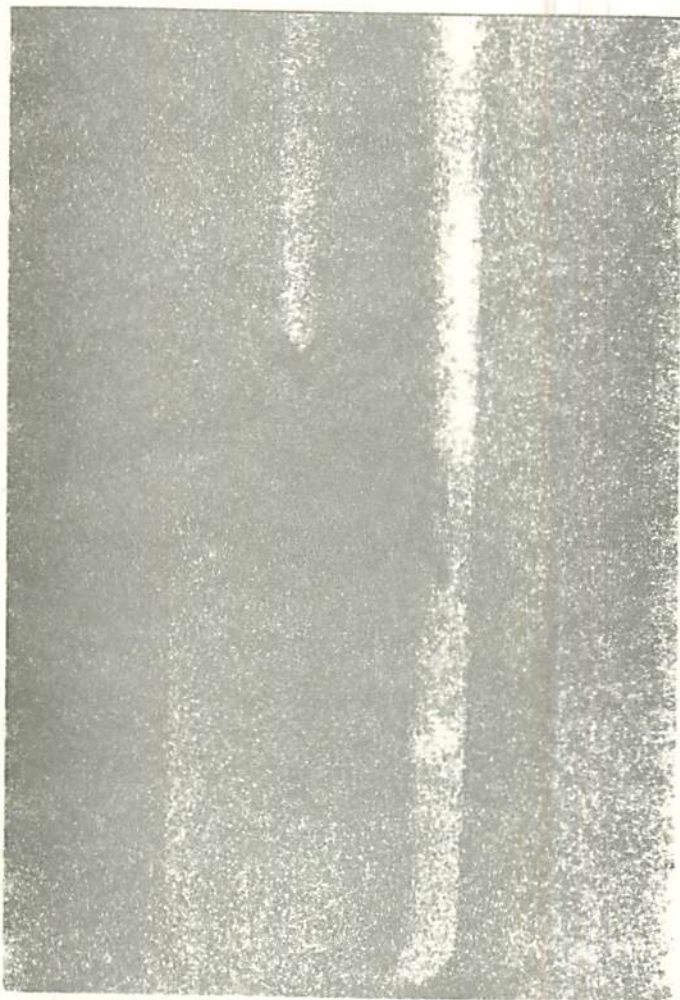


FIGURA 17 - Escurecimento de plântulas de E. grandis obtidas in vi
tro. ESAL, Lavras-MG. 1988.

5. CONCLUSÕES

A análise dos resultados permitiu chegar às seguintes conclusões:

- a contaminação fúngica foi reduzida com o uso de Benomyl na concentração de 50 mg.l^{-1} em meio sólido;
- o índice de sobrevivência dos explantes diminuiu com o aumento das concentrações de Benomyl;
- o PVP (10 mg.l^{-1}) foi o antioxidante mais eficiente para reduzir a oxidação fenólica; concentrações mais altas de PVP, causam danos aos brotos;
- as taxas mais altas de multiplicação foram atingidas quando se utilizou BAP ($0,5-1,0 \text{ mg.l}^{-1}$) na ausência e nas concentrações de $0,1$ e $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA;
- explantes secundários com mais brotos aumentaram a taxa de multiplicação; melhores taxas foram obtidas nas concentrações de $0,5$ e $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ de BAP e ausência ou $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ de ANA.
- o maior número médio de brotos foi obtido com a adição de BAP- $0,5$ e ANA- $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$;

- As melhores alturas médias foram obtidas em concentrações de GA₃-0,1 e 0,5 e ANA-0,01 e 0,1 mg.l⁻¹.

6. RESUMO

Procurou-se através deste trabalho alternativas para redução da contaminação fúngica e prevenção da oxidação fenólica; multiplicação in vitro de segmentos nodais de E. grandis, provenientes de brotações em cepa crescidas no campo.

