



**LETÍCIA VAZ MOLINARI**

**ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA E MIXOTROFISMO NA  
MICROPROPAGAÇÃO DE MATRIZES ADULTAS DE  
*Corymbia maculata* Hill & Johnson**

**LAVRAS - MG**

**2020**

**LETÍCIA VAZ MOLINARI**

**ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA E MIXOTROFISMO NA  
MICROPROPAGAÇÃO DE MATRIZES ADULTAS DE  
*Corymbia maculata* Hill & Johnson**

Dissertação 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 Mestre.

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).

Molinari, Letícia Vaz.

Esterilização química e mixotrofismo na micropropagação de  
matrizes adultas de *Corymbia maculata* Hill & Johnson / Letícia  
Vaz Molinari. - 2020.

69 p.: il.

Orientador (a): Gilvano Ebling Brondani.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Propagação Vegetativa. 2. Cultivo *in vitro*. 3. Trocas  
Gasosas. I. Brondani, Gilvano Ebling. II. Título.

**LETÍCIA VAZ MOLINARI**

**ESTERILIZAÇÃO QUÍMICA E MIXOTROFISMO NA  
MICROPROPAGAÇÃO DE MATRIZES ADULTAS DE  
*Corymbia maculata* Hill & Johnson**

Dissertação 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 Mestre.

APROVADA em 06 de março de 2020.

Dra. Dulcineia de Carvalho - UFLA

Dr. Leandro Silva de Oliveira - UFMG

Dr. Gilvano Ebling Brondani - UFLA

Prof. Dr. Gilvano Ebling Brondani  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2020**

*A toda a minha família, principalmente meus pais Josiana e Carlos, meus irmãos Carlos Henrique, Laís e Larissa, pelo apoio incondicional, carinho e compreensão.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Engenharia Florestal, pela oportunidade.

À PROTECA e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Ao professor Gilvano Ebling Brondani, pela orientação, paciência e disposição para ajudar.

À professora Dulcineia de Carvalho, pelo carinho e ensinamentos durante toda a minha trajetória acadêmica.

[...] A todos os funcionários do DCF/UFLA.

A todos os colegas de departamento e laboratório, pois muitos se tornaram amigos.

Aos meus pais Josiana e Carlos, por serem as pessoas mais importantes da minha vida, por todo o apoio, carinho, dedicação e investimento na minha carreira.

Aos meus irmãos Carlos Henrique, Larissa e Laís, por me apoiarem diante das dificuldades e por compartilhem comigo os melhores momentos.

Ao meu melhor amigo e companheiro de todas as horas, por todo amor e dedicação, Elves.

Aos meus amigos de laboratório pelos muitos momentos compartilhados.

As minhas amigas do SAIDERA, minha saudade diária.

E a todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

*“Fazer-me discernir o propósito dos teus preceitos; então meditarei nas tuas maravilhas. A minha alma se consome de tristeza fortalece-me conforme a tua promessa”. (Salmo c.119, v. 27-28)*

## RESUMO

O gênero *Corymbia* destaca-se por ter espécies resistentes a estresses abióticos e bióticos, e densidade alta da madeira, ideal para serraria, dormentes, mourões, postes, construções pesadas, lenha e carvão. Devido à expansão dos plantios para áreas não convencionais e a busca para melhoria da matéria prima final, tem ampliado as combinações híbridas. Porém, a maioria dessas espécies apresenta dificuldade no enraizamento adventício por estaquia e/ou miniestaquia, principalmente se tratando de material vegetativo adulto. Nesse sentido, a presente proposta tem por finalidade aperfeiçoar os procedimentos da cultura de tecidos da espécie *Corymbia maculata*, por meio do resgate de matrizes adultas e pela definição de um protocolo de micropropagação, com potencial para aplicação em programas de melhoramento. Para a multiplicação de gemas axilares foram utilizadas brotações oriundas do estabelecimento *in vitro* de duas matrizes adultas, onde se avaliou concentrações de cloro ativo [0,000%; 0,001%; 0,003% e 0,005% (v/v)] e duas concentrações de BAP (0,5 mg L<sup>-1</sup> e 1,0 mg L<sup>-1</sup>). O número de gemas emitidas, clorose, oxidação e contaminação fúngica foram avaliados no final de cada subcultivo. Para o alongamento de brotações foram testadas concentrações de cloro ativo [0,000%; 0,001%; 0,003% e 0,005% (v/v)] e duas concentrações de ANA (0,5 mg L<sup>-1</sup> e 1,0 mg L<sup>-1</sup>), além de três trocas gasosas (mixotrofismo). Foi avaliada aos 60 dias oxidação, vigor, comprimento de brotos, número médio de brotações por explante, pigmentos fotossintéticos e anatomia foliar. No enraizamento foi realizado um pré-tratamento, utilizando meio de cultura suplementado com 5 mg L<sup>-1</sup> de AIB, após três dias de inoculação as brotações foram transferidas para um novo tratamento. Esse novo tratamento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (3×2×2), testando três tempos de exposição ao AIB (0, 24 e 48 horas), luminosidade (presença e ausência de luminosidade) e duas concentrações de carvão ativado (ausência e 100 mg L<sup>-1</sup>). Vinte brotações foram utilizadas por repetição. Transcorridos 45 dias de indução do enraizamento foram avaliados a porcentagem de sobrevivência e enraizamento, além do vigor, oxidação e anatomia da raiz. A multiplicação *in vitro* de gemas axilares foi melhor quando se utilizou concentração reduzida de cloro ativo [0,001% (v/v)] combinada com 0,50 mg L<sup>-1</sup> de BAP e/ou 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA. O alongamento das brotações depende de ausência de cloro ativo, e suplementação do meio de cultura com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP, e três membranas porosas. O enraizamento *in vitro* apresentou baixo percentual (±5,08%), sendo recomendada a ausência de luminosidade e carvão ativado. As raízes formadas foram vigorosas e apresentaram conexão com o câmbio vascular.

**Palavras - chaves:** Propagação vegetativa; Cultivo *in vitro*; Trocas gasosas.



## ABSTRACT

The *Corymbia* genus stands out for having species resistant to abiotic and biotic stresses, and high density of wood, ideal for sawmills, sleepers, posts, posts, heavy constructions, firewood and coal. Due to the expansion of plantations to unconventional areas and the quest to improve the final raw material, hybrid combinations have expanded. However, most of these species have difficulty in adventitious rooting by cuttings and/or mini-cuttings, mainly in the case of adult vegetative material. In this sense, the purpose of this proposal is to improve the procedures for tissue culture of *Corymbia maculata*, by rescuing adult matrices and by defining a micropropagation protocol, with potential for application in breeding programs. For the multiplication of axillary buds, nodal segments from the *in vitro* establishment of two adult matrices were used, where concentrations of active chlorine [0.000%; 0.001%; 0.003% and 0.005% (v/v)] and two concentrations of BAP (0.5 mg L<sup>-1</sup> and 1.0 mg L<sup>-1</sup>). The number of buds emitted, chlorosis, oxidation and fungal contamination were evaluated at the end of each subculture. For Elongation phase, concentrations of active chlorine [0.000%; 0.001%; 0.003% and 0.005% (v/v)] and two concentrations of NAA (0.5 mg L<sup>-1</sup> and 1.0 mg L<sup>-1</sup>), in addition to three gas exchanges (mixotrophism). At 60 days, oxidation, vigor, shoots length, average number of shoots per explant; photosynthetic pigments and leaf anatomy were evaluated. In rooting, a pretreatment was performed, using culture medium supplemented with 5 mg L<sup>-1</sup> of IBA, after three days of inoculation, the shoots were transferred to a new treatment. This new treatment was conducted in a completely randomized design, in a factorial arrangement (3×2×2), testing three times of exposure to IBA (0, 24 and 48 hours), luminosity (presence and absence of light) and two concentrations of charcoal activated (absence and 100 mg L<sup>-1</sup>). Twenty shoots were used by repetition. After 45 days of adventitious rooting induction, the percentage of survival and rooting were evaluated, in addition to the vigor, oxidation and root anatomy. The *in vitro* multiplication of axillary buds was better when using a reduced concentration of active chlorine [0.001% (v/v)] combined with 0.50 mg L<sup>-1</sup> of BAP and / or 0.05 mg L<sup>-1</sup> of NAA. Elongated shoots depend on the absence of active chlorine, and supplementation of the culture medium with 0.5 mg L<sup>-1</sup> of NAA and 0.05 mg L<sup>-1</sup> of BAP, and three porous membranes. *In vitro* rooting showed a low percentage (±5.08%), with the absence of luminosity and activated carbon being recommended. The roots formed were vigorous and showed a connection with the vascular cambium.

**Keywords:** Vegetative propagation; *In vitro* cultivation; Gas exchange.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Distribuição natural de <i>Corymbia maculata</i> na Austrália.....	16
<b>Figura 2.</b> Obtenção de explantes para a introdução <i>in vitro</i> de <i>Corymbia maculata</i> ..	24
<b>Figura 3.</b> Avaliações de vigor e oxidação de acordo com escala de notas.....	25
<b>Figura 4.</b> Avaliações de vigor e oxidação de acordo com escala de notas.....	27
<b>Figura 5.</b> Introdução <i>in vitro</i> de brotações epicórmicas provenientes do resgate de matrizes adultas de <i>Corymbia maculata</i> .....	29
<b>Figura 6.</b> Brotações de <i>Corymbia maculata</i> nas fases de multiplicação e alongamento <i>in vitro</i> .....	31
<b>Figura 7.</b> Características observadas na multiplicação <i>in vitro</i> da espécie <i>Corymbia maculata</i> em função das diferentes concentrações de regulador de crescimento (0,5 e 1,00 mg L <sup>-1</sup> ), cloro ativo [0,000%; 0,001%; 0,003% e 0,005% (v/v)] avaliados por 90 dias..	32
<b>Figura 8.</b> Digestão estomática das folhas de explantes de <i>Corymbia maculata</i> cultivados <i>in vitro</i> .....	34
<b>Figura 9.</b> Características observadas no alongamento <i>in vitro</i> da espécie <i>Corymbia maculata</i> em função das diferentes concentrações de regulador de crescimento ANA (0,5 e 1,00 mg L <sup>-1</sup> ), cloro ativo [0,000%; 0,001%; 0,003% e 0,005% (v/v)] e tampas de polipropileno.....	35
<b>Figura 10.</b> Fases e procedimentos para o enraizamento das microestacas da espécie <i>Corymbia maculata</i> .....	40
<b>Figura 11.</b> Características observadas no enraizamento <i>in vitro</i> de <i>Corymbia maculata</i> .....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Procedências e localização das matrizes de <i>Corymbia maculata</i> selecionadas no teste de espécies e procedências da espécie utilizada. ....	23
<b>Tabela 2.</b> Resumo da análise de variância do número de gemas, clorose e oxidação de <i>Corymbia maculata</i> cultivado <i>in vitro</i> em relação às concentrações de cloro, regulador de crescimento e tempo. ....	60
<b>Tabela 3.</b> Valores médios do número de gemas por explante de <i>Corymbia maculata</i> em relação às concentrações de cloro e regulador de crescimento, aos 30, 60 e 90 dias. ....	61
<b>Tabela 4.</b> Valores médios de clorose nos explantes de <i>Corymbia maculata</i> em relação às concentrações de cloro e regulador de crescimento, aos 30, 60 e 90 dias. ....	61
<b>Tabela 5.</b> Valores médios de oxidação nos explantes de <i>Corymbia maculata</i> em relação às concentrações de cloro e regulador de crescimento, aos 30, 60 e 90 dias. ....	61
<b>Tabela 6.</b> Resumo da análise de variância do número e comprimento dos brotos (>0,5 cm) de <i>Corymbia maculata</i> cultivado <i>in vitro</i> em relação ao uso de membranas, concentrações de cloro e regulador de crescimento. ....	62
<b>Tabela 7.</b> Valores médios de número de brotos por explante de <i>Corymbia maculata</i> em relação ao uso de membranas porosas, concentrações de cloro e regulador de crescimento. ....	63
<b>Tabela 8.</b> Valores médios de comprimento de brotos (>0,5 cm) por explante de <i>Corymbia maculata</i> em relação ao uso de membranas porosas, concentrações de cloro e regulador de crescimento. ....	63
<b>Tabela 9.</b> Valores médios da densidade de estômatos por milímetros quadrados de <i>Corymbia maculata</i> em relação ao uso de membranas porosas, concentrações de cloro e regulador de crescimento. ....	63
<b>Tabela 10.</b> Valores médios de oxidação e vigor do explante de <i>Corymbia maculata</i> em relação às escalas de notas adotadas. ....	64
<b>Tabela 11.</b> Resumo da análise de variância do conteúdo de pigmentos de <i>Corymbia maculata</i> cultivada <i>in vitro</i> em relação ao uso de membranas, concentrações de cloro e regulador de crescimento. ....	65
<b>Tabela 12.</b> Valores médios de clorofila b (mg mg <sup>-1</sup> ) de <i>Corymbia maculata</i> em relação ao uso de membranas porosas, concentrações de cloro e regulador de crescimento. ....	66
<b>Tabela 13.</b> Valores das médias de pigmentos totais (mg mg <sup>-1</sup> ) de <i>Corymbia maculata</i> em relação ao uso de membranas porosas, concentrações de cloro e regulador de crescimento. ....	66

<b>Tabela 14.</b> Resumo da análise de variância do percentual de enraizamento, número de brotos e comprimento dos brotos (>0,5 cm) de <i>Corymbia maculata</i> cultivado <i>in vitro</i> em relação ao tempo de exposição ao regulador, presença de carvão ativado e luminosidade. ....	67
<b>Tabela 15.</b> Valores médios do percentual de enraizamento de <i>Corymbia maculata</i> em relação ao tempo de exposição ao regulador, presença de carvão ativado e luminosidade. ....	68
<b>Tabela 16.</b> Valores médios de comprimento das microestacas (>0,5 cm) por explante de <i>Corymbia maculata</i> em relação ao tempo de exposição ao regulador, presença de carvão ativado e luminosidade. ....	68
<b>Tabela 17.</b> Valores médios de oxidação e vigor do explante de <i>Corymbia maculata</i> em relação às escalas de notas adotadas. ....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

AIB - Ácido indolbutírico
ANA - Ácido naftalenoacético
ANOVA - Análise de variância
BAP - 6-Benzilaminopurina
B5 - Meio de cultura Gamborg et al. (1968)
JADS - Meio de cultura Correia (1995)
MS - Meio de cultura Murashige; Skoog (1962)
WHITE - Meio de cultura White (1963)
WPM - Meio de cultura Lloyd; Mccown (1980)

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1 <i>Corymbia maculata</i> Hill & Johnson .....	15
3.4 Micropropagação .....	18
3.5 Esterilização química do meio de cultura .....	20
3.6 Mixotrofismo no cultivo <i>in vitro</i> .....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Introdução <i>in vitro</i> .....	23
4.2 Multiplicação <i>in vitro</i> .....	24
4.3 Alongamento <i>in vitro</i> .....	25
4.4 Enraizamento <i>in vitro</i> .....	26
4.4.1 Pré-tratamento para a indução do enraizamento.....	26
4.4.2 Tratamento para indução de enraizamento <i>in vitro</i> .....	26
4.4.3 Enraizamento <i>ex vitro</i> .....	27
4.5 Preparo do meio de cultura e condições experimentais .....	28
4.6 Análise de pigmentos fotossintéticos.....	28
4.7 Análises histológicas.....	28
4.8 Análise de dados .....	29
5 RESULTADOS .....	29
5.1 Introdução <i>in vitro</i> .....	29
5.2 Efeitos da esterilização química na multiplicação <i>in vitro</i> .....	30
5.3 Efeitos da esterilização química e mixotrofismo no alongamento <i>in vitro</i> .....	33
5.4 Efeitos da esterilização química e mixotrofismo no enraizamento <i>in vitro</i> .....	39
6 DISCUSSÃO.....	42
Introdução <i>in vitro</i> .....	42
Efeitos da esterilização química na multiplicação <i>in vitro</i> .....	43
Efeitos da esterilização química e mixotrofismo no alongamento <i>in vitro</i> .....	43
Efeitos da esterilização química e mixotrofismo no enraizamento <i>in vitro</i> .....	45
7 CONCLUSÕES .....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48
APÊNDICES .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil vem ocupando destaque no setor florestal há algumas décadas, principalmente pelos progressos alcançados em adaptação fisiológica, produtividade, qualidade da madeira e resistência a doenças (REIS et al., 2014). Contudo, devido à expansão dos plantios para áreas não convencionais e a busca para melhoria da matéria prima final, tem ampliado as combinações híbridas. Assim, espécies pertencentes ao gênero *Corymbia* e alguns de seus híbridos interespecíficos têm sido correntemente mencionadas como de vital importância quanto aos aspectos de qualidade da madeira e adaptação às condições ambientais (RESENDE et al., 2011).

O enraizamento das espécies desse gênero é difícil de ser realizado, em razão do envelhecimento ontogenético, assim como, por apresentar maior densidade de madeira. Contudo, o rejuvenescimento dos propágulos em estágio adulto tem permitido avanços significativos na propagação *in vitro* (TRUEMAN et al., 2018). Dessa forma, a micropropagação utilizando gemas axilares, tem sido uma alternativa para contornar essa adversidade, uma das razões para o estímulo ao uso de clones de híbridos interespecíficos (XAVIER et al., 2013).

O processo de micropropagação depende de vários fatores, o que pode limitar o processo de clonagem, a redução da contaminação do meio de cultura é um dos principais desafios enfrentados nesse processo, por isso, é importante esterilizar o meio, a fim de evitar fontes de contaminação e eliminar possíveis microorganismos (MEDJEMEM et al., 2016). Nesse contexto, aumentaram as pesquisas envolvendo a adequação de protocolos mais eficientes de esterilização, assim como conhecimento do ambiente mais eficiente para o sistema (MEDJEMEM et al., 2016; BIANCHETTI et al., 2017).