Segmentos nodais em torno de 1,5 cm de comprimento, após o método padrão de desinfestação foram inoculados em meio DE FOSSARD, sólido e líquido, suplementado com concentrações de 0,0; 50,0; 100,0; 500,0 e 1000,0 mg.l⁻¹ de Benomyl. Houve uma redução de 30% na taxa de contaminação e 70% dos segmentos nodais sobreviveram em meio sólido contendo 50,0 mg.l⁻¹ de Benomyl.

Segmentos nodais assépticos foram inoculados em meio sólido DE FOSSARD suplementado com diferentes antioxidantes, na concentração de 10 g.l⁻¹ e com 0,05 g.l⁻¹ de fungicida. Observou-se que o PVP se sobressaiu aos demais antioxidantes testados, proporcionando uma taxa de 90,0% de explantes não oxidados. Baseando-se na eficiência do PVP, concentrações de 0,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg.l⁻¹ foram utilizadas. A redução da oxidação fenólica associada com uma melhor formação de brotos foi possível utilizando-

se $10,0 \text{ mg.l}^{-1}$ em meio sólido.

Brotos obtidos in vitro resultantes dos ensaios anteriores foram multiplicados em meio DE FOSSARD, adicionado de BAP-0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e $4,0 \text{ mg.l}^{-1}$ e ANA-0,0; 0,1; 0,2 e $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ em todas as combinações possíveis. A melhor taxa de multiplicação foi observada com a presença de BAP-0,5; 1,0 e ANA-0,0; 0,1 e $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$.

Para obtenção de plântulas com parte aérea e raízes, brotos assépticos foram multiplicados e alongados em meio de FOSSARD, suplementado com BAP-0,0; 0,05; 0,5 e ANA-0,0; 0,01; 0,1 ou GA_3 -0,0; 0,1; $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$. A formação de um maior número de brotos foi observada em meio contendo BAP-0,5 e ANA-0,01 mg.l^{-1} . O alongamento dos brotos foi possível com a presença de GA_3 -0,1; 0,5 e ANA-0,01; 0,1 mg.l^{-1} . O balanço hormonal de GA_3 -0,1 e ANA-0,01 foi o que proporcionou um maior número de plântulas e uma melhor formação do sistema radicular.

7. SUMMARY

The present study was carried out in order to obtain alternatives for reducing fungical contamination and prevent phenolic oxidation of in vitro nodal segments of E. grandis from field-grown coppice regrowth.

Nodal segments about 1,5 cm long, after an standart desinfestation method, were inoculated in DE FOSSARD, solid and liquid medium, supplemented with Benomyl concentrations 0,0; 50,0; 100,0; 500,0 and 1000,0 mg^{1-1} . There was a reduction of 30% in contamination rate, and 70% of the nodal segments survived at the end of the culture in solid medium with 50,0 mg^{1-1} of Benomyl.

Asseptic nodal segments were inoculated in DE FOS - SARD medium supplemented with different anti-oxidants, in 10,0 mg^{1-1} concentration and 0,05 g^{1-1} of Benomyl. Better results were obtained on PVP with 90% of non-oxidated explants. The reduction of phenolic oxidation was possible using 10,0 mg^{1-1} PVP in solid medium.

Shoots obtained "in vitro" were multiplied in DE FOS SARD medium, supplemented with all possible combinations of BAP-0,0;

0,5; 1,0; 2,0 and 4,0 mg^{-1} and NAA-0,0; 0,1; 0,2 and 0,4 mg^{-1} . Better multiplication rate was obtained with BAP-0,5; 1,0 and NAA-0,0; 0,1 and 0,2 mg^{-1} .

Asseptic shoots, for obtaining plantlets with leaves and roots, were regenerated in DE FOSSARD medium supplemented with BAP-0,0; 0,5; 0,5 and NAA-0,0; 0,01; 0,1 or GA_3 -0,0; 0,1; 0,5 mg^{-1} . The best shoot formation was obtained in medium with BAP-0,5 and NAA-0,01 mg^{-1} . The elongation was obtained more efficiently with GA_3 -0,1; 0,5 and NAA-0,01; 0,1 mg^{-1} . In the hormonal level of GA_3 0,1 and NAA-0,01 mg^{-1} the highest number of plantlets and roots was obtained.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANEJA, D. & ATAL, C. Plantlet formation in tissue culture from lignotubers of Eucalyptus citriodora (Hook). Current Science, Bangalore, 38:69-70, 1969.
2. ARYA, H.C. & SHEKHAWAT, N.S. Clonal multiplication of tree species in the Thar desert through tissue culture. Forest Ecology and Management, Amsterdam, 16:201-8, 1986.
3. BACHELARD, E.P. & STOWE, B.B. Growth in vitro of roots of Acer rubrum and Eucalyptus camaldulensis. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 16(1):20-30, 1963.
4. BADIA, N. Eucalyptus rudis Endl. Techniques de micropropagation par la culture de noeuds in vitro. In: COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LA CULTURE IN VITRO DES ESSENCES. Fontaine - bleau, France, 1981. p.135-42.
5. BAJAJ, YPS. In vitro production of haploides. In: EVANS, D. A.; SHARP, W.; AMMIRATO, P.V. & YAMADA, Y. (eds). Hand - book of plant cell culture; techniques for propagation and breeding. New York, MacMillan, 1983. p.228-87.

6. BARKER, P.K.; DE FOSSARD, R.A. & BOURNE, R.A. Progress to - ward propagation of eucalyptus species by tissue culture techniques. IN: INTERNATIONAL PLANT PROPAGATORS' SOCIETY COMBINED PROCEEDINGS. 1977. v.27, p.546-56.
7. BENNETT, I.J. & McCOMB, J.A. Propagation of jarrah (Eucalyptus marginata) by organ and tissue culture. Australian Forestry Research, East Melbourne, 12(2):121-7, Mar. 1982.
8. BURGER, D.W. In vitro propagation of Eucalyptus sideroxylon. HortScience, Virginia, 22(3):496-7, June 1987.
9. CALDAS, S.L. & KITAHARA, H.E. Shoot and root formation in hypocotyl callus cultures of eucalyptus. Forest Science, Washington, 21(3):242-3, Sept. 1975.
10. CAMPINHOS, J.E. & IKEMORE, Y.K. Tree improvement program of Eucalyptus spp; preliminary results. In: WORLD CONSULTATION ON FOREST TREE BREEDING, 3, Canberra, 1977. Proceedings... Canberra, CSIRO, 1978, v.2., p.717-38.
11. CAREY, G. The leaf buds of some woody perennials in the New South Waales flora. Proceedings Linnean Society, Victoria, 55:708-37, 1930.
12. CRESSWELL, R. & NITSCH, C. Organ culture of Eucalyptus grandis, Planta, New York, 125:87-90, 1975.
13. DE FOSSARD, R.A. Tissue culture propagation of Eucalyptus ficifolia F. Muell. In: PROCEEDINGS OF THE SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE. Peking, Science Press, 1976. p.425-38.

14. DE FOSSARD, R.A.; NITSCH, C.; CRESSWELL, R.J. & LEE, E.M. Tissue and organ culture of Eucalyptus. New Zealand Journal of Forestry Science, New Zealand, 4(2):267-78, 1974.
15. DICELLO, N. & DUHOX, E. Organogenesis and multiplication in vitro of E. camaldulensis - propagation via seedling callus culture. Journal of Plant Physiology, 115(3):177-82, 1984.
16. DURAND-CRESSWELL, R. & NITSCH, C. Factors influencing the regeneration of Eucalyptus grandis by organ culture. Acta Horticulturae, 78:149-55, 1977.
17. FAO. Eucalyptus for planting. Rome, 1979. p.1-29.
18. FRANCIET, A. & BOULAY, M. Micropropagation of frost resistant eucalyptus clones. Australian Forestry Research, Melbourne, 13(1):83-9, Mar. 1982.
19. GEORGE, E.F. & SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture; handbook and directory of commercial laboratories. Eversley, Exegetics, 1984. 709p.
20. GOLFARI, L.; CASER, R.L. & MOURA, V.P.G. Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil; 2ª aproximação. Belo Horizonte, IBDF, 1978. 66p. (Série Técnica, 11).
21. GONÇALVES, A.N. The growth and developmental physiology of Eucalyptus in cell and tissue culture systems. Columbus, Ohio Univ., 210p. 1975. (MS).