Em vista da melhoria dos sistemas convencionais de cultivo *in vitro*, a utilização de membranas permeáveis nos recipientes favorece o crescimento das plantas em sistemas fotomixotróficos ou fotoautotróficos, acarretando em maior funcionalidade das plantas e menor perda durante o processo de transferência *ex vitro* (MARTINS et al., 2019). Vários fatores ambientais podem influenciar a morfogenética *in vitro*, dentre eles pode-se citar a luminosidade, temperatura, agentes oxidantes, reguladores de crescimento, etc (HERINGER et al., 2017).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a esterilização química e o mixotrofismo na micropropagação de *Corymbia maculata* com idade superior a 40 anos, visando o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo *in vitro* da espécie, inclusive um protocolo eficiente para ser aplicado nos programas de melhoramento da espécie.

## 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Resgatar matrizes adultas por meio da indução de brotações epicórmicas;
- Determinar a melhor concentração de BAP e ANA nas fases de multiplicação e alongamento;
- Avaliar a eficiência das membranas *millipore* para as trocas gasosas na fase de alongamento;
- Analisar a eficiência do cloro ativo nas fases de multiplicação e alongamento;
- Avaliar se o uso de carvão ativado e/ou luminosidade favorecem a fase de enraizamento.

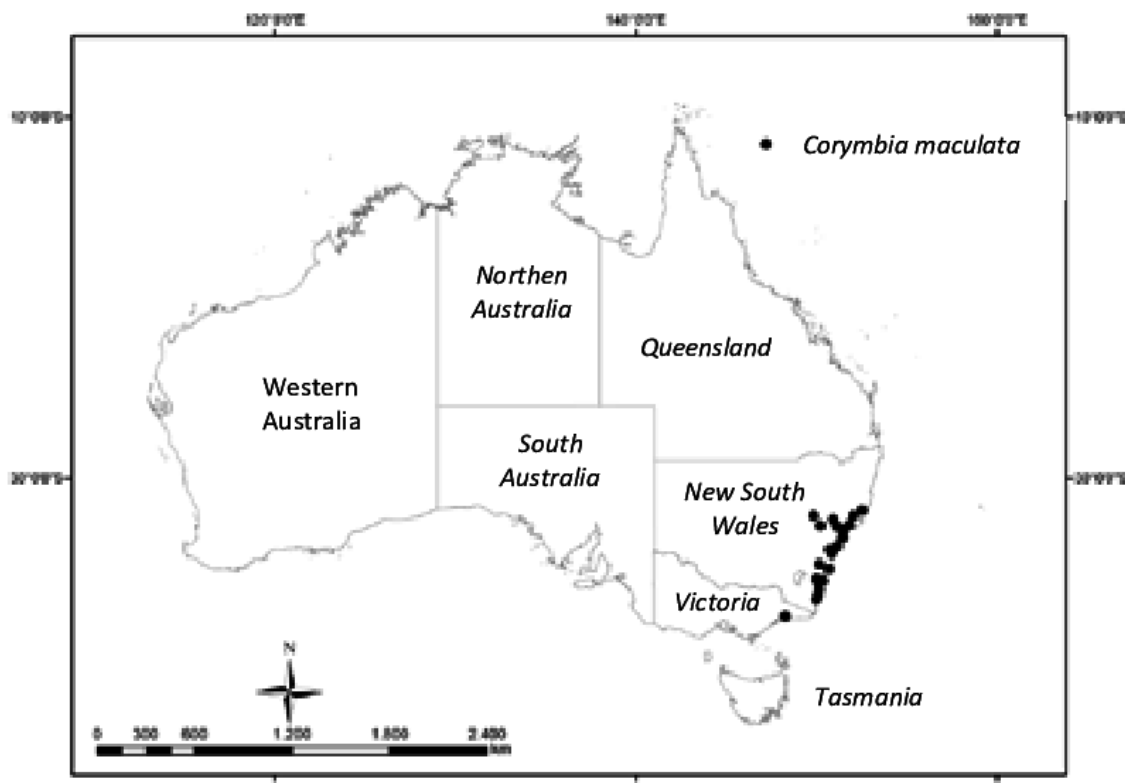
## 3 REFERENCIAL TEÓRICO

### 3.1 *Corymbia maculata* Hill & Johnson

As espécies pertencentes aos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia* são as folhosas mais amplamente distribuídas e plantadas de todo o mundo, suas áreas são de aproximadamente 20 milhões de hectares. (TRUEMAN; HUNG; WENDLING, 2018). Esses gêneros fazem parte da família Myrtaceae, compreendendo mais de 700 espécies nativas da Oceania (CHENG et al., 2009).

*Corymbia maculata* Hill & Johnson é uma árvore ereta, com alturas entre 35 a 45 m e DAP de 1 a 1,3 m. Quando plantada em sítios bons pode atingir 70 m de altura e 3 m de DAP, já em sítios com solos pobres pode ter de 20-35 m de altura e 0,7 a 1,2 m. Ocorre naturalmente em Queensland, Mottl e Range, nordeste de Orbost no leste de Victoria na Austrália (REIS et al., 2014) (Figura 1).

**Figura 1.** Distribuição natural de *Corymbia maculata* na Austrália.



Fonte: REIS et al. (2014).

Essa espécie ocorre naturalmente, em altitudes que variam de 650 metros a 1.600 metros. Com temperaturas médias de 4°C e 6°C, nos meses mais frios, e 22°C e 35°C, nos meses mais quentes. A precipitação pluviométrica média anual está entre 680 mm e 1.700 mm. Pode ocorrer em vários tipos de solos, porém, ocorre preferencialmente em encostas de vales e em cumes, onde os solos não são muito secos. Apresenta baixa tolerância a solos mal drenados e desenvolvimento diferenciado em solos bem drenados e de textura moderadamente pesada, em razão da presença de xisto (REIS et al., 2014).

*Corymbia maculata* é considerada uma espécie invasora em alguns ambientes em sua área de distribuição natural (METRO TREES, 2012). A espécie possui ramagem longa e robusta, com copa arredondada ou aberta. As folhas juvenis são opostas, elíptico ovaladas, ocasionalmente peltadas e verdes - claras. As folhas maduras são alternas, lanceoladas, verde-escuras, brilhantes e coriáceas. Possui nervura principal de cor amarelada e bem saliente, com 10 cm a 15 cm de comprimento e pecíolo de 1,5 cm a 2,0 cm (REIS et al., 2014).

De acordo com Lorenzi et al. (2003), as inflorescências estão dispostas em panículas em formato de umbela, sendo grandes, terminais e axilares. Os botões são ovoides, grandes, pedunculados, com ponta aguda e produzem flores grandes com



estames brancos. Os frutos são do tipo cápsula, cilíndrico - ovoides, deiscentes, com valvas afundadas/inclusas. Normalmente, os frutos não apresentam rugosidades. As sementes são pequenas, com coloração vermelho - escura (REIS et al., 2014).

A madeira de *C. maculata* apresenta alburno de coloração clara e cerne que varia de castanho-claro a castanho-escuro, devido à presença de veias de resina denominadas de “kino”. Em geral, possui durabilidade natural que varia de durável a moderadamente durável e boa resistência mecânica. As estimativas de densidade básica podem chegar a 0,745 g cm<sup>-3</sup> e 1,080 g cm<sup>-3</sup> a depender da idade (BOLAND et al., 2006).

Em geral, a madeira tem sido utilizada em cabos de ferramentas de alto impacto, construção civil, engenharia pesada, esquadrias, estacas, lenha, mourões, móveis, painéis de compensados, pisos, postes, produção de carvão vegetal e serraria (GOLFARI et al., 1978; FERREIRA, 1979; LORENZI et al., 2003; ROB, 2004; BOLAND et al., 2006; MCMAHON et al., 2010).

A espécie *C. maculata* possui adaptação a várias condições ambientais brasileiras e qualidade da madeira com aptidão para usos múltiplos, porém, se encontra em fase inicial de melhoramento genético no Brasil (REIS et al., 2014). Porém, as matrizes selecionadas geralmente se encontram na fase adulta, uma das grandes dificuldades em se propagar esses materiais, o que pode dificultar os cruzamentos interespecíficos.

### **3.2 Rejuvenescimento/ revigoramento de matrizes adultas *in vitro***

Um dos objetivos da clonagem é propagar material genético superior, mas geralmente no setor florestal essa fonte de propágulo se encontra na fase adulta, onde a propagação vegetativa desse material pode ser limitante, dado a maturidade dos tecidos da planta, denominada idade ontogenética. (BACCARIN et al., 2015; WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014a).

A idade ontogenética pode ser revertida por métodos que atrasam a maturação do material ou induzem a juvenilidade (WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014b).

Os principais métodos utilizados para o resgate de indivíduos adultos são: anelamento (BACCARIN et al., 2015), decepa (BACCARIN et al., 2015; TRUEMAN; MCMAHON; BRISTOW, 2013), brotações epicórmicas (BACCARIN et al., 2015; WENDLING et al., 2013), miniestaquia (BACCARIN et al., 2015; BRONDANI et al., 2010) e micropropagação (BACCARIN et al., 2015; BRONDANI et al., 2012). Levando em conta o gradiente de juvenilidade existente dentro da planta, a decepa é a técnica mais usual para o resgate de material adulto visando à clonagem (BACCARIN et al., 2015; WENDLING et al., 2013).

As espécies lenhosas geralmente possuem um gradiente de juvenilidade, onde a maturação é maior nos meristemas apicais, assim a região próxima à base apresenta menor idade ontogenética e algumas de suas características juvenis são mantidas. As brotações quando extraídas próximas à base da árvore possuem maior capacidade de enraizamento adventício e vigor radicular, por isso se recomenda o resgate de matrizes adultas pelo uso de brotações coletadas próximas a base (WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014b).

Dessa forma, a escolha de brotações constitui uma das etapas fundamentais para o resgate de matrizes em estágio adulto, em que a utilização de explantes com características juvenis garantem o sucesso da micropropagação, e essas brotações são a principal fonte de explante utilizado para experimentos de propagação *in vitro* (OLIVEIRA, 2014).

A maturação de materiais genéticos adultos é resultado de um processo contínuo de alterações na taxa de crescimento, frequência de desenvolvimento reprodutivo, além de mudanças morfológicas, por estarem localizadas em regiões de meristema, a maturação pode ter diferentes níveis, o que dificulta ainda mais o resgate de matrizes em estágio adulto (WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014b).

O rejuvenescimento é definido como o retorno da maturação no decorrer da reprodução sexual e formação de embriões, também pode ser revertido como métodos culturais, como poda, enxertos e principalmente por meio da técnica de micropropagação (WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014a, 2014b).

O rejuvenescimento trata-se de uma tentativa de redução da idade ontogenética, que pode ser alcançado por meio de vários subcultivos *in vitro* de brotações extraídas próximas a base, utilizando meios de cultura ricos em citocininas, que iram estimular as divisões e multiplicação celulares (TITON et al., 2003; WENDLING; TRUEMAN; XAVIER, 2014a).

As brotações epicórmicas extraídas de gemas é um método de rejuvenescimento de árvores adultas que mantém características juvenis. As gemas são formadas durante as fases de crescimento da planta (WENDLING et al., 2013), sendo uma excelente fonte de explantes para experimentos *in vitro*.

### **3.4 Micropropagação**

Um dos grandes desafios da silvicultura clonal é desenvolver métodos eficientes de propagação para espécies que naturalmente possuem dificuldade de enraizamento de

propágulos (TRUEMAN; HUNG; WENDLING, 2018). Dentre as diferentes técnicas aplicadas ao cultivo *in vitro*, a micropropagação é a mais utilizada pela rápida geração de plantas e com aplicações comprovadas (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

A micropropagação é uma técnica da cultura de tecidos que busca reproduzir plantas idênticas à planta mãe, também conhecidas como propagação vegetativa *in vitro* (CARVALHO et al., 2011). As fases da micropropagação incluem desde a seleção do explante que possibilita uma cultura livre de contaminantes, até a multiplicação de propágulos vegetativos, considerando todas as etapas do cultivo, como o enraizamento, alongamento e aclimatização das mudas obtidas (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

As fases são: Fase I - seleção de explantes, desinfestação e estabelecimento da cultura em condições *in vitro*; Fase II - multiplicação dos propágulos através de sucessivas subculturas em meio de cultura adequada à propagação; Fase III- enraizamento e alongamento dos propágulos vegetativos obtidos no estágio anterior e Fase IV - aclimatização das plantas obtidas na condição *in vitro* para a condição *ex vitro* (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2013).

Os estudos relacionados à micropropagação com espécies do gênero *Eucalyptus* são remetidos principalmente às espécies mais plantadas comercialmente. Para as demais são feitas simulações empíricas de protocolos, uma vez que não se tem definições das dosagens ideais de reguladores de crescimento por exemplo. A multiplicação de brotos *in vitro* de eucaliptos tem sido geralmente realizada em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementados com aditivos orgânicos, outros meios de proliferação são WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), JADS (CORREIA, 1995), White (WHITE, 1963) e B5 (GAMBORG et al., 1968).

A morfogenética *in vitro* é fortemente influenciada pelos reguladores de crescimento ou substâncias reguladoras de crescimento vegetal, compostos sintéticos incluídos no meio de cultura, que em quantidade pequena pode estimular, inibir ou modificar o crescimento e desenvolvimento do explante *in vitro*. Reguladores de crescimento são adicionados ao meio com a função de induzir resposta fisiológica de acordo com o objetivo proposto, sendo bastante utilizados nos protocolos de micropropagação de diferentes espécies (CARVALHO et al., 2011).

Para as espécies de eucalipto o crescimento desses brotos é promovido por citocininas com concentrações entre 0,44 - 6,66 mg L<sup>-1</sup> de BA, ocasionalmente, 0,23 - 9,29 mg L<sup>-1</sup> de cinetina que são adicionadas aos meios de multiplicação (TRUEMAN;

HUNG; WENDLING, 2018). Às vezes, as citocininas são suplementadas com auxinas, geralmente 0,05 a 5,4 mg L<sup>-1</sup> de ANA (TRUEMAN; HUNG; WENDLING, 2018).

O rejuvenescimento de *Eucalyptus* através da micropropagação é capaz de manter a estabilidade do material, evitando a desdiferenciação e rediferenciação de células (NEGI; SAXENA, 2010). Entretanto, conforme a cultura vai sendo multiplicada e subcultivada *in vitro*, pode ser que ocorra variações somaclomais, principalmente se a proliferação de brotos passarem por alguma fase intermediária de calo.

### 3.5 Esterilização química do meio de cultura

A diminuição da contaminação dos meios de cultura é um dos principais desafios enfrentados no processo de propagação de plantas, por isso, é de suma importância esterilizar o meio, a fim de evitar fontes de contaminação e eliminar possíveis microorganismos (MEDJEMEM et al., 2016). O processo de esterilização envolve o uso de procedimentos físicos e químicos, como autoclave, irradiação UV, micro-ondas e técnicas químicas (WANG et al., 2011).

O método mais usado é a esterilização a vapor (autoclavagem), devido ao baixo custo e facilidade de manuseio dentro do laboratório (ZHANG et al., 2006). No entanto, ao utilizar esse procedimento, algumas reações podem ocorrer e decompor certos componentes do meio, como por exemplo, proteínas, vitaminas e carboidratos, o que pode acarretar em mudanças no meio de cultura, e dessa forma comprometer o desenvolvimento das plantas. Assim, o uso de matérias-primas como hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, etanol, cloreto de mercúrio, água de bromo, nitrato de prata e antibióticos, estão se tornando de grande interesse principalmente devido ao menor preço desses materiais (MEDJEMEM et al., 2016).

A esterilização química utilizando hipoclorito de sódio (NaOCl) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) já foi testada para eliminar contaminantes do meio de cultura, porém não obteve aplicação comercial, principalmente por dificuldade de uso prático (CARDOSO et al., 2012). Outros agentes também já possuem atividade comprovada, como o dióxido de cloro líquido (Cl<sub>2</sub>), um potente agente antibacteriano, fungicida e viricida (SREBERNICH, 2007), etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), cloreto de mercúrio, água de bromo, nitrato de prata e antibióticos (TIWARI et al., 2012).

Hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio tem sido sugerido para esterilização de meio de cultura na micropropagação de orquídeas e abacaxi (YANAGAWA et al., 1995; TEIXEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2006). Sawant e Tawar (2011) utilizaram

hipoclorito de sódio como esterilizante de meio durante micropropagação de cana-de-açúcar. Brondani et al. (2013) no estabelecimento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* obteve sucesso com concentrações de 0,001% e 0,003% de cloro ativo sem autoclavagem. Os resultados indicaram que a esterilização química por meio do uso de 0,001% e 0,005% de cloro ativo auxiliou no controle da proliferação de bactérias e fungos no meio de cultura e não afetou o desenvolvimento dos explantes de *Cochlospermum regium* (GAVILAN et al., 2018). Furlan et al. (2018) em cultivo de *Bambusa vulgaris* utilizando cloro ativo suplementado ao meio de cultura obteve uma redução na contaminação por fungos e bactérias nos explantes, além de aumento da sobrevivência e desenvolvimento das brotações dos explantes.

No entanto, esses agentes não têm sido utilizados na prática, pois tanto o agente esterilizante quanto a concentração deste adicionada ao meio nutritivo podem causar problemas de fitotoxicidade nas plantas, devido ao escurecimento dos tecidos e inibição do crescimento em condições *in vitro* (MBAH; WAKIL, 2012; RIBEIRO; TEIXEIRA; BASTOS et al., 2011).

Como o NaOCl possui uma forte propriedade oxidante que o torna altamente reativado com aminoácidos, ácidos nucleicos, amins e amidas, é altamente eficaz contra todos os tipos de bactérias, fungos e vírus. A reação geral entre aminoácidos e NaOCl produz o respectivo aldeído,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{CO}_2$ . Assim, durante o processo de esterilização, o contato direto do tecido com NaOCl, dependendo de sua concentração, período de aplicação e temperatura, pode ter um efeito perigoso sobre o tecido (YILDIZ et al., 2012).

### **3.6 Mixotrofismo no cultivo *in vitro***

As plantas ao serem submetidas às condições de cultivo *in vitro* podem desenvolver distúrbios fisiológicos e anatômicos (MARTINS et al., 2019). Os métodos convencionais de propagação *in vitro*, consistem de recipientes selados, que retém alta umidade relativa, trocas gasosas reduzidas, baixa densidade de fluxo de fóton ativado, flutuação elevada de  $\text{CO}_2$ , alto teor de açúcar, sal e hormônios vegetais no meio de cultura (RODRIGUES et al., 2014).