22. GONÇALVES, A.N. Reversão à juvenilidade e clonagem de E. urophylla S.T. Blake - em sistemas de culturas de células e de tecido. Silvicultura, Piracicaba, 4(32):786-7, set./out. 1983.
23. _____. Reversão à juvenilidade e clonagem de E. urophylla S.T. Blake in vitro. Piracicaba, ESALQ, 1982. 97p. (Tese Doutorado).
24. GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F. & JAGANNATHAN, V. Tissue culture of forest trees - clonal propagation of mature trees of E. citriodora Hook by tissue culture. Plant Science Letters, Elsevier, 20(3):195-201, 1980.
25. HALDEMAN, J.H.; THOMAS, R.L. & MCKAMY, D.L. Use of benomyl and rifampicin for in vitro shoot culture of Camellia sinensis and C. japonica. HortScience, Virginia, 22(2):306-7, Apr. 1987.
26. HALL, N. & JOHNSON, R.D. & CHIPPENDALE, G.M. Forest trees of Australia. Canberra, Australian Government, 1970. p. 54-5.
27. HARTNEY, V.J. & BARKER, P.K. Vegetative propagation of Eucalyptus by tissue culture. Silvicultura, Piracicaba, 4:791-3, set./out. 1983.
28. IKEMORI, Y. Epicormic shoots the from branches of Eucalyptus grandis as an explant source for in vitro culture. Commonwealth Forestry Review, London, 64(4):351-6, 1987.

29. JACOBS, M.R. Growth habits of the eucalyptus. Canberra, Commonwealth Government Printer, 1950. 262p.
30. LAMEIRA, O.A. Propagação in vitro da bananeira Musa, através da cultura de ápice caulinar. Lavras, ESAL, 1987. 39p. (Tese MS).
31. LEE, E.C.M. & DE FOSSARD, R.A. The effects of various auxins and cytokinins on the vitro culture of stem and lignotuber tissue of E. bancroftii. The New Phytologist, Oxford, 73: 707-17, 1974.
32. McCOMB, J.A. & BENNETT, I.J. Vegetative propagation of Eucalyptus using tissue culture and its application to forest improvement in western Australia. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 5, Tokio, 1982. Proceedings... Tokio, Japanese Association for Plant Tissue Culture, 1982, p.721-2.
33. MASCARENHAS, A.F.; HAZARA, S.; POTDAR, W.; KULKAR, N.I. & GUPTA, P.K. Rapid clonal multiplication of mature forest trees through tissue culture. In: INTERNATIONAL CONGRESS PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 5, Tokio, 1981. Proceedings... Tokio, Japanese Association for Plant Tissue Culture, 1982, p.719-20.
34. MEHRA-PALTA, A. Clonal propagation of eucalyptus by tissue culture. Plant Science Letters, Elsevier, 26(1/3):1-11, July/Aug. 1982.

35. MILLER, P.R.; AMIROUCHE, L.; STUCHBURY, T. & MATTEWS, S. The use of plant growth regulators in micropropagation of slow growing potato cultivars. Potato Research, Wageningen, 28 (4):427-86, 1985.
36. MURALIDHARAN, E.M. & MASCARENHAS, A.F. In vitro plantlet formation by organogenesis in E. camaldulensis and by somatic embryogenesis in Eucalyptus citriodora. Plant Cell Reports, Berlin, 6:256-59, 1987.
37. MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 15(3):473-97, 1962.
38. OUYANG, Q.; PENG, H.Z. & LIQQ. Studies on the development of embryoids from Eucalyptus callus. Science Silviculture Sin, 17:1-7, 1981.
39. PATON, D.M.; WILLING, R.R.; NICHOLLS, W. & PRYOR, L.D. Rooting of stem cuttings of Eucalyptus, a rooting inhibitor in adult tissue. Australian Journal of Botany, Melbourne, 18: 75-83, 1970.
40. PENFOLD, A.R. & WILLIS, J.A. The Eucalyptus: botany, cultivation, chemistry and utilization. London, Interscience, 1961, p.197-204.
41. PRYOR, L.D. The biology of Eucalyptus. London, Edward Arnolds, 1976. p.182.
42. RIZZINI, C.T. Árvores e madeiras úteis do Brasil; manual de dendrologia brasileira. São Paulo, Edgard Blucher, 1971. p.294.