Uma das maiores dificuldades da cultura de tecidos vegetais está relacionada à capacidade de sobrevivência das plantas micropropagadas em ambiente externo (ALFONSO et al., 2017). O uso de recipientes que permitem as trocas gasosas pode reduzir a exigência de concentrações altas de fontes de carboidrato, como, por exemplo, a sacarose, uma vez que, estas permitem uma substituição contínua de  $\text{CO}_2$  no ambiente

de cultivo, além de reduzir o acúmulo de etileno dentro dos recipientes (MARTINS et al., 2019).

Recipientes com membranas ou filtros possuem a capacidade de induzir culturas fotomixotróficas, os tipos de fechamento de recipientes que garantem melhor ventilação atuam positivamente na qualidade das plântulas *in vitro* (ZAHARA; DATTA; BOONKORKEAW, 2016; WU et al., 2018). A utilização de membranas permeáveis favorece as plantas cultivadas *in vitro* a crescer fotomixotroficamente ou fotoautotroficamente, acarretando em maior enraizamento das plantas e menor perda durante o processo de transferência *ex vitro* (MARTINS et al., 2019).

O crescimento fotoautotrófico *in vitro*, para muitas espécies de plantas pode aumentar consideravelmente a concentração de CO<sub>2</sub> e reduzindo a umidade relativa no interior do recipiente (IAREMA et al., 2012). O ambiente *in vitro* é bem diferente do ambiente *ex vitro*, o que pode causar mudanças morfológicas e anatômicas, como funcionamento dos estômatos, desenvolvimento da cera epicuticular, brotos alongados, baixa concentração de clorofila, hiperhidricidade, baixa taxa de crescimento, baixo enraizamento, formação de calos, além do número reduzido de sobrevivência *ex vitro* (XIAO; NIU; KOZAI, 2011).

Segundo Kozai e Kubota (2005) a utilização de sistemas que permitem as trocas gasosas, apresenta algumas vantagens em relação à micropropagação convencional, entre elas pode-se citar: promoção do crescimento e fotossíntese, alta porcentagem de sobrevivência *ex vitro*, eliminação de distúrbios morfológicos e fisiológicos, ausência de formação de calos na base do explante, simplificação do sistema de micropropagação, etc. No entanto, algumas desvantagens também são observadas como, complexidade das técnicas e conhecimentos para o controle *in vitro* do ambiente, limitação da aplicação a sistemas de multiplicação usando múltiplos explantes.

As trocas gasosas influenciam em todo o controle da planta, acarretando em mudanças nas respostas espaciais e temporais. As mudanças ambientais podem modular a frequência na qual os estômatos vão se formar nos novos órgãos. Essa mudança fisiológica pode ser dimensionada através da densidade estomática, os estômatos funcionam como válvulas da epiderme controlando a entrada de CO<sub>2</sub> e saída de água da planta, o que acarreta em diferenças nas taxas fotossintéticas, estado hídrico da planta e eficiência do uso da água (MARTINS, 2010).

Estudos demonstram que o crescimento das plantas é melhorado quando há aumento nas concentrações de CO<sub>2</sub> (BADR; ANGERS; DESJARDINS, 2011; CHA-UM et al., 2011; CHIBA, 2010; KOZAI, TOYOKI, 2011; NORIKANE et al., 2010;

SALDANHA et al., 2012). Contudo, estudos relacionados a espécies florestais ainda são escassos, com um grande potencial para as pesquisas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Introdução *in vitro*

O material utilizado para obtenção dos explantes foi proveniente da seleção de duas matrizes em estágio adulto com cerca de 40 anos de idade, oriundos do teste de espécies e procedências de *Eucalyptus* e *Corymbia* (IPEF, 1984). As progênes são procedentes da Austrália, coletadas na região de W Brisbane, estado de Queensland (Tabela 1).

**Tabela 1.** Procedências e localização das matrizes de *Corymbia maculata* selecionadas no teste de espécies e procedências da espécie utilizada.

Espécie	Matriz	Talhão	Proced	Lat (S)	Long (E)	Alt (m)
<i>C. maculata</i>	M1	B-9(Y)	W Brisbane	27°15'	152°40'	550
<i>C. maculata</i>	M2	B-9(Y)	W Brisbane	27°15'	152°40'	550

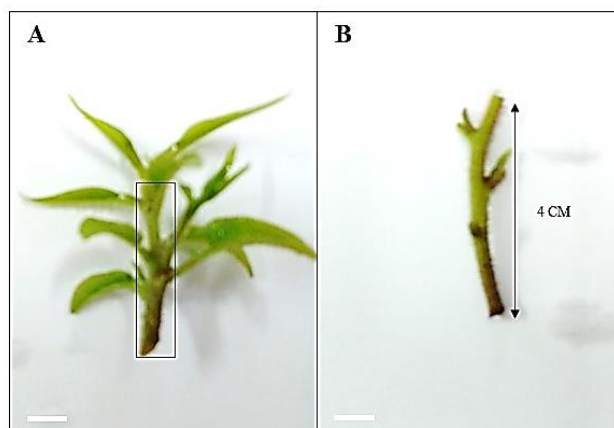
Em que: Proced: procedência; Lat: latitude; Long: longitude; Alt: altitude. Fonte: IPEF (1984).

A população base foi instalada entre 1972-1974 no Viveiro Florestal do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras, localizada no município de Lavras- MG (latitude 21°13'39,40"S, longitude 44°58'10,37"O).

Foram coletadas brotações após 45 dias de permanência dos galhos na casa de vegetação, e foi aplicado fungicida dimethyl 4,4'- (o - phenylene) bis (3 - thioallophanate), na concentração de 0,5 g L<sup>-1</sup>, 48 horas antes da coleta. Brotações epicórmicas de 4 a 5 cm de comprimento foram coletadas, e imersas em água deionizada autoclavada e transportadas para o Laboratório de Cultivo *In Vitro* de Espécies Florestais (DCF / UFLA).

Os segmentos nodais, padronizados com duas gemas axilares, sem folhas, com 3 a 4 cm de comprimento foram utilizados como explantes (Figura 2), os quais foram lavados em água corrente durante 5 minutos.

**Figura 2.** Obtenção de explantes para a introdução *in vitro* de *Corymbia maculata*. **(A)** Brotação epicórmica recém-coletada dos galhos, destacando a porção utilizada dos explantes. **(B)** Segmento nodal após preparo. Barras = 0,5 cm.



Fonte: Do autor (2020).

Posteriormente, foram imersos em solução de álcool a 70% (v/v) por 30 segundos com agitação constante, dentro da câmara de fluxo laminar horizontal. Em seguida, foram imersos em solução de NaOCl (1,00 - 1,25% de cloro ativo) Clarix<sup>®</sup>, durante 10 minutos. Os segmentos nodais foram lavados em água deionizada autoclavada, por três vezes após a imersão em álcool e NaOCl. Os explantes preparados e inoculados verticalmente, sob condições assépticas, em tubos de ensaio de 15 cm × 2,5 cm, contendo 10 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Durante todo o processo, os equipamentos utilizados foram desinfetados com solução de álcool 70% (v/v). O meio de cultura foi suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Synth Ltda) e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck S.A.).

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

Aos 30 dias após a inoculação para o estabelecimento *in vitro*, foram avaliadas as características porcentagem média de contaminação e oxidação (avaliadas a partir da visualização de tecidos oxidados e presença de culturas bacterianas no meio de cultura, respectivamente), e o número médio de brotações por explante (> 0,5 cm).

#### 4.2 Multiplicação *in vitro*

O material vegetal estabelecido foi inoculado em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980). O meio de cultura foi suplementado com 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA (Sigma<sup>®</sup>) e 0,5 mg L<sup>-1</sup> e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP



(Sigma®). Adicionou-se ainda ao meio de cultura 20 g L<sup>-1</sup> de glicose (Synth Ltda) e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck S.A.). Em câmara de fluxo laminar, após a autoclavagem do meio de cultura foi realizada a aplicação de concentrações de cloro ativo [0,000%; 0,001%; 0,003% e 0,005% (v/v)] Clarix®).

Cada tratamento foi constituído por dez repetições e organizado em delineamento inteiramente casualizado com parcelas subdivididas no tempo (3 subcultivos, realizados a cada 30 dias), em esquema fatorial (4×2) testando quatro concentrações de cloro ativo e duas concentrações de BAP. Aos 90 dias foram avaliados o percentual de oxidação, vigor e clorose; contaminação fúngica (pela avaliação visual da presença de fungos no meio de cultura e/ou no explante) e número médio de brotações por explante (> 0,5 cm).

### 4.3 Alongamento *in vitro*

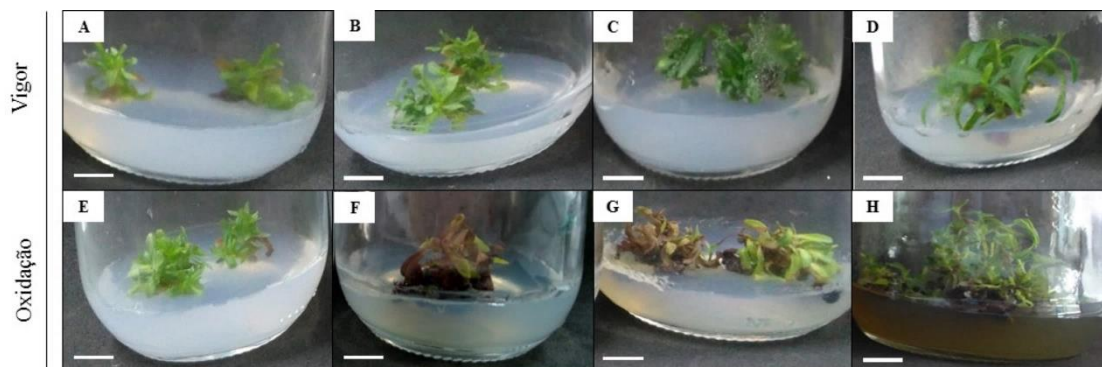
Brotações oriundas da fase de multiplicação *in vitro* foram inoculadas em frascos de vidro transparente com três formas de vedação (tampas rígidas de polipropileno sem membrana, tampas de polipropileno com um orifício (1,0 cm de diâmetro) coberto com membrana de 1,0 cm<sup>2</sup>, tampas de polipropileno com três orifícios (1,0 cm de diâmetro cada) cobertos com membrana de 1,0 cm<sup>2</sup> (SALDANHA, 2012), contendo 40 mL de meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA (Sigma®) e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Sigma®). Adicionou-se ainda ao meio de cultura 20 g L<sup>-1</sup> de glicose (Synth Ltda) e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck S.A.). Em câmara de fluxo laminar, após a autoclavagem do meio de cultura foi realizada a aplicação de concentrações de cloro ativo [0,000%; 0,001%; 0,003% e 0,005% (v/v), Clarix®].

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3×4×2), testando três formas de vedação, quatro concentrações de cloro ativo e duas concentrações de ANA. Foram utilizadas oito repetições com um explante.

Após a inoculação na fase de alongamento *in vitro*, foram avaliadas aos 60 dias: oxidação e vigor (escala de notas de acordo com Oliveira et al., 2016), comprimento de brotos (> 0,5 cm), número médio de brotações por explante (> 0,5 cm), pigmentos fotossintéticos e densidade estomática (Figura 3A-H).

**Figura 3.** Avaliações de vigor e oxidação de acordo com escala de notas. **(A)** Vigor das brotações 0-25% = poucas brotações. **(B)** Vigor das brotações 25-50% = indução de brotações, porém reduzida. **(C)** Vigor das brotações 50-75% = indução de brotações com crescimento ativado. **(D)** Vigor das brotações 75-100% = indução de brotações com crescimento ativado, sem deficiência nutricional. **(E)** Oxidação das brotações 0-25% =

Nula: sem oxidação. (F) Oxidação das brotações 25-50% = Regular: reduzida oxidação na base dos explantes, meio de cultura com tom acinzentado. (G) Oxidação das brotações 50-75% = Média: oxidação na base dos explantes, em tom enegrecido. (H) Oxidação das brotações 75-100% = Alta: oxidação completa, meio de cultura com tom marrom escuro. Barras = 1 cm.



Fonte: Do autor (2020).

#### 4.4 Enraizamento *in vitro*

##### 4.4.1 Pré-tratamento para a indução do enraizamento

Para o enraizamento *in vitro* foram utilizadas brotações obtidas na fase de alongamento, as quais foram transferidas para frascos de vidro transparentes contendo 40 mL do meio de cultura. O meio de cultura foi preparado com água deionizada, adicionando-se 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck S.A.) e 5 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Sigma®) (BRONDANI et al., 2010), e então autoclavado a temperatura de 127°C (≈ 1,5 kgf cm<sup>-2</sup> por 20 minutos). Após três dias de inoculação as brotações foram transferidas para um novo meio de cultura.

##### 4.4.2 Tratamento para indução de enraizamento *in vitro*

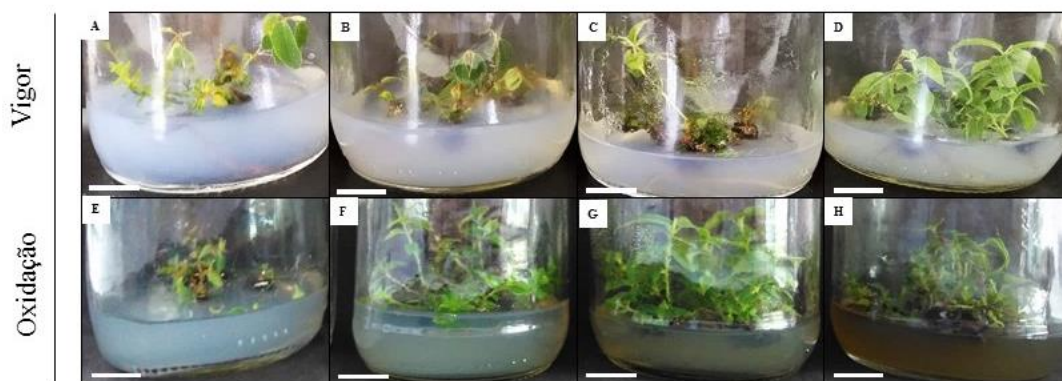
Decorridos três dias de pré-tratamento, as brotações foram inoculadas em frascos de vidro transparentes contendo 40 mL do meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), suplementado com 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Sigma®), 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ANA (Sigma®), 0,2 mg L<sup>-1</sup> de AIB (Sigma®) (BRONDANI et al., 2010), acrescidos de duas concentrações de carvão ativado (0,0 e 100 mg L<sup>-1</sup>), 20 g L<sup>-1</sup> de glicose (Synth Ltda) e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck S.A.).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial (3×2×2), testando três tempos de exposição ao AIB, duas luminosidades

(presença de luminosidade / ausência de luminosidade) e duas concentrações de carvão ativado. Sendo utilizadas vinte brotações por repetição.

Transcorridos aproximadamente 45 dias de indução de enraizamento foram avaliados a porcentagem de sobrevivência e enraizamento, vigor e oxidação (escala de notas de acordo com Oliveira et al., 2016), e anatomia da raiz.

**Figura 4.** Avaliações de vigor e oxidação de acordo com escala de notas. **(A)** Vigor das brotações 0-25% = poucas brotações. **(B)** Vigor das brotações 25-50% = indução de brotações, porém reduzida. **(C)** Vigor das brotações 50-75% = indução de brotações com crescimento ativado. **(D)** Vigor das brotações 75-100% = indução de brotações com crescimento ativado, sem deficiência nutricional. **(E)** Oxidação das brotações 0-25% = Nula: sem oxidação. **(F)** Oxidação das brotações 25-50% = Regular: reduzida oxidação na base dos explantes, meio de cultura com tom acinzentado. **(G)** Oxidação das brotações 50-75% = Média: oxidação na base dos explantes, em tom enegrecido. **(H)** Oxidação das brotações 75-100% = Alta: oxidação completa, meio de cultura com tom marrom escuro. Barras = 1 cm.



Fonte: Do autor (2020).

#### 4.4.3 Enraizamento *ex vitro*

Foi testada uma estrutura adaptada ao frasco de vidro, com microtubetes de plástico<sup>1</sup>, impressos em impressora 3D e vedação com plástico film<sup>®</sup>, abertas aos poucos para permitir maiores trocas gasosas e adaptação da espécie a outro ambiente. O substrato utilizado foi areia, umedecido a cada três dias com água destilada e autoclavada.

<sup>1</sup> Patente depositada com processo INPI: BR 2020200055130

#### 4.5 Preparo do meio de cultura e condições experimentais

O meio de cultura foi preparado utilizando água deionizada e o pH ajustado para  $5,8 \pm 0,05$  com NaOH (0,1 M) e HCl (0,1 M), antes da autoclavagem e da adição do ágar. A autoclavagem do meio de cultura foi realizada à temperatura de  $127^{\circ}\text{C}$  ( $\approx 1,5 \text{ kgf cm}^{-2}$  por 20 minutos).

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por um fotoperíodo de 16 h de luminosidade e irradiância de  $40 \mu \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (quantificada por radiômetro, LI - COR<sup>®</sup>, LI-250A Light Meter). Os subcultivos foram realizados a cada 30 dias para renovar a concentração nutritiva do meio de cultura, visando manter o vigor dos tecidos em formação.

#### 4.6 Análise de pigmentos fotossintéticos

Ao final do tempo de cultivo no alongamento in vitro (30 dias) sob as diferentes formas de vedação, foram retirados discos foliares (25 mg de matéria fresca de folhas), e inoculados em 5 mL de solução de DMSO (Sigma Aldrich) por 48 horas na ausência de luminosidade (LICHTENTHALER, 1987). A absorvância das amostras foi determinada por triplicata em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico, em espectrofotômetro Genesys 10 UV (Thermo Scientific, EUA). Os comprimentos de ondas (665, 649 e 480 nm) e as equações para o cálculo das concentrações de clorofilas a, b, carotenóides e pigmentos totais foram baseados no método descrito por Wellburn (1994).

#### 4.7 Análises histológicas

O ensaio de densidade estomática foi realizado através da digestão da epiderme, folhas foram clarificadas em solução comercial de hipoclorito de sódio a 50%, neutralizadas em água, lavadas em água destilada e coradas com safranina. Em seguida, as lâminas foram montadas em glicerina aquosa a 50% (STRASBURGER, 1924), selando-se as bordas da lamínula com esmalte.

As imagens foram obtidas por meio de câmera digital (Canon A - 630) acoplada a um microscópio de luz (Olympus CBB) com lente objetiva de 40x, com posterior observação dos caracteres anatômicos. De cada planta foram amostrados três pontos, as imagens obtidas possuem dimensões de  $0,755 \times 0,576$ , área de  $0,43488 \text{ mm}^2$  por imagem. Para obtenção de dados da densidade estomática (DE), foi feita a contagem do número de estômatos na unidade amostral com auxílio do software Image J. Os dados, registrado sem planilha eletrônica, foram aplicados à fórmula  $DE = \text{número de estômatos} / \text{área mm}^2$ .

A realização dos cortes histológicos das raízes foi realizada aos 45 dias, onde estas foram mantidas por 48 horas em solução de formaldeído ácido acético a 70% e após esse período o material foi transferido para etanol à 70% (JOHANSEN, 1940). Realizou-se a desidratação do material vegetal em série alcoólica - etílica em concentrações crescentes (80, 90 e 100%) por 24 horas em cada solução (JOHANSEN, 1940) e, por fim, armazenou-os em solução de álcool à 100% e historresina (Leica®) na proporção 1:1, durante uma semana. O emblocamento foi com resina pura de hidroxietil metacrilato e os cortes transversais obtidos com o micrótomo rotativo manual e navalha, com espessura de 10 µm. Após foram contrastados com azul de toluidina, montados em lâminas histológicas com finalizador verniz vitral (PAIVA et al., 2006) e fotomicrografados com câmera digital acoplada (Axion Cam ERc5s) em escala micrométrica e objetiva de 20x e 40x.

#### 4.8 Análise de dados

As análises foram processadas em software R, versão 3.0.3 R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019) para os testes de normalidade de Shapiro - Wilk ( $p > 0,05$ ) e homogeneidade de variância pelo teste de Bartlett ( $p > 0,05$ ), sendo posteriormente transformados por Box-Cox. As análises de variância (ANOVA,  $p < 0,05$ ) e comparação das médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foram realizadas no programa SOC (EMBRAPA, 1990) e R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2019).

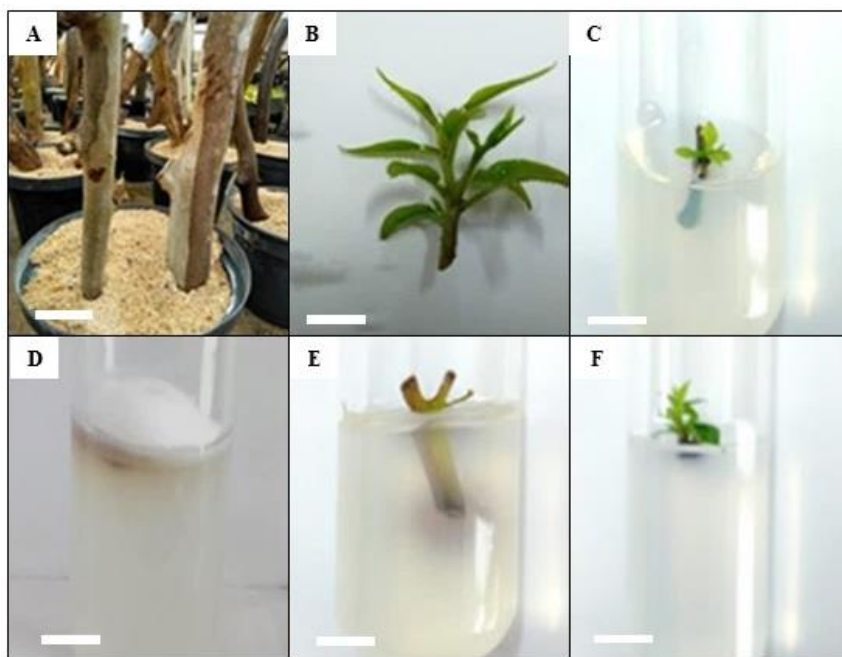
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Introdução *in vitro*

O protocolo de desinfestação utilizado nos explantes mostrou-se adequado para a introdução *in vitro* das brotações epicórmicas de matrizes adultas de *Corymbia maculata* (Figura 5A-F).

**Figura 5.** Introdução *in vitro* de brotações epicórmicas provenientes do resgate de matrizes adultas de *Corymbia maculata*. (A) Gemas epicórmicas induzidas em estacas da árvore matriz de *C. maculata*. (B) Segmento nodal contendo duas gemas axilares, utilizado para introdução *in vitro*. (C) Brotação recém-inoculada em meio de cultura MS sem reguladores de crescimento. (D) Contaminação fúngica do explante. (E) Oxidação na base dos explantes, evidenciado através do escurecimento do meio de cultura. (F)

Explante contendo múltiplas gemas axilares em meio de cultura MS sem adição de reguladores de crescimento 30 dias após a introdução *in vitro*. Barras = 1cm.



Fonte: Do autor (2020).

A contaminação fúngica e bacteriana não representaram uma barreira ao estabelecimento *in vitro* dos explantes de *C. maculata*. Os percentuais de contaminação fúngica ficaram próximos de 60% nas introduções, fato que pode ser esperado por se tratar de material proveniente do campo. Em relação à oxidação fenólica dos explantes, observou-se que a média foi de 20%.

Para porcentagem de estabelecimento *in vitro*, a média foi de 15% do total inoculado (40 tubos) e comprimento (>0,5 cm) foi de 1,8 por explante. As brotações epicórmicas utilizadas foram coletadas na primavera, essa fonte de explantes permite a utilização das melhores matrizes selecionadas no campo, porém essa fonte de explante geralmente se encontra na fase adulta, onde os tecidos da árvore já apresentam certa maturação, além de que a descontaminação envolve uma superfície coberta de pelos o que pode dificultar ainda mais o processo.

## 5.2 Efeitos da esterilização química na multiplicação *in vitro*

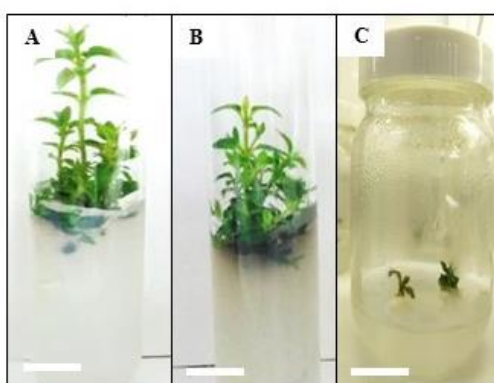
A assepsia aplicada na fase de introdução *in vitro* foi adequada, apresentando quantidade suficiente de explantes estabelecidos e com emissão normal de brotações axilares para serem utilizadas nas fases subsequentes (Figura 6A-C). Para a multiplicação de gemas axilares, a análise de variância ( $p < 0,05$ ) revelou interação entre os fatores

adição de cloro, concentrações de BAP avaliados por um período de 90 dias (APÊNDICE A).

A espécie *C. maculata* quando cultivada em meio de cultura WPM apresentou em média 3,19 gemas por explante (APÊNDICE B). Independente da adição de cloro ao meio de cultura, as gemas axilares tiveram aumento progressivo, concentrações menores de cloro [0,001% e 0,003% (v/v)] e com 0,50 mg L<sup>-1</sup> de BAP proporcionaram os melhores resultados quanto à proliferação de gemas (APÊNDICE B).

Em termos de análise visual, observou-se clorose das folhas dos explantes quando cultivados no meio WPM com concentrações de 0,003 e 0,005% de cloro ativo. Combinações de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA, corresponderam às maiores médias de clorose aos 30 dias de cultivo *in vitro*, não sendo recomendado o seu uso para a fase de multiplicação de materiais. Além disso, foi observada a multiplicação de gemas axilares e iniciação do alongamento de brotações em meio de cultura suplementado com cloro após três subcultivos (Figura 6 A-B).

**Figura 6.** Brotações de *Corymbia maculata* nas fases de multiplicação e alongamento *in vitro*. (A) Explantes contendo múltiplas gemas axilares em meio de cultura WPM com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP após 90 dias após a inoculação. (B) Tufo apresentando múltiplas gemas axilares com iniciação do alongamento de brotações, detalhe para o escurecimento do meio de cultura causado pela liberação de compostos fenólicos. (C) Tufo em meio de alongamento *in vitro*, frasco de 250 ml com tampas de polipropileno. Barras = 1 cm.



Fonte: Do autor (2020).

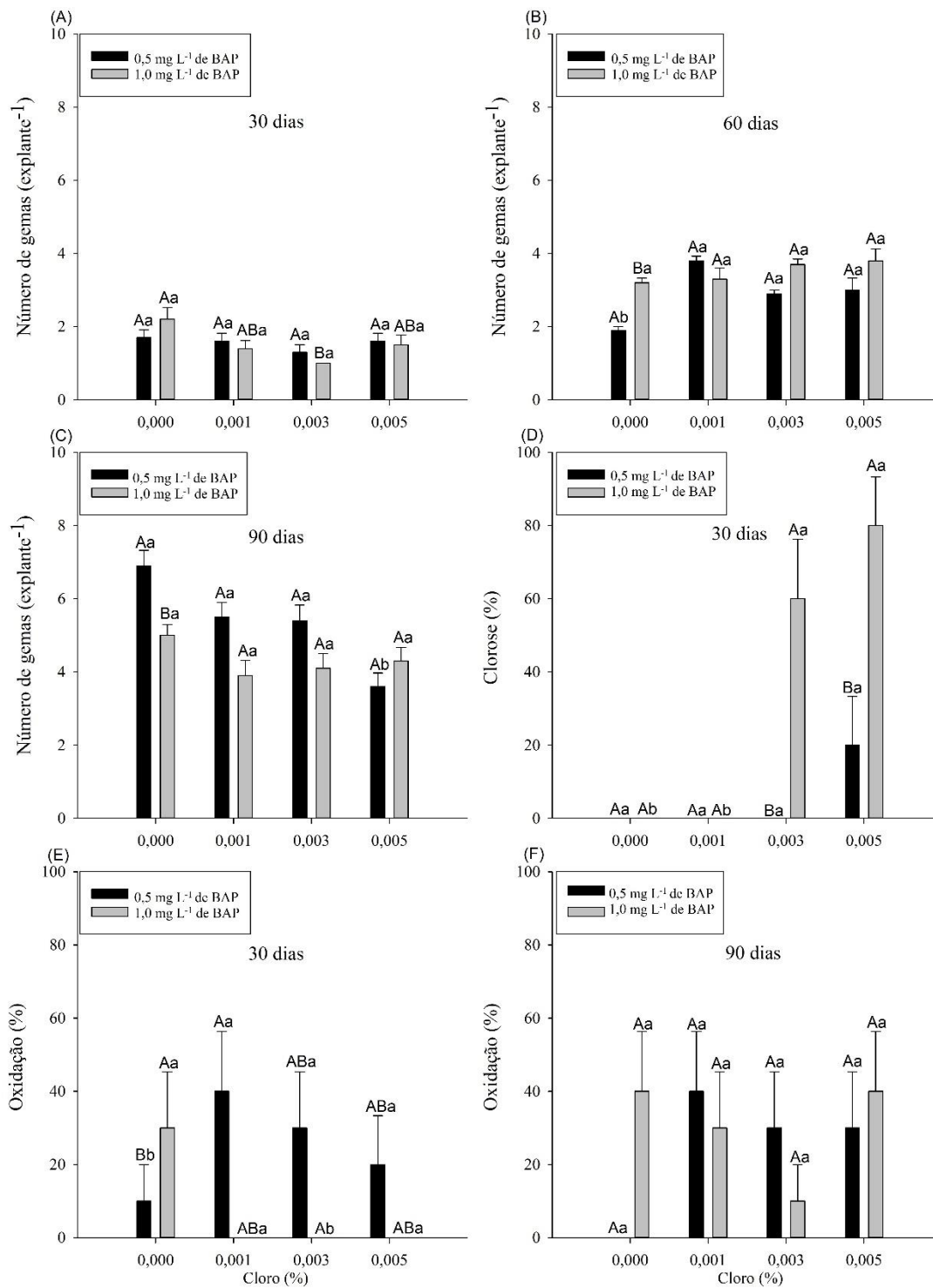
Outra diferença em termos visuais referiu-se à oxidação dos tecidos, em que a combinação de 0,50 mg L<sup>-1</sup> de BAP com concentrações de 0,001% e 0,005% de cloro ativo corresponderam às maiores médias ( $\pm 40,0$  e 30,0%) (APÊNDICE B). No primeiro (30 dias) e terceiro (90 dias), ocorreu liberação elevada de compostos fenólicos, porém



sem comprometer o crescimento do explante, sendo que aos 60 dias foi nula. Quanto à manifestação de fungos e bactérias, o uso de quaisquer concentrações de cloro foi suficiente para reduzir a ocorrência, sem que estes comprometessem o crescimento e desenvolvimento dos explantes.

**Figura 7.** Características observadas na multiplicação *in vitro* de *Corymbia maculata* em relação as diferentes concentrações de regulador de crescimento (0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP), cloro ativo [0,000%; 0,001%; 0,003% e 0,005% (v/v)] avaliados por 90 dias. **(A)** Número de gemas (explante<sup>-1</sup>) cultivadas por 30 dias. **(B)** Número de gemas (explante<sup>-1</sup>) cultivadas por 60 dias. **(C)** Número de gemas (explante<sup>-1</sup>) cultivadas por 90 dias. **(D)** Porcentagem de clorose nas folhas avaliada aos 30 dias de cultivo *in vitro*. **(E)** Porcentagem de oxidação fenólica dos explantes avaliada aos 30 dias. **(F)** Porcentagem de oxidação fenólica dos explantes avaliada aos 90 dias. 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.





Fonte: Do autor (2020).

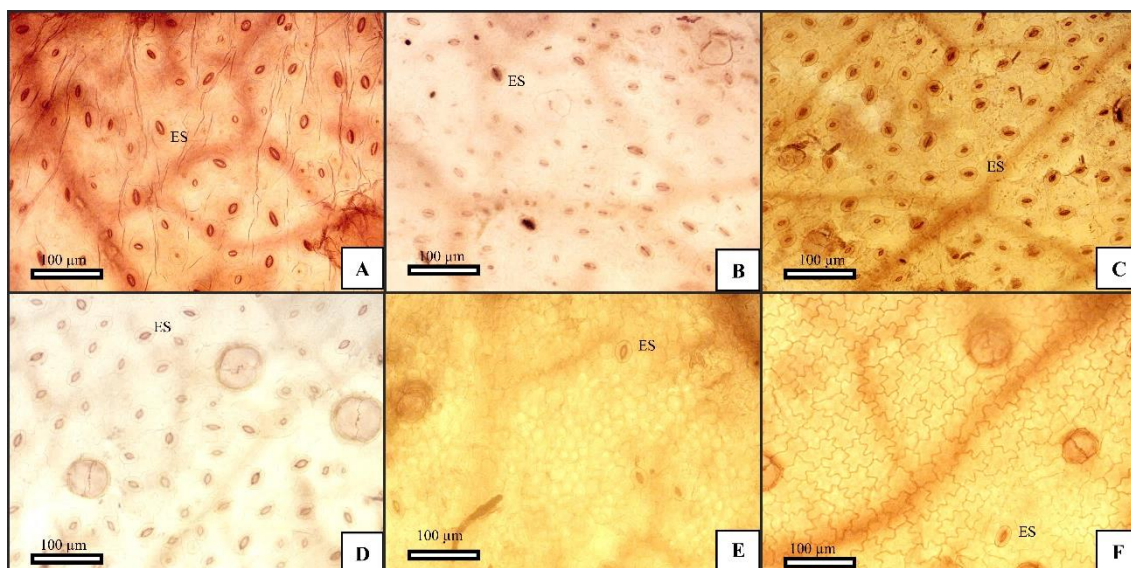
### 5.3 Efeitos da esterilização química e mixotrofismo no alongamento *in vitro*

A análise de variância dos dados amostrados revelou efeito significativo ( $p < 0,05$ ) da concentração de cloro suplementado ao meio de cultura, membranas porosas e regulador de crescimento em relação ao número e comprimento de brotações alongadas por explante, além da densidade de estômatos por milímetros quadrados (APÊNDICE C).

O maior número de brotações alongadas por explante ocorreu em meio de cultura suplementado com 0,003% de cloro ativo e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, e três membranas porosas, sendo que a estimativa foi de 8,25 brotações alongadas por explante (APÊNDICE D). Ao considerar o comprimento das brotações alongadas (>0,5 cm) com o uso de membranas porosas, pode-se verificar que a suplementação de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA e na ausência de cloro ativo, favoreceu o maior comprimento de brotações por explante (APÊNDICE D). Os tufo não apresentaram raízes na porção basal, efeito provavelmente ocasionado pela não adição de AIB ao meio de cultura, porém as brotações estavam vigorosas e sem deficiência nutricional e hormonal evidente.

Nas análises anatômicas das folhas das brotações no final do experimento (60dias), pôde-se observar que a ausência de membranas proporcionou os melhores resultados (APÊNDICE D), ocorrendo em média de 103,70 estômatos mm<sup>-2</sup>, com meio de cultura isento de cloro ou em baixas concentrações. Além disso, percebe-se que combinações de reguladores de crescimento e membranas influenciaram na presença de estômatos (Figura 8 A -F).

**Figura 8.** Digestão estomática das folhas de explantes de *Corymbia maculata* cultivados *in vitro*. (A) Face abaxial da folha de *C. maculata* cultivada em meio suplementado com 0,001% de cloro ativo e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, em frascos com tampas de polipropileno sem orifícios. (B) Face abaxial da folha de *C. maculata* cultivada em meio suplementado com 0,001% de cloro ativo e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, em frascos com tampas de polipropileno com um orifício. (C) Face abaxial da folha de *C. maculata* cultivada em meio suplementado com 0,001% de cloro ativo e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, em frascos com tampas de polipropileno com três orifícios. (D) Face abaxial da folha de *C. maculata* cultivada em meio suplementado com 0,003% de cloro ativo e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, em frascos com tampas de polipropileno sem orifícios. (E) Face abaxial da folha de *C. maculata* cultivada em meio suplementado com 0,003% de cloro ativo e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, em frascos com tampas de polipropileno com um orifício. (F) Face abaxial da folha de *C. maculata* cultivada em meio suplementado com 0,005% de cloro ativo e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA, em frascos com tampas de polipropileno com três orifícios. Es = Estômatos. Barras = 1 cm.