43. SANKARA RAO, K. & VENKATESWARA, R. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of Eucalyptus grandis L. Plant Science, Berkeley, 40(1):50-1, Aug. 1985.
44. SITA, L.G. & RANI, B.S. In vitro propagation of E. grandis by tissue culture. Plant Cell Reports, Berlin, 4(2):63-5, 1985.
45. SITA, L.G. & VAIDJHARAN, R.D. Micropropagation of E. grandis and E. nitens using tissue culture techniques. South African Forestry Journal, Pretoria, 135:20-3, 1985.
46. SMITH, M.A.L. & McCOWN, B.H. A comparison of source tissue for protoplast isolation from three woody plant species. Plant Science Letters, Elsevier, 28(2):149-56, Jan. 1983.
47. SUSSEX, I.M. The origin and morphogenesis of eucalyptus cell population. In: WHITE, P.R. International Conference on Plant Tissue Culture. Berkeley, Mc Cutchen. 1965. p.383-91.
48. THORPEL, T.A. & PATEL, K.P. Clonal propagation adventitious buds. In: VASIL, I.K. Cell culture and somatic cell genetics of plants. Orlando, Academic Press, 1984. v.1., p. 49-60.

APÊNDICE

APENDICE I - Resumo da análise de variância para multiplicação in

vitro de protos de *E. grandis* em diferentes concen -
trações de reguladores de crescimento. ESAL, Lavras -
MG. 1988.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância
--------------------	----	----------------------------------

Explantante (E)	2	27,428**
-----------------	---	----------

BAP	4	26,455**
-----	---	----------

(E) x BAP	8	0,551**
-----------	---	---------

ANA	3	4,129**
-----	---	---------

(E) x ANA	6	0,311**
-----------	---	---------

BAP x ANA	12	2,271**
-----------	----	---------

Resíduo	120	0,068
---------	-----	-------

CV (%)	8,83
--------	------

1 Dados transformados em $(x + 0,15)^{1/2}$.

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

APÊNDICE 2 - Resumo da análise de variância para número de protos

obtidos através da cultura *in vitro* de explantes de *E. grandis*, em diferentes concentrações de reguladores de crescimento em três avaliações. ESAL, Lavras-MG, 1988.

Quadrados médios e significância

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância		
		1	2	3
GA ₃	2	5,160**	9,220**	16,206**
BAP	2	15,846**	28,305**	64,663**
GA ₃ x BAP	4	4,237**	8,20**	9,272**
ANA	2	2,405**	4,208**	3,965**
GA ₃ x ANA	4	0,557**	0,761**	0,848*
BAP x ANA	4	0,852**	0,875**	0,510*
Resíduo	168	0,198	0,509	0,455
CV (%)		23,33	30,87	24,78

1 Dados transformados em $(x + 0,5)^{1/2}$

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

APÊNDICE 3 - Resumo da análise de variância para altura média de plântulas obtidas através da cultura in vitro de explantes de E. grandis, em diferentes concentrações de reguladores de crescimento. ESAL, Lavras-MG. 1988.

Causas de variação	GL	Quadrados médios e significância		
		1	2	3
GA ₃	2	0,564**	0,443**	0,713**
BAP	2	0,257**	0,400**	0,687**
GA ₃ x BAP	4	0,195**	0,183**	0,291**
NAA	2	0,321**	0,431**	0,654**
GA ₃ x ANA	4	0,137**	0,170**	0,249**
BAP x ANA	4	0,213**	0,164**	0,277**
Resíduo	162	0,034	0,040	0,044
CV (%)		32,03	29,53	29,32

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.