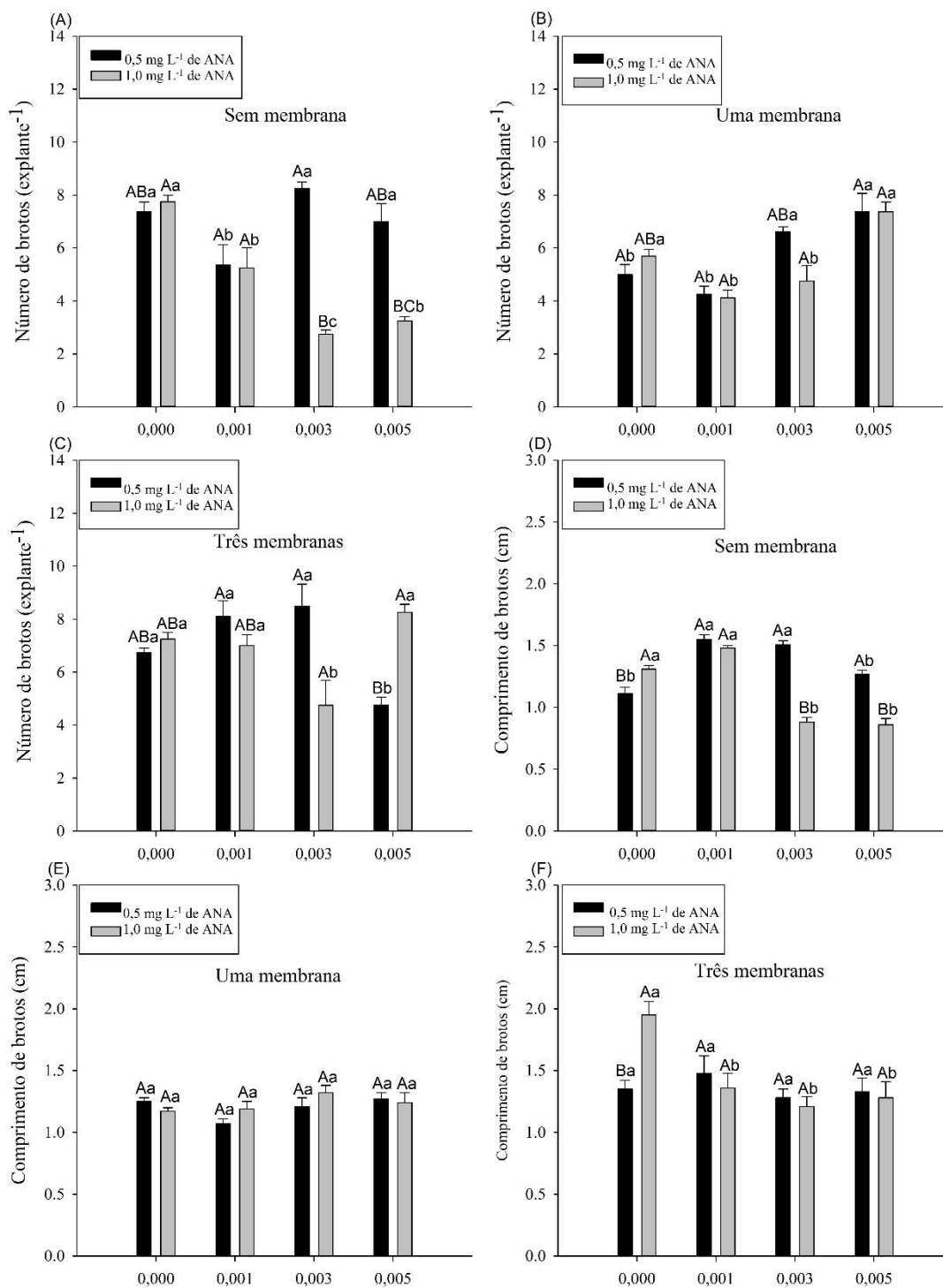
Fonte: Do autor (2020).

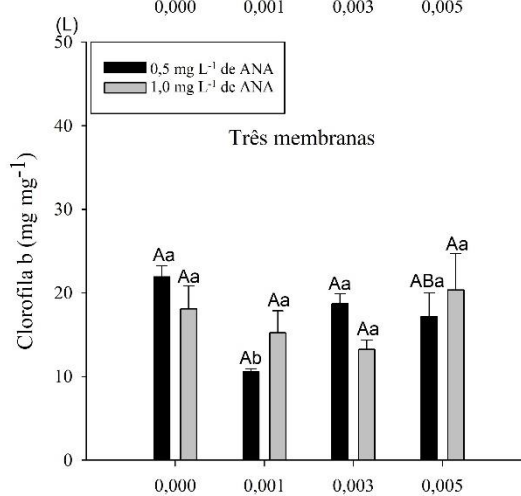
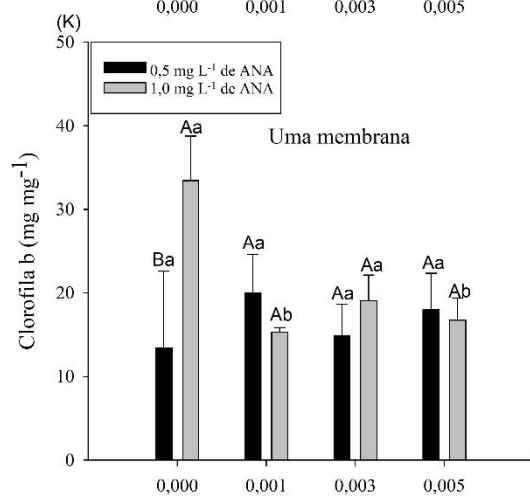
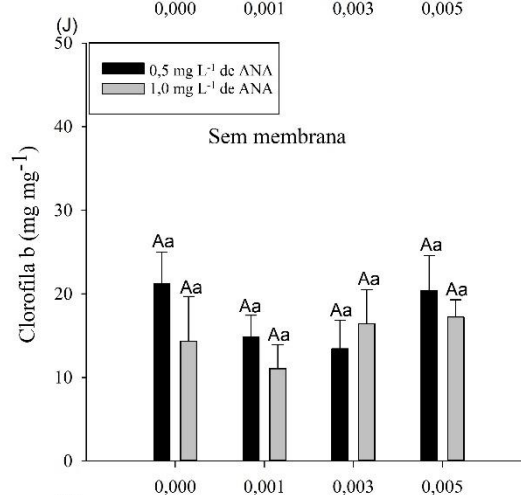
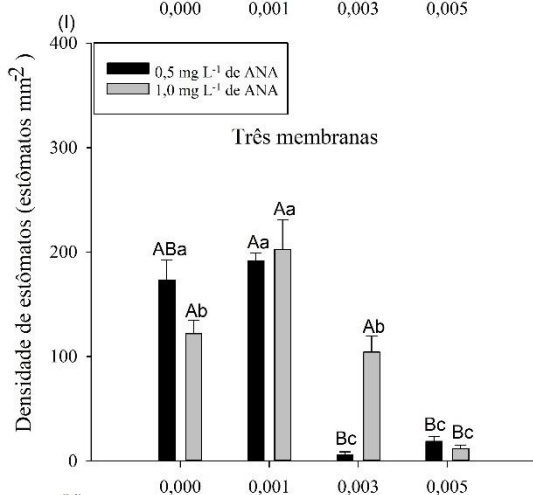
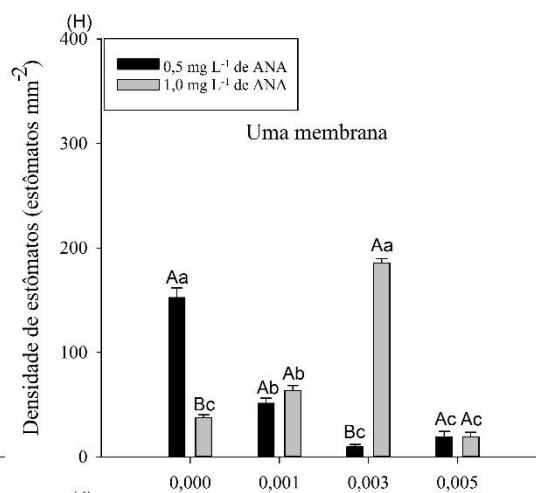
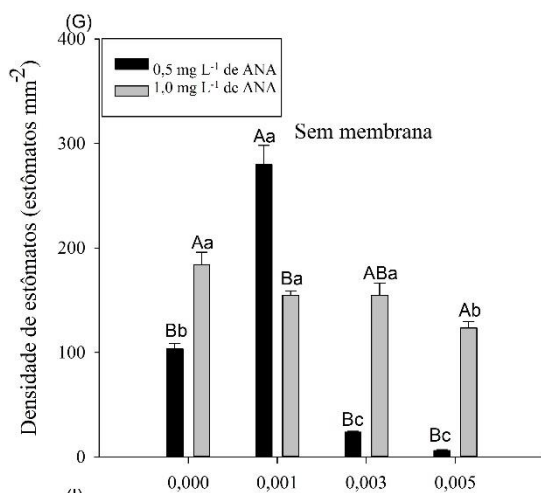
Em termos qualitativos pela análise visual, as melhores respostas para indução de brotações alongadas (>0,5 cm) de comprimento foram obtidas na ausência de cloro ativo, sendo que nessas condições todas as brotações apresentaram-se vigorosas e com excelente formação. Todas as brotações alongadas na presença de cloro apresentaram-se estioladas e com folhas reduzidas, independente da concentração de ANA. De acordo com essas características e com análise de comparação de médias, o meio de cultura mais adequado para o alongamento de brotações foi isento de cloro ativo com a utilização de tampas de polipropileno com três orifícios.

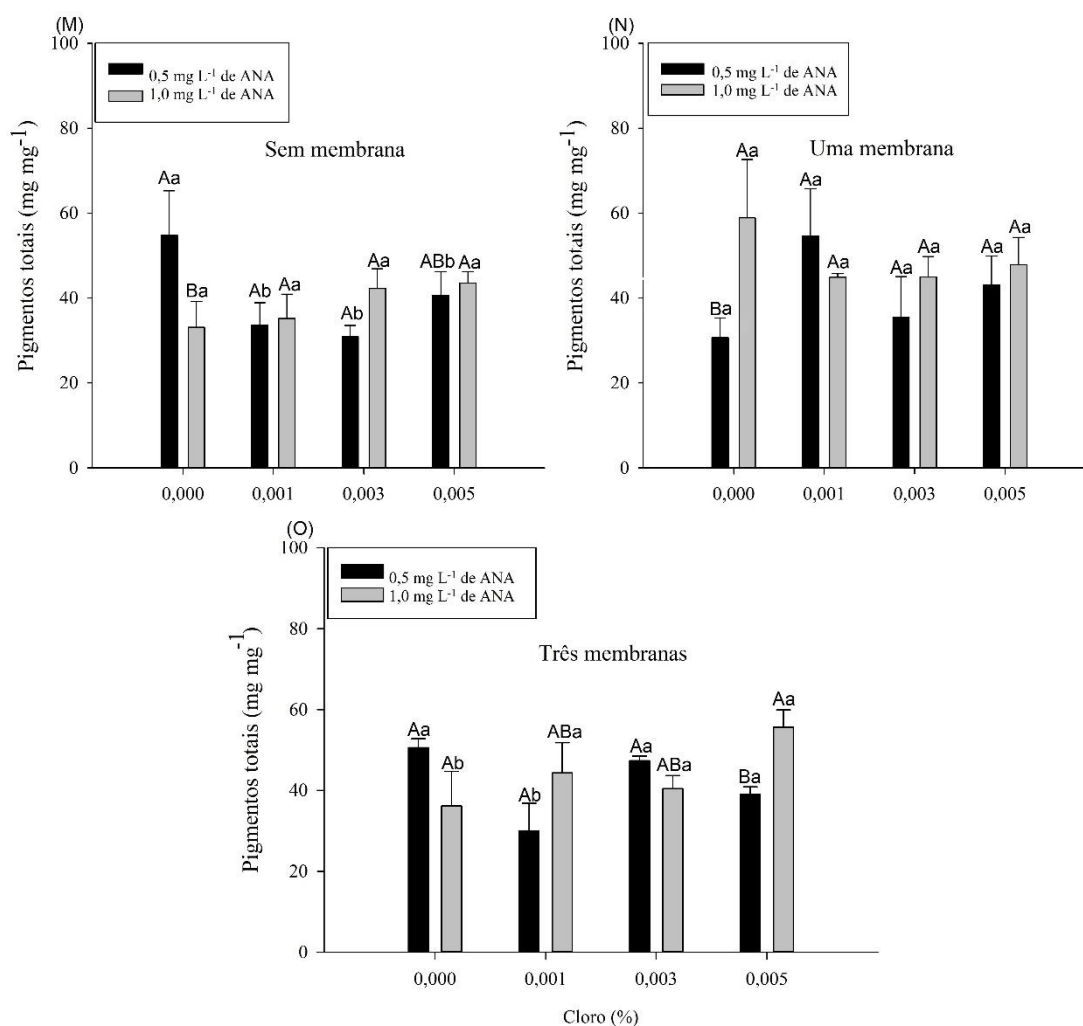
Para o conteúdo de pigmentos, clorofila a e total, os melhores resultados [ $\pm 33,43$  e  $\pm 59,86$  ( $\text{mg mg}^{-1}$ )] foram com o uso de uma membrana (Figura 8 J-O), com efeito significativo, evidenciando a importância da maior troca gasosa ( $\text{CO}_2$ ). Além disso, observa-se que a ausência de cloro ativo no meio de cultura também proporcionou melhores resultados (APÊNDICE G).

**Figura 9.** Características observadas no alongamento *in vitro* da espécie *Corymbia maculata* em função das diferentes concentrações de regulador de crescimento ANA (0,5  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA e 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  de ANA), cloro ativo [0,000%; 0,001%; 0,003% e 0,005% (v/v)] e tampas de polipropileno. **(A)** Número de brotos ( $\text{explante}^{-1}$ ) cultivados com tampas de polipropileno sem orifícios. **(B)** Número de brotos ( $\text{explante}^{-1}$ ) cultivados com tampas de polipropileno com um orifício. **(C)** Número de brotos ( $\text{explante}^{-1}$ ) cultivados com tampas de polipropileno com três orifícios. **(D)** Comprimento de brotos (>0,5 cm) cultivados com tampas de polipropileno sem orifícios. **(E)** Comprimento de brotos (>0,5 cm) cultivados com tampas de polipropileno com um orifício. **(F)** Número de brotos

(explante<sup>-1</sup>) cultivados com tampas de polipropileno com três orifícios. **(G)** Densidade de estômatos por milímetros quadrados com tampas de polipropileno sem orifícios. **(H)** Densidade de estômatos por milímetros quadrados com tampas de polipropileno com um orifício. **(I)** Densidade de estômatos por milímetros quadrados com tampas de polipropileno com três orifícios. **(J)** Conteúdo de clorofila b com tampas de polipropileno sem orifícios. **(K)** Conteúdo de clorofila b com tampas de polipropileno com um orifício. **(L)** Conteúdo de clorofila b com tampas de polipropileno com três orifícios. **(M)** Conteúdo de pigmentos totais com tampas de polipropileno sem orifícios. **(N)** Conteúdo de pigmentos totais com tampas de polipropileno com um orifício. **(O)** Conteúdo de pigmentos totais com tampas de polipropileno com três orifícios. 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.







Fonte: Do autor (2020).

Nas avaliações de oxidação de acordo uma escala de notas, verificou – se as menores médias sem a utilização de membranas porosas. Em contrapartida para o vigor das brotações se destacou tampas com tampas de polipropileno com um orifício (APÊNDICE E).

#### 5.4 Efeitos da esterilização química e mixotrofismo no enraizamento *in vitro*

O enraizamento *in vitro* ( $\pm 5,08\%$ ) da espécie *C. maculata* foi baixo, mas por se tratar de resgate de matrizes com idade ontogenética avançada e características da espécie, foi bem sucedido com 45 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0,2 mg L<sup>-1</sup> de AIB, 20 g L<sup>-1</sup> de glicose. As raízes emitidas nas microestacas apresentaram formação normal e com emissão de raízes secundárias vigorosas (Figura 10 B). Em cortes anatômicos do caule em regiões próximas a emissão das raízes foi possível verificar a conexão dos tecidos cambiais (Figura 10 C), evidenciando formação de células do câmbio vascular (região meristemática), para formação de centros meristemáticos e posterior indução da raiz adventícia. Além disso,

não foi observada organogênese indireta, ou seja, presença de calo, o que caracteriza conexão vascular.

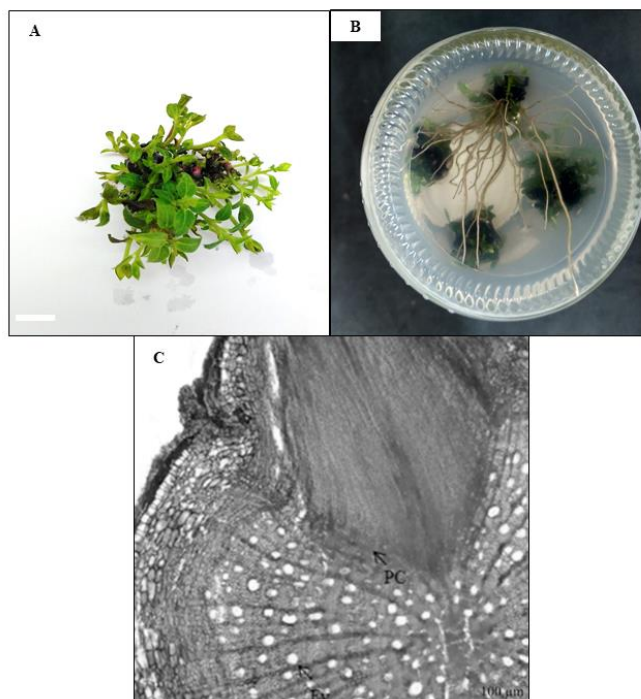
De acordo com a ANOVA houve interação ( $p < 0,05$ ) entre o tempo de exposição, presença de carvão ativado e luminosidade para a porcentagem de enraizamento aos 45 dias (APÊNDICE H).

Na ausência de carvão e luminosidade, os materiais vegetais que passaram por pré-tratamento por 48 horas em regulador de crescimento (AIB) apresentaram cerca de 27,50% de microestacas enraizadas (Figura 11 A-D), além de maior comprimento das microestacas, devido principalmente ao efeito “pulse” proporcionado pelo regulador. Porém, os brotos apresentaram folhas reduzidas e estioladas, com coloração branca, evidenciando a redução dos processos fotossintéticos (APÊNDICE I). Em relação ao enraizamento *ex vitro*, a espécie não se adaptou bem a esse sistema, ocorrendo morte dos materiais. Provavelmente, esse resultado pode estar relacionado às condições estressantes na qual as microestacas foram submetidas, ao permanecerem na ausência de luminosidade, acarretando em brotos estiolados e folhas reduzidas.

A oxidação das microestacas foi maior nos tratamentos em que os explantes permaneceram por mais tempo expostos ao regulador de crescimento (AIB), em contrapartida, o vigor das microestacas foi maior nos menores tempos (0-24 horas) de exposição (APÊNDICE J).

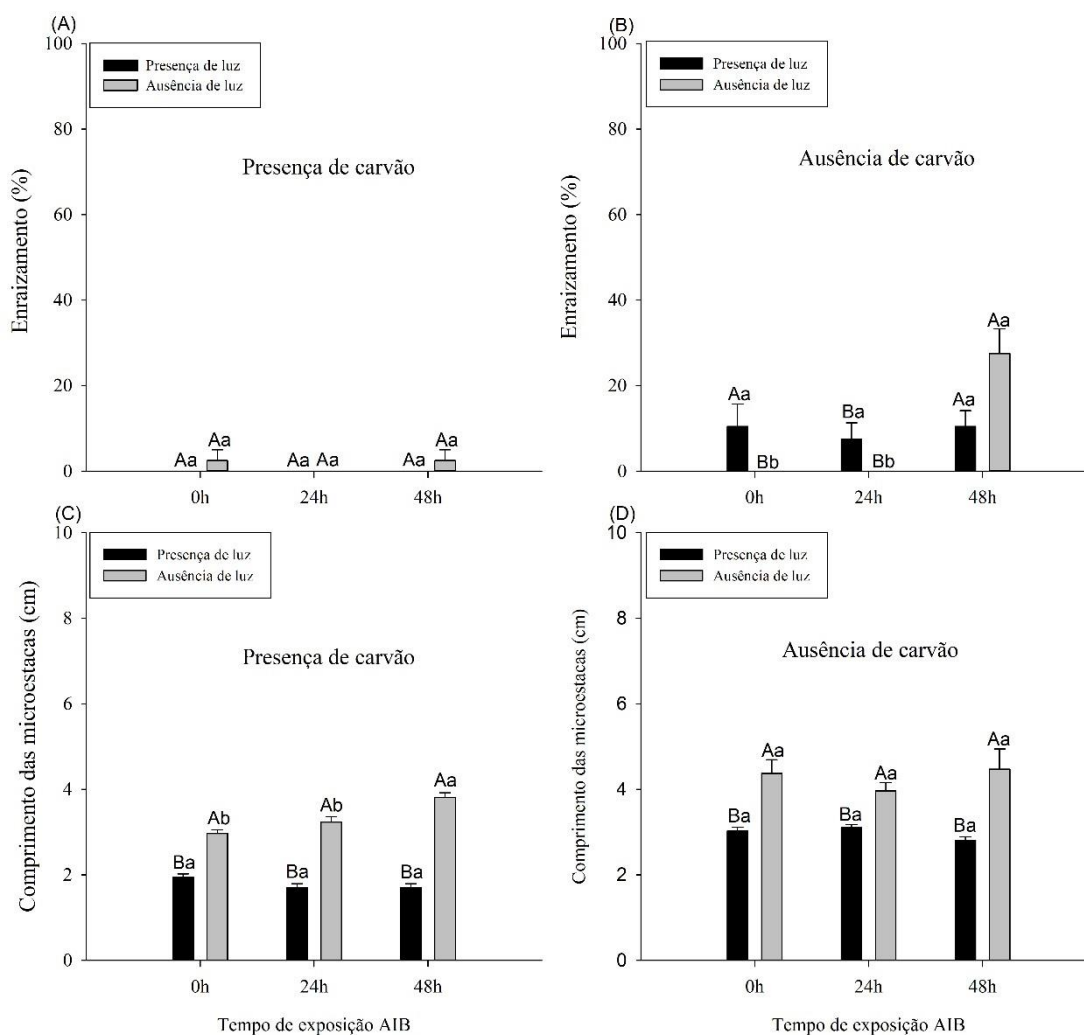
**Figura 10.** Fases e procedimentos para o enraizamento das microestacas da espécie *Corymbia maculata*. **(A)** Microestacas cultivadas em meio de cultura WPM suplementado com  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP,  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA,  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB na presença de luminosidade, detalhe que não houve enraizamento. **(B)** Explantes enraizados aos 45 dias na fase de enraizamento *in vitro*. **(C)** Corte anatômico de regiões próximas ao centro de formação de raízes adventícias. Pc = periciclo. Fv = feixes vasculares. Barras = 1cm.





Fonte: Do autor (2020).

**Figura 11.** Características observadas no enraizamento *in vitro* de *Corymbia maculata*. **(A)** Porcentagem de enraizamento de microestacas cultivadas em meio de cultura com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de carvão ativado, com duas condições de luminosidade. **(B)** Porcentagem de enraizamento de microestacas cultivadas em meio de cultura isento de carvão ativado, com duas condições de luminosidade. **(C)** Comprimento de microestacas ( $>0,5 \text{ cm}$ ) cultivadas em meio de cultura com  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de carvão ativado, com duas condições de luminosidade. **(D)** Comprimento de microestacas ( $>0,5 \text{ cm}$ ) cultivadas em meio de cultura isento de carvão ativado, com duas condições de luminosidade. 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.



Fonte: Do autor (2020).

## 6 DISCUSSÃO

### Introdução *in vitro*

Considerando o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *C. maculata*, os valores são semelhantes aos encontrados em outros protocolos de introdução *in vitro* para espécies de *Eucalyptus*, *E. cloeziana* (OLIVEIRA et al., 2015); *E. benthamii* (BACCARIN et al., 2015; BRONDANI et al., 2009); *E. dunnii* (NAVROSKI et al., 2014); *E. globulus* (BORGES et al., 2012); *Corymbia citriodora* (NAGAE et al., 1996); *E. camaldulensis* × *E. tereticornis* (ARYA; SHARMA; ARYA, 2009).

O percentual elevado de contaminação está principalmente relacionado com a origem do material, os tecidos foram expostos ao ambiente da casa de vegetação, de temperatura e umidade elevada, o que pode contribuir para o surgimento de patógenos, dificultando a desinfestação dos explantes. Estes resultados são semelhantes ao encontrado por Brondani et al. (2009) que obteve maior estabelecimento *in vitro* dos

explantes originários de mini-jardins clonais protegidos, já que nesse tipo de ambiente se tem maior controle das condições ambientais e nutricionais.

### **Efeitos da esterilização química na multiplicação *in vitro***

De acordo, com os dados apresentados na Tabela 2, o hipoclorito de sódio possui uma forte propriedade oxidante (YILDIZ et al., 2012), foi capaz de esterilizar o meio de cultura juntamente com a autoclave, no entanto, concentrações menores de cloro [0,000; 0,001 e 0,003% (v/v)] proporcionaram os melhores resultados quanto à proliferação de gemas. Resultados semelhantes com o uso de hipoclorito de sódio foram relatados anteriormente por Brondani et al. (2013), sendo as concentrações de 0,001 e 0,003% (v/v) foram as mais adequadas. Além de reduzir as taxas de contaminação, o uso de cloro ativo pode ter um efeito positivo na sobrevivência dos explantes, o  $\text{Cl}^-$  é considerado um íon essencial, que influencia as reações fotossintéticas e a clivagem da molécula de água, liberando oxigênio (HERDEAN et al., 2016) e  $\text{Na}^+$  estimula o crescimento intensificando a expansão celular (BASSIL et al., 2012).

É interessante notar que as maiores taxas de clorose foram alcançadas quando 0,003 e 0,005% (v/v) foram adicionados ao meio de cultura (Tabela 3), sugerindo que esse esterilizante químico pode causar efeito fitotóxico nas brotações de *C. maculata*, sendo, portanto, uma concentração segura para a esterilização do meio de cultura 0,001% (v/v). O hipoclorito de sódio é um agente barato e fácil de ser adquirido (GEORGE et al., 2008; NIEDZ; BAUSHER, 2002), segundo Ribeiro (2006) o  $\text{NaClO}$  teve efeito negativo no cultivo *in vitro* de *Eucalyptus pellita* em concentrações de 0,009% (v/v), no entanto, em baixas concentrações apresenta efeito positivo. Assim, cabe ressaltar que o cloro ativo adicionado ao meio de cultura pode trazer efeitos positivos e negativos dependendo da concentração adicionada ao meio de cultura, recomenda-se que se faz necessário estabelecer a melhor concentração para cada tipo de material genético.

### **Efeitos da esterilização química e mixotrofismo no alongamento *in vitro***

O controle morfogênico é regulado por combinações de auxinas e citocininas principalmente (DAVEY; ANTHONY, 2010; GERORGE; HALL; DE KLERK, 2008; HOSSAIN; KIM; LEE, 2010; KOMATSU et al., 2011; PAPP; PLATH, 2011). Nesse estudo, foram testadas combinações de BAP e apenas uma de ANA, sendo que concentrações próximas de 0,50 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA adicionada ao meio de cultura WPM, com 20 g L<sup>-1</sup> de glicose, mostraram ser as recomendadas para a

obtenção de gemas axilares em quantidade e qualidade adequadas para serem usadas nas demais fases da micropropagação. Essas combinações de reguladores de crescimento mantiveram o controle morfogênico de *Corymbia maculata* próximas aos encontrados para outras espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia*.

Almeida (2012) trabalhando com *Corymbia citriodora* relatou que o aumento gradativo dos reguladores de crescimento é responsável pela emissão de brotos, mas ao adicionar concentrações maiores que 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP causa estresse nos materiais. Oliveira et al. (2014) estudando um híbrido de *Eucalyptus globulus* encontraram que combinações próximas a 0,70 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA em meio de cultura WPM foram a mais eficiente para obter gemas axilares.

Em relação ao uso de membranas porosas, Batista et al. (2018) em duas variedades de pepper ornamental (*Capsicum annuum*) verificaram maior comprimento da parte aérea e número de folhas por explante em sistema com membrana, quando comparado com sistema convencional. Já, Hung et al. (2016) trabalhando com a espécie *Vaccinium ashei* Reade observaram que o sistema com ventilação proporcionou maior comprimento de brotos, número de brotos, área foliar e conteúdo de clorofila. Resultados satisfatórios em ambientes com membranas podem estar associados ao aumento da fotossíntese causada pela disponibilidade de CO<sub>2</sub>.

No cultivo *in vitro* de *Plectranthus amboinicus* foi observada melhoria no vigor dos explantes com o uso de três membranas nos recipientes (SILVA et al., 2017). Plântulas de *Cattleya walkeriana* cultivadas em sistemas fotomixotróficos apresentaram maior espessura do mesófilo foliar e maior crescimento das plantas (DA SILVA; DANTAS, 2014). *Pfaffia glomerata* quando cultivada em sistemas que proporcionavam maior troca gasosa, apresentou maior crescimento das plântulas e conteúdo de pigmento fotossintético, em relação aos sistemas convencionais de cultura *in vitro* (SALDANHA et al., 2012).

Os pigmentos fotossintéticos apresentaram uma redução de seu conteúdo quando o número de membranas aumentou (Tabela 12 e 13). O aumento do número de membranas resulta em maior evaporação da água presente no meio de crescimento, o que pode induzir estresse hídrico nos explantes, além de causar deficiência nutricional. O estresse resultante pode contribuir para efeitos negativos na fotossíntese, ou até mesmo causar fotoinibição, reduzindo os índices de clorofila e carotenóides (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2015; LAZZARINI et al., 2019). Os resultados encontrados nesse estudo, corroboram com os encontrados por Saldanha et al. (2012), em que o uso de membranas porosas aumentou o conteúdo de pigmentos para *Pfaffia glomerata* em relação aos

sistemas sem membranas. Outros estudos também relatam o aumento do conteúdo de pigmentos quando submetidos a sistemas fotomixotróficos, tais como os relatados em *Oplopana xelatus* (PARK et al., 2011), *Gevuina avellana* (ALVAREZ et al., 2012) e *Pfaffia glomerata* (IAREMA et al., 2012).

Para a densidade estomática, em estudo realizado por Malda; Backhaus e Martin (1999) foi observado que fatores como alta umidade relativa, reguladores de crescimento e altas concentrações de açúcar adicionadas ao meio de cultura *in vitro* afetam os estômatos, estimulando a abertura durante o dia, e causando fixação contínua de CO<sub>2</sub>e aumentando a taxa de crescimento e abertura e fechamento dos estômatos. Os estômatos das folhas desenvolvidas *in vitro* podem ser não funcionais, por estarem sempre abertos e em grande quantidade (SHARMA; KATARIA; SHERKHAWAT, 2017), no presente estudo não foi realizado estudos para comprovar a funcionalidade dos estômatos, porém observou-se uma densidade estomática alta em alguns tratamentos.

O mau funcionamento dos estômatos e as características morfo-anatômicas alteradas das plantas cultivadas *in vitro* levam a uma capacidade fotossintética inadequada (POSPISILOVA; SYNKOVA; RULCOVA, 2000). Os estômatos foram identificados apenas na face abaxial da epiderme, caracterizando as folhas como hipoestomáticas. Ocorrendo em média 103,70 (estômatos/mm<sup>2</sup>), com meio de cultura isento de cloro ou em baixas concentrações (Figura 10). Outros estudos também relatam alterações no funcionamento e densidade de estômatos em plantas (LODHA et al., 2015; SHEKHAWAT; MANOKARI, 2016). No decorrer do crescimento das folhas, não apenas o desenvolvimento de novos estômatos, mas também alterações no tamanho das células epidérmicas e subsidiárias podem influenciar a densidade (ASAYESH et al., 2017).

### **Efeitos da esterilização química e mixotrofismo no enraizamento *in vitro***

O enraizamento de materiais resgatados da fase adulta é a fase de maior dificuldade, para obter plantas micropropagadas, o que pode impedir a definição de um protocolo de micropropagação (BRONDANI, 2012; HUNG; TRUEMAN, 2011). Apesar do índice de enraizamento desse estudo ser baixo ( $\pm 5,08\%$ ), mas por se tratar de resgate de matrizes com idade ontogenética avançada e características da espécie, foi bem sucedido com 45 dias de cultivo em meio de cultura WPM suplementado com 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0,2 mg L<sup>-1</sup> de AIB, 20 g L<sup>-1</sup> de glicose.

Nesse estudo, na ausência de carvão ativado e luminosidade, os materiais vegetais que passaram por pré-tratamento por 48 horas em regulador de crescimento (AIB) apresentaram cerca de 27,50% de microestacas enraizadas, além de maior comprimento

das microestacas. Porém, os brotos apresentaram folhas reduzidas e estioladas, com coloração branca, evidenciando a redução dos processos fotossintéticos. O uso de sucessivos subcultivos *in vitro*, pode promover o revigoração/rejuvenescimento do material, e dessa forma, aumentar o potencial de enraizamento e qualidade do sistema radicular (HUANG et al., 1992; WENDLING et al., 2014; SHANTHI et al. 2015 Os hormônios, principalmente as auxinas, como AIA e AIB, são amplamente aceitos como indutores de raízes adventícias (VILASBOAS; DA COSTA; FETT-NETO, 2019), o resultado encontrado nesse trabalho sugere que a exposição das microestacas ao AIB favoreceu o enraizamento das mesmas.

Verificou-se que o percentual de enraizamento foi muito baixo ao adicionar carvão ativado no meio de cultura ( $\pm 2,50\%$ ), enquanto na ausência foi elevado ( $\pm 27,50\%$ ), o carvão ativado é um antioxidante utilizado para evitar o comprometimento dos explantes ou morte pela liberação de compostos fenólicos que causam a oxidação dos mesmos. A adição de carvão ativado no meio de cultura pode trazer efeitos positivos ou negativos dependendo do tipo de cultura (SIPAYUNG et al., 2018). Os resultados do estudo mostraram que o carvão não foi benéfico para essa espécie, além dos compostos fenólicos o carvão pode absorver compostos que são benéficos para o crescimento das plantas, como materiais orgânicos (auxinas), isso explica a baixa porcentagem de enraizamento das microcepas que foram expostas a esse antioxidante.

No decurso desse estudo, notou-se que a ausência de luminosidade proporcionou maior percentual de enraizamento (cerca de 28%), a baixa intensidade luminosa pode estimular a produção de substâncias endógenas de crescimento (auxinas), atuando ativamente no processo de crescimento e desenvolvimento radicular (SIPAYUNG et al., 2018). Apesar dos efeitos benéficos da ausência de luminosidade na indução do sistema radicular, as microcepas apresentaram-se estioladas e com folhas reduzidas, o que pode reduzir os processos fotossintéticos. Os resultados insatisfatórios no sistema de enraizamento *ex vitro* testado, sugere que outros métodos sejam testados para a espécie em questão, como o de miniestufas proposto por Brondani et al. (2012).

Por fim, cabe ressaltar a importância desse trabalho, encontra-se descrito pela primeira vez um protocolo eficiente para micropropagação de árvores matrizes adultas de *Corymbia maculata*. Além disso, enaltece o uso da técnica da cultura de tecidos como forma de revigoração/rejuvenescimento de matrizes em estágio adulto.

## 7 CONCLUSÕES

- A multiplicação *in vitro* de gemas axilares foi influenciada pela adição de cloro ativo e regulador de crescimento no meio de cultura. Concentração reduzida de cloro ativo [0,001% (v/v)] combinada à 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e/ou 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA proporcionaram os melhores resultados.
- O alongamento das brotações depende do regulador de crescimento no meio de cultura e uso de membranas porosas. Os melhores resultados foram observados na ausência de cloro ativo, e suplementação do meio de cultura com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP, e três membranas porosas.
- O enraizamento *in vitro* apresentou baixo percentual (5,08%) e apenas na ausência de luminosidade e carvão ativado. As raízes formadas foram vigorosas e apresentaram conexão com o câmbio vascular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFONSO, D. et al. *In vitro* propagation of *Leucocrotonha vanensis* Borhidi (Euphorbiaceae): A rare serpentine- endemic species of Cuba. **Plant Biosystems**, [s.l.], v. 152, n. 4, p. 649-656, 2018. <https://doi.org/10.1080/11263504.2017.1311961>

ANAND, M.; BRAR, J.; SOOD, A. *In vitro* propagation of an edible bamboo *Bambusa bambos* and assessment of clonal fidelity through molecular markers. **Journal of Medical and Bioengineering**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 257-261, 2013. <https://doi.org/10.12720/jomb.2.4.257-261>

ANDRADE, M.C.N.De et al. Análise química da madeira e casca de diferentes tipos de eucalipto antes e durante o cultivo de shiitake em toras. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 1, p. 165-175, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622010000100018>.

ALMEIDA, L.V. **Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus citriodora* (Hook) K.D. Hill & L.A.S. Johnson**. 2012. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ALVAREZ, C. et al. Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuinaa vellana* mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 1, n. 110, p. 93-101, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0133-x>

ARYA, I. D.; SHARMA, S.; ARYA, S. Micropropagation of superior *Eucalyptus* hybrids FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn x *E. tereticornis* Sm) and FRI-14 (*Eucalyptus torelliana* F. V. Muell x *E. citriodora* Hook): a commercial multiplication and field evaluation. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 8, n. 21, p. 5718-5726, 2009. <https://doi.org/10.5897/AJB09.822>

ASAYESH, Z.M. et al. Enhancement of *ex vitro* acclimation of walnut plantlets through modification of stomatal characteristics *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 220, p. 114-121, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.03.045>

ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. **Hibridação e clonagem**. In: BORÉM, A. (Ed.). *Biologia florestal*. Viçosa, Suprema, 2007. p. 93-121.

ASSIS, T.; RESENDE, M. Genetic improvement of forest tree species. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Brazil, v. 11, p. 44-49, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-70332011000500007>.

BABU, G. A.; VINOTH, A.; RAVINDHRAN, R. Direct shoot regeneration and genetic fidelity analysis in finger millet using ISSR markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 132, p. 157-164, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1319-z>

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. <https://doi.org/10.1007/s11056-015-9472-x>

BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into



- acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 107, p. 13-24, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9951-5>
- BASSIL, E. et al. Cell ion homeostasis: emerging roles of NHX Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> intracellular antiportants in plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v, 63, n. 16, p. 5727-5740, 2012.
- BATISTA, D.S. et al. Light quality in plant tissue culture: does it matter. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 54, n. 3, p. 13-24, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9902-5>
- BELLINI, C; PACURAR, D.I.; PERRONE, I. Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 65, p. 639-666, 2014. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035645>
- BIANCHETTI, R.E. et al. An improved protocol for *in vitro* propagation of the medicinal plant *Mimosa pudica* L. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 16, n. 9, p. 418-28, 2017. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15831>
- BISHT, P. et al. *In Vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*E. citriodora* Hook. × *E. torelliana* F.V. Muell.). **Indian Journal Forest**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 28-32, 2000.
- BOLAND, D. et al. **Forest trees of Australia**. Melbourne: CSIRO, 2006. 736 p.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. 532 p.
- BORGES, S. R. et al. *In vitro* establishment of hybrid clones of *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 605-616, 2012. <https://doi.org/10.5902/198050986626>
- 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. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622009000100002>
- BRONDANI, G. E. et al. Application of IBA for rooting mini-cuttings of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 667-674, 2010. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i4.4879>
- BRONDANI, G. E. et al. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 33, n. 4, p. 655-663, 2011. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i4.8317>
- BRONDANI, G. E. et al. Dynamics of adventitious rooting in mini-cuttings of *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 34, n. 2, p. 169-178, 2012. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v34i2.13059>
- BRONDANI, G. E. et al. Chemical sterilization of culture medium: a low cost alternative to *in vitro* establishment of plants. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 41, n. 98, p. 257-264, 2013.

CARDOSO, J. C.; DA SILVA, J. A.T. Micropropagation of gerbera using chlorine dioxide (ClO<sub>2</sub>) to sterilize the culture medium. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 48, n. 3, p. 362-368, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9418-8>

CARDOSO, J.C.; GERALD, L.T.S.; SILVA, J.A.T. Micropropagation in the 21st century. In: Protocolos de cultura de células vegetais. Clifton: **Methods in molecular biology**, 2018. p. 17-46.

CARVALHO, A.C.P.P. et al. Plant tissue culture glossary. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 30-60, 2011.

CHA-UM, S. et al. Promoting root induction and growth of in vitro macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau') plantlets using CO<sub>2</sub> -enriched photoautotrophic conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, p. 435-444, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9940-8>

CHHAJER, S.; KALIA, R. K. Evaluation of genetic homogeneity of *in vitro* - raised plants of *Tecomella undulata* (Sm.) Seem. using molecular markers. **Tree Genetics Genomes**, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 1-10, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1057-0>

CHENG, S. et al. Bioresource Technology Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two *eucalyptus* species. **Bioresource Technology Journal**, [s.l.], v. 100, n. 1, p. 452-456, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.038>

CRUZ, C. D. **Programa Genes versão Windows**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 2001. 648 p.

CUTTER, E.G. Introdução: anatomia e o vegetal e a planta em crescimento. In: CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**: parte I: células e tecidos. São Paulo: Roca, 2002. cap.1, p.1-7.

DAVEY, M.R.; ANTHONY, P. **Plant cell culture**: essencial methods. Singapore: Markono Print Media Pte., 2010. 341 p.

DA SILVA, F.F.S.; DANTAS, B.F. Growth rates of quixaba tree seedlings submitted to different conditions. **Scientia Plena**, [s.l.], v. 10, n. 9, 1-7, 2014.

DE KLERK, G.J.; KRIEKEN, W.V.D.; JONG, J.C. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 35, p. 189-199, 1999. <https://doi.org/10.1007/s11627-999-0076-z>

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Programa SOC - software científico**: versão 2.1. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 1990.

EVERITT, B. S. et al. Hierarchical clustering. In: SHEWHART, W. A.; WILKS, S. S. (Eds.) **Cluster analysis**. John Wiley and Sons, 2011. p. 71-110.

FERREIRA, M. **Escolha de espécies de eucalipto**. Piracicaba: IPEF, 1979. 20 p. (Circular técnica, 39).

FONSECA, S. M. et al. **Manual prático de melhoramento genético do eucalipto**. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2010. 200 p.

GAVILAN, N.H. et al. Chemical sterilization of culture medium for *in vitro* multiplication of *Cochlospermum regium*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 48, n. 9, p. 1-7, 2018. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170581>

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

GOWER J. C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, London, v. 53, n. 3, p.325-338, 1966. <https://doi.org/10.1093/biomet/53.3-4.325>

HAMMER R.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. **Paleontological statistics software package for education and data analysis**. Palaeontologia Electronica, 2001. Disponível em <[http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)>. Acesso em: 29 outubro de 2019.

HERDEAN, A. et al. A voltage-dependent chloride channel adjusts photosynthesis in plants. **Nature Communications**, England, v. 7, n. 11654, p. 1-11, 2016.

HERINGER, A. S. et al. Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, Germany, v. 39, p. 1-14, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2349-1>

HUANG, L.C. et al. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*. **Plant Physiology**, Washington, v. 98, n. 1, p. 166-173, 1992. <https://doi.org/10.1104/pp.98.1.166>

HUNG, C.D.; TRUEMAN, S.J. Nutrient responses differ between node and organogenic cultures of *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (Myrtaceae). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 58, n. 5, p. 69-77, 2010. <https://doi.org/10.1071/BT10029>

HUNG, C.D. et al. *In vitro* proliferation and *ex vitro* rooting of microshoots of commercially important rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) using spectral lights. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 211, n. 1, p. 248-254, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.003>

IAREMA, Lourdes et al. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* Spreng.) Pedersen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 110, p. 227-238, 2012.

IBÁ. **Relatório Anual**. Indústria Brasileira de Árvores, p. 80, 2017.

IPEF, 2019. Disponível em <<http://www.ipef.br/identificacao/cief/especies/maculata.asp>> Acessado dia 02/11/2019.

JENA, S. et al. High-frequency clonal propagation of *Curcuma angustifolia* ensuring genetic fidelity of micropropagated plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 135, n. 3, p. 473-486, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1480-z>

JOHANSEN DA. **Plant microtechnique**. London: McGraw-Hill Book Company; 1940.

FURLAN, F.C. et al. Active chlorine and charcoal affect the *in vitro* culture of *Bambusa vulgaris*. **Bosque**, Valdivia, v. 39, n. 1, p. 61-70, 2018. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002018000100006>

KHATUNA, M. M. et al. Evaluation of genetic fidelity of *in vitro* - propagated *Aloe vera* plants using DNA-based markers. **Scienceasia**, Thailand, v. 44, n. 2, p. 87-91, 2018. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2018.44.087>

KOMATSU, Y.H. et al. *In vitro* morphogenic response of leaf sheath of *Phyllostachys bambusoides*. **Journal of Forestry Research**, Peoples R China, v. 22, n. 2, p. 209-215, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11676-011-0152-1>

KOZAI, T; KUBOTA, C. Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. **Springer**, Germany, p. 19-20, 2005. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3126-2\\_3](https://doi.org/10.1007/1-4020-3126-2_3)

KOZAI, T.; CHIBA. Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, Bulgaria, v. 10, n. 4, p. 375-379, 2010.

LAZZARINI, L.E.S. et al. Explant type and natural ventilation systems influence growth and content of carvacrol and thymol of *Lippia gracilis* Schauer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 137, n. 1, p. 33-43, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-01548-5>

LEVA, A. R.; PETRUCCELLI, R. Monitoring of cultivar identity in micropropagated olive plants using RAPD and ISSR markers. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 56, n. 2, p. 373-376, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0102-6>

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

LICHTENTHALER, H.K. ChlorolShylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, New York, v. 148, p. 350-82, 1987.

LIMA, D.M. et al. Capacidade de enraizamento de estacas de *Maytenus muelleri* Schwacke com a aplicação de ácido indolbutírico relacionada aos aspectos anatômicos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 13, p. 422-438, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000400008>

LODHA, D.; PATEL, A.; SHEKHAWAT, N.S. A high-frequency *in vitro* multiplication, micromorphological studies and *ex vitro* rooting of *Cadaba fruticosa* (L.) Druce (Bahuguni): a multipurpose endangered medicinal shrub. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, India, v. 21, p. 407-415, 2015. <https://doi.org/10.1007/s12298-015-0310-6>

LORENZI, H. et al. **Árvores exóticas no Brasil**: madeireiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003, 352 p.

MAALLOUL, A. et al. Effect of treated wastewater on growth and secondary metabolites production of two *Eucalyptus* species. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v. 211, n. 1, p. 1-9, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.09.027>

MALDA, G.; BACKHAUS, R.; MARTIN, C. Alterations in growth and Crassulacean Acid Metabolism (CAM) activity of *in vitro* cultured cactus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 58, p. 1-9, 1999. <https://doi.org/10.1023/A:1006377206855>

MARTINS, G.A. **Avaliação de características de estômatos em Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) com uso da geoestatística**. 2012. 73 p. Dissertação apresentada ao programa de Agronomia/ Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2012.

MARTINS, J.P.R. Effects of 6-benzylaminopurine on photosystem II functionality and leaf anatomy of *in vitro* cultivated *Aechmea blanchetiana*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 62, n. 4, p. 793-800, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0822-3>

MARTINS, J. P. R. et al. Anatomical and physiological changes of *in vitro*- propagated *Vriesea imperialis* (Bromeliaceae) in the function of sucrose and ventilated containers. **Plant Biosystems**, Italy, v. 154, n. 1, p. 1-13, 2019. <https://doi.org/10.1080/11263504.2019.1635223>

MARTÍNEZ, V.H. et al. Effect of culture conditions on stomatal density and stomatal index in four cactus species. **Haseltonia**, United States, v.2015, n. 20, p. 43-50, 2015. <https://doi.org/10.2985/026.020.0108>

MBAH, E.I.; WAKIL, S.M. Elimination of bacteria from *in vitro* yam tissue cultures using antibiotics. **Plant Pathology Journal**, South Korea, v. 94, n. 1, p. 53-58, 2012.

MCDONALD, M. W.; BROOKER, M. I. H.; BUTCHER, P. A. A taxonomic revision of *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae). **Australian Systematic Botany**, Melbourne, v. 22, n. 4, p. 257-285, 2009. <https://doi.org/10.1071/SB09005>

MEDJEMEM, N. et al. Elaboration and characterization of low-cost ceramics microfiltration membranes applied to the sterilization of plant tissue culture media. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, Taiwan, v. 59, p. 79-85, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.07.032>

MENDONÇA, E.G. et al. *In vitro* serial subculture to improve rooting of *Eucalyptus urophylla*. **New Forests**, Dordrecht, p. 1-16, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11056-019-09761-6>

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, Washington, v. 15, p. 473-497, 1962.

NADHA, H. K. et al. Evaluation of clonal fidelity of *in vitro* raised plants of *Guadua angustifolia* Kunth using DNA-based markers. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nigeria, v. 5, n. 23, p. 5636-5641, 2011.

NAGAE, S. et al. *In vitro* shoot development of *Eucalyptus citriodora* on rockwool in the film culture vessel under CO<sub>2</sub> enrichment. **Journal of Forestry Research**, Peoples R China v. 1, p. 227 -230, 1996. <https://doi.org/10.1007/BF02348330>

NASR, A. et al. Comparative effects of some extraction solvents on the antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Leaf bud, capsule and seed crude extracts. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 33, n.17, p. 1-6, 2018. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1455049>

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. <https://doi.org/10.1590/S0104-77602014000100017>

NEGI, D.; SAXENA, S. Ascertaining clonal fidelity of tissue culture raised plants of *Bambusa balcooa* Roxb. using inter simple sequence repeat markers. **New Forests**, Dordrecht, v. 40, p. 1-8, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11056-009-9182-3>

NIEDZ, R. P.; BAUSHER, M. G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse and field-grown trees. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 38, n. 5, p. 468-471, 2002. <https://doi.org/10.1079/IVP2002316>

NOLAN, R. H. et al. Contrasting ecophysiology of two widespread arid zone tree species with differing access to water resources. **Journal of Arid Environments**, London, v. 153, p. 1-10, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2018.01.003>

NORIKANE, A. et al. *In vitro* growth and single-leaf photosynthetic response of *Cymbidium* plantlets to super-elevated CO<sub>2</sub> under cold cathode fluorescent lamps. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, p. 273-283, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0820-1>

OLIVEIRA, M.L. et al. Effect of the immersion interval and air injection on the *in vitro* multiplication of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* in a temporary immersion bioreactor. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 37-45, 2014. <http://dx.doi.org/10.5902/1980509813321>

OLIVEIRA, L. S. De et al. Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. **Australian Forestry**, Queen Victoria, v. 78, n. 4, p. 219-231, 2015. <https://doi.org/10.1080/00049158.2015.1073211>

OLIVEIRA, L. S. De 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. <http://dx.doi.org/10.1590/1806-90882017000100014>

OLIVEIRA, L.S.De **Propagação de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell.** 2014, 99 p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. **Aspectos da fisiologia do enraizamento de estacas caulinares.** Jaboticabal: FUNEP, 1996. 83p.

PAIVA, J.G.A. et al. Verniz vitral incolor 500â: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botânica Brasileira**, [s.l.], v. 2, n. 20, p. 257-264, 2006.

PANDEY, R. et al. Higher than optimum temperature under CO<sub>2</sub> enrichment influences stomata anatomical characters in rose (*Rosa hybrida*). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 74-81, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.01.021>

PALMER, M. **Ordination methods for ecologists**. Disponível em: <<http://ordination.okstate.edu/>>. Acesso em: 09 de outubro de 2019.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. **Unidade de demonstração de produção de sementes da Embrapa Florestas em Piraju (SP): Cultivar BRS 287 (*Corymbiamaculata*)**. Relatório Técnico, Embrapa Florestas, 2008. 50 p.

PARK, S. et al. Improved growth and acclimatization of somatic embryo-derived *Oplopiana xelatus* plantlets by ventilated photoautotrophic culture. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 55, n. 3, p. 559-562, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0125-4>

PAPP, B.; PLATH, K. Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. **Cell Research**, Peoples R China, v. 21, n. 3, p. 486-501, 2011. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.28>

PENG, X.; ZHANG, T.; ZHANG, J. Effect of subculture times on genetic fidelity, endogenous hormone level and pharmaceutical potential of *Tetrastigma hemsleyanum* callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 122, n. 1, p. 67-77, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0750-2>

PEREIRA, J. C. D. et al. **Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, v. 38, 2000. 113 p.

PÉREZ- JIMÉNEZ, M. et al. A regime of high CO<sub>2</sub> concentration improves the acclimatization process and increases plant quality and survival. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 121, n. 3, p. 547-557, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0724-4>

POSPISILOVA, J.; SYNKOVA, H.; RULCOVA, J. Cytokinins and water stress. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 43, p. 321-328, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1026754404857>

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. 2019.

REIS, C.A. F. et al. ***Corymbia citriodora*: estado da arte de pesquisas no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2013. 59 p.

REIS, C.A. F. et al. ***Corymbia maculata*: estado da arte de pesquisas no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2014. 52p.

RESENDE, M. D. V.; PIRES, I. E.; SILVA, R. L. **Melhoramento do Eucalipto**. In: LOPES, M. A.; FAVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. F.; FALEIRO, F. G. (Ed.). **Pré-melhoramento de plantas: estado da arte e experiências de sucesso**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Embrapa Cerrados, 2011. p. 413-440.

RIBEIRO, J. M. **Comparação entre as técnicas de esterilização de meios de cultura de tecidos vegetais com hipoclorito de sódio e por autoclavagem**. 2008. 85 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2006.

RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, S. L.; BASTOS, D.C. *In vitro* culture of *Sequoia sempervirens* L. on nutritive media sterilize with sodium hypochlorite. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 1, p. 77-82, 2011. <https://doi.org/10.5902/198050982749>

RODRIGUES, S. P. et al. The effects of *in vitro* culture on the leaf anatomy of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 30, n. 6, p. 1933-1941, 2014.

SALDANHA, C.W. et al. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng *Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 110, p. 413-22, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0162-5>

SARMAST, M. K. *In vitro* propagation of conifers using mature shoots. **Journal of Forestry Research**, China, v. 29, n. 3, p. 565-574, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0608-7>

SAWANT, R. A.; TAWAR, P. N. Use of Sodium Hypochlorite as Media Sterilant in Sugarcane Micropropagation at Commercial Scale. **Sugar Tech**, India, v. 13, n. 1, p. 27-35, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12355-011-0072-6>

SHARMA, U.; KATARIA, V.; SHEKHAWAT, N.S. *In vitro* propagation, *ex vitro* rooting and leaf micromorphology of *Bauhinia racemosa* Lam.: a leguminous tree with medicinal values. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, India, v. 23, n. 4, p. 969-977, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0459-2>

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, p. 357-371, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11056-014-9465-1>

SHEKHAWAT, M.S.; MANOKARI, M. *In vitro* propagation, micromorphological studies and *ex vitro* rooting of cannon ball tree (*Couroupita guianensis* aubl.): a multipurpose threatened species. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, India, v. 22, p. 131-142, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12298-015-0335-x>

SILVA, J.A.T.D. et al. Acclimatization of *in vitro*- derived *Dendrobium*. **Horticultural Plant Journal**, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 110-124, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2017.07.009>

SINGH, S. R. et al. Evaluation of genetic fidelity of *in vitro* raised plants of *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult. F.) Backer ex K. Heyne using DNA-based markers. **Acta Physiologiae Plantarum**, Germany, v. 35, n. 2, p. 419-430, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1084-x>

SIPAYUNG, P. et al. The effect of activated charcoal dose and benzyl amino purine concentration on the growth of orchid plantlets in Murashige and Skoog media *in vitro*.



**IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, [s.l.], v. 205, p. 1-20, 2018.

SREBERNICH, S. M. Using chlorine dioxide and peracetic acid as substitutes for sodium hypochloride in the sanitization of minimally processed green seasoning. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 744-750, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400012>

STRASBURGER, E. **Handbook of practical botany**. London, George Allen Nonwin, Ltd. 1924. 533 p.

TANABE, T. et al. **Practical micropropagation of eucalypt species for the pulp and paper industry**. In: Environmental management: the role of *Eucalypts* and other fast growing species. CSIRO Publishing: Collingwood, Austrália, 1996. 54 p.

TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, M.T. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 86, p. 375-378, 2006. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9121-3>

TITON, M. et al. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622003000100001>

TIWARI, A. K. et al. Screening of Some Chemical Disinfectants for Media Sterilization During *In Vitro* Micropropagation of Sugarcane. **Sugar Tech**, India, v. 14, n. 4, p. 364-369, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12355-012-0178-5>

TREMBLAY, L.; LEVASSEUR, C.; TREMBLAY, F. M. Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, Pinaceae) and white spruce (*Picea glauca*, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 86, n. 10, p. 1-16, 1999. <https://doi.org/10.2307/2656920>

TRUEMAN, S. J.; HUNG, C. D.; WENDLING, I. Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, Switzerland, v. 9, n. 2, p. 1-42, 2018. <https://doi.org/10.3390/f9020084>

TRUEMAN, S. J.; MCMAHON, T. V.; BRISTOW, M. Production of cuttings in response to stock plant temperature in the subtropical *Eucalypts*, *Corymbia citriodora* and *Eucalyptus dunnii*. **New Forests**, Dordrecht, v. 44, p. 265-279, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11056-012-9315-y>

TRUEMAN, S. J.; RICHARDSON, D. M. *In vitro* propagation of *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (Myrtaceae) via cytokinin- free node culture. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 55, n. 4, p. 471-481, 2007. <https://doi.org/10.1071/BT06163>

VILASBOAS, J.; DA COSTA, C.T.; FETT-NETO, A.G. Rooting of eucalypt cuttings as a problem-solving oriented model in plant biology. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, New York, v. 146, p. 85-97, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.12.007>

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. Evaluation of yield and citronella content of essential oil from local origins and breeds of *Eucalyptus citriodora*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 56, p. 145-154, 1999.

WANG, X.J.; HSIAO, K.C. Sugar degradation during autoclaving: Effects of duration and solution volume on breakdown of glucose. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 94, n. 3, p. 415-418, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb00947.x>

WELLBURN AR. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b as well as total carotenoids, Using Various Solvents with Spectro photometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.144, n. 3, p.307-13, 1994.

WENDLING, I.; DUTRA, L.F. **Produção de mudas de eucalipto**. Colombo: Embrapa Florestas, 2010. 184 p.

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. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i1.15958>

WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry - II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New Forests**, Dordrecht, v. 45, p. 473-486, 2014a. <https://doi.org/10.1007/s11056-014-9415-y>

WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. concepts, regulation and consequences of phase change. **New Forests**, Dordrecht, v. 45, p. 449-471, 2014b. <https://doi.org/10.1007/s11056-014-9421-0>

WU, H.C.; KUO, M.L.; CHEN, C.M. Promotion of vegetative growth in force-ventilated *Protea cynaroides* L. explants cultured in modified temporary immersion culture vessels. **Hortscience**, Alexandria, v. 53, n. 2, p. 231-235, 2018. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI12513-17>

XAVIER, A.; SILVEIRA, A. M.; BRITO, J. O. Melhoria de *Eucalyptus* para produção de óleo essencial. In: SIMPÓSIO IPEF, 6., 1996, São Pedro. **Anais...** Piracicaba: IPEF, 1993.

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

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, p. 149-158, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9863-9>

YILDIZ, M. et al. The effect of sodium hypochlorite solutions on the viability and *in vitro* regeneration capacity of the tissue. **The Natural Products Journal**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 328-331, 2012.

ZAHARA, M.; DATTA, A.; BOONKORKAEW, P. Effects of sucrose, carrot juice and culture media on growth and net CO<sub>2</sub> exchange rate in *Phalaenopsis* hybrid Pink. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 205, p. 17-24, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.04.011>

ZHANG, J. et al. Sterilization using high-pressure carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 38, n. 3, p. 354-372, 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2005.05.005>

## APÊNDICES

## APÊNDICE A. Tabela de análise de variância dos parâmetros da multiplicação

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância do número de gemas, clorose e oxidação de *Corymbia maculata* cultivado *in vitro* em relação às concentrações de cloro, regulador de crescimento e tempo.

Causas de Variação	GL	Quadrados Médios		
		NGE (explante <sup>-1</sup> )	CLO (%)	OXI (%)
Tempo	2	18,7279**	13,4847**	19,3317**
Resíduo-Tempo	27	0,0364 <sup>NS</sup>	0,1404 <sup>NS</sup>	1,5042 <sup>NS</sup>
Parcela	29	-	-	-
Cloro	3	0,1958*	5,0567**	0,6145 <sup>NS</sup>
BAP	1	0,0294 <sup>NS</sup>	7,5851**	1,3169 <sup>NS</sup>
Cloro × BAP	3	0,3096**	2,5283**	5,6713**
Cloro × Tempo	6	0,5798**	5,0567**	0,9306 <sup>NS</sup>
BAP × Tempo	2	0,8023**	7,5851**	3,5292 <sup>NS</sup>
Cloro × BAP × Tempo	6	0,2078**	2,5283**	1,5627 <sup>NS</sup>
Resíduo	189	0,0676	0,3545	1,3570
Subparcela	239	-	-	-
Média	-	3,19	6,66	14,58
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	15,15	15,82	33,46

<sup>NS</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. \* e \*\* valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. GL = graus de liberdade. CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental. NGE = número de gemas por explante. CLO = clorose. OXI = oxidação. Fonte: Do autor (2020).

## APÊNDICE B. Valores médios dos parâmetros da multiplicação

**Tabela 3.** Valores médios do número de gemas por explante de *Corymbia maculata* em relação às concentrações de cloro e regulador de crescimento, aos 30, 60 e 90 dias.

Cloro (%)	30 dias		60 dias		90 dias	
	BAP (mg L <sup>-1</sup> )		BAP (mg L <sup>-1</sup> )		BAP (mg L <sup>-1</sup> )	
	0,5	1,00	0,5	1,00	0,5	1,00
0,000	1,70±0,21Aa	2,20±0,33Aa	1,90±0,10Ab	3,20±0,13Ba	6,90±0,43Aa	5,00±0,30Ba
0,001	1,60±0,22Aa	1,40±0,22ABa	3,80±0,13Aa	3,30±0,30Aa	5,50±0,40Aa	3,90±0,41Aa
0,003	1,30±0,21Aa	1,00±0,00Ba	2,90±0,10Aa	3,70±0,15Aa	5,40±0,43Aa	4,10±0,41Aa
0,005	1,60±0,22Aa	1,50±0,27ABa	3,00±0,33Aa	3,80±0,33Aa	3,60±0,37Ab	4,30±0,37Aa

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 ± desvio padrão.

**Tabela 4.** Valores médios de clorose nos explantes de *Corymbia maculata* em relação às concentrações de cloro e regulador de crescimento, aos 30, 60 e 90 dias.

Cloro (%)	30 dias		60 dias		90 dias	
	BAP (mg L <sup>-1</sup> )		BAP (mg L <sup>-1</sup> )		BAP (mg L <sup>-1</sup> )	
	0,5	1,00	0,5	1,00	0,5	1,00
0,000	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Ab	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa
0,001	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Ab	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa
0,003	0,00±0,00Ba	60,00±16,32Aa	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa
0,005	20,00±13,33Ba	80,00±13,33Aa	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa

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 ± desvio padrão.

**Tabela 5.** Valores médios de oxidação nos explantes de *Corymbia maculata* em relação às concentrações de cloro e regulador de crescimento, aos 30, 60 e 90 dias.

Cloro (%)	30 dias		60 dias		90 dias	
	BAP (mg L <sup>-1</sup> )		BAP (mg L <sup>-1</sup> )		BAP (mg L <sup>-1</sup> )	
	0,5	1,00	0,5	1,00	0,5	1,00
0,000	10,00±10,00Bb	30,00±15,27Aa	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa	40,00±16,33Aa
0,001	40,00±16,33Aa	0,00±0,00ABa	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa	40,00±16,33Aa	30,00±15,27Aa
0,003	30,00±15,27ABa	0,00±0,00Ab	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa	30,00±15,27Aa	10,00±10,00Aa
0,005	20,00±13,33ABa	0,00±0,00ABa	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa	30,00±15,27Aa	40,00±16,33Aa

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 ± desvio padrão. Fonte: Do autor (2020).

**APÊNDICE C.** Tabela de análise de variância dos parâmetros do alongamento

**Tabela 6.** Resumo da análise de variância do número e comprimento dos brotos (>0,5 cm) de *Corymbia maculata* cultivado *in vitro* em relação ao uso de membranas, concentrações de cloro e regulador de crescimento.

Causas de Variação	GL	Quadrados Médios		
		NBR (explante <sup>-1</sup> )	COM (cm explante <sup>-1</sup> )	Densidade Estômatica (estômatos mm <sup>-2</sup> )
Membranas	2	1,3927**	0,0548**	63,8476**
Cloro	3	0,5721**	0,0334**	143,6414**
ANA	1	1,6860**	0,0265*	46,4435**
Membrana×Cloro	6	0,9263**	0,0503**	21,7441**
Membrana× ANA	2	1,1743**	0,0654**	25,8186**
Cloro× ANA	3	1,7031**	0,0568**	101,9318**
Membrana × Cloro × ANA	6	0,7295**	0,0378**	39,4503**
Resíduo	168	0,0795	0,0047	0,6585
Média	-	6,11	1,29	103,70
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	11,59	7,69	8,81

<sup>NS</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. \* e \*\* valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. GL = graus de liberdade. CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental. NBR = número de brotos por explante. COM = comprimento de brotos (>0,5 cm) por explante. Fonte: Do autor (2020).

## APÊNDICE D. Valores médios dos parâmetros do alongamento

**Tabela 7.** Valores médios de número de brotos por explante de *Corymbia maculata* em relação ao uso de membranas porosas, concentrações de cloro e regulador de crescimento.

Cloro (%)	Sem Membrana		Uma membrana		Três membranas	
	ANA (mg L <sup>-1</sup> )		ANA (mg L <sup>-1</sup> )		ANA (mg L <sup>-1</sup> )	
	0,5	1,00	0,5	1,00	0,5	1,00
0,000	7,37±0,37ABa	7,75±0,25Aa	5,00±0,38Ab	5,7±0,25ABa	6,75±0,16ABa	7,25±0,25Aa
0,001	5,37±0,75Ab	5,25±0,77Ab	4,25±0,31Ab	4,12±0,29Ab	8,12±0,58Aa	7,00±0,42Aba
0,003	8,25±0,25Aa	2,75±0,16Bc	5,62±0,18ABa	4,75±0,59Ab	8,50±0,82Aa	4,75±0,94Bb
0,005	7,00±0,68ABa	3,25±0,16BCb	7,37±0,70Aa	7,37±0,37Aa	4,75±0,31Bb	8,25±0,31Aa

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 ± desvio padrão.

**Tabela 8.** Valores médios de comprimento de brotos (>0,5 cm) por explante de *Corymbia maculata* em relação ao uso de membranas porosas, concentrações de cloro e regulador de crescimento.

Cloro (%)	Sem Membrana		Uma membrana		Três membranas	
	ANA (mg L <sup>-1</sup> )		ANA (mg L <sup>-1</sup> )		ANA (mg L <sup>-1</sup> )	
	0,5	1,00	0,5	1,00	0,5	1,00
0,000	1,11±0,05Bb	1,31±0,03Aa	1,25±0,03Aa	1,17±0,03Aa	1,35±0,07Ba	1,95±0,11Aa
0,001	1,55±0,04Aa	1,48±0,02Aa	1,07±0,04Aa	1,19±0,06Aa	1,48±0,14Aa	1,36±0,12Ab
0,003	1,51±0,03Aa	0,88±0,04Bb	1,21±0,07Aa	1,32±0,06Aa	1,28±0,07Aa	1,21±0,08Ab
0,005	1,27±0,03Ab	0,86±0,05Bb	1,27±0,05Aa	1,24±0,08Aa	1,33±0,11Aa	1,28±0,13Ab

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 ± desvio padrão.

**Tabela 9.** Valores médios da densidade de estômatos por milímetros quadrados de *Corymbia maculata* em relação ao uso de membranas porosas, concentrações de cloro e regulador de crescimento.

Cloro (%)	Sem Membrana		Uma membrana		Três membranas	
	ANA (mg L <sup>-1</sup> )		ANA (mg L <sup>-1</sup> )		ANA (mg L <sup>-1</sup> )	
	0,5	1,00	0,5	1,00	0,5	1,00
0,000	103,48±5,31Bb	183,96±11,95Aa	152,53±9,32Aa	37,56±3,07Bc	173,23±18,98ABa	121,80±12,17Ab
0,001	279,77±18,31Aa	154,83±4,26BBa	51,36±5,03Ab	63,62±4,66Ab	191,62±7,55Aa	202,35±28,75Aa
0,003	23,76±0,77Bc	154,83±11,44ABa	9,97±2,03Bc	185,49±4,06Aa	6,13±2,76Bc	104,24±15,39Ab
0,005	6,13±0,77Bc	123,40±6,13Ab	19,16±5,36Ac	19,16±4,66Ac	18,84±4,66Bc	11,50±3,51Bc

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 ± desvio padrão. Fonte: Do autor (2020).

## APÊNDICE E. Valores médios dos parâmetros oxidação e vigor durante a fase de alongamento

**Tabela 10.** Valores médios de oxidação e vigor do explante de *Corymbia maculata* em relação às escalas de notas adotadas.

Tratamentos	OXI (%)				VIG (%)			
	Escala de Notas				Escala de Notas			
	0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	75-100
SM x 0,000 CL x 0,5 ANA	25,00±16,37	37,50±18,30	37,50±18,30	0,00±0,00	0,00±0,00	25,00±16,37	37,50±18,30	37,50±18,30
SM x 0,000 CL x 1,0 ANA	0,00±0,00	50,00±18,90	50,00±18,90	0,00±0,00	0,00±0,00	62,50±18,30	37,50±18,30	0,00±0,00
SM x 0,001 CL x 0,5 ANA	50,00±18,90	50,00±18,90	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	62,50±18,30	37,50±18,30	0,00±0,00
SM x 0,001 CL x 1,0 ANA	0,00±0,00	50,00±18,90	50,00±18,90	0,00±0,00	50,00±18,90	0,00±0,00	50,00±18,90	0,00±0,00
SM x 0,003 CL x 0,5 ANA	0,00±0,00	50,00±18,90	50,00±18,90	0,00±0,00	12,50±12,50	25,00±16,37	50,00±18,90	12,50±12,50
SM x 0,003 CL x 1,0 ANA	50,00±18,90	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	25,00±16,37	62,50±18,30	12,50±12,50
SM x 0,005 CL x 0,5 ANA	0,00±0,00	50,00±18,90	50,00±18,90	0,00±0,00	0,00±0,00	62,50±18,30	37,50±18,30	0,00±0,00
SM x 0,005 CL x 1,0 ANA	0,00±0,00	50,00±18,90	50,00±18,90	0,00±0,00	0,00±0,00	75,00±0,00	25,00±0,00	0,00±0,00
1M x 0,005 CL x 1,0 ANA	0,00±0,00	50,00±18,90	50,00±18,90	0,00±0,00	0,00±0,00	50,00±18,90	50,00±18,90	0,00±0,00
1M x 0,000 CL x 0,5 ANA	12,50±12,50	50,00±18,90	37,50±18,30	0,00±0,00	0,00±0,00	62,50±18,30	37,50±18,30	0,00±0,00
1M x 0,000 CL x 1,0 ANA	50,00±18,90	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	12,50±12,50	50,00±18,90	37,50±18,30	0,00±0,00
1M x 0,001 CL x 0,5 ANA	0,00±0,00	0,00±0,00	50,00±18,90	50,00±18,90	0,00±0,00	0,00±0,00	50,00±18,90	50,00±18,90
1M x 0,001 CL x 1,0 ANA	50,00±18,90	50,00±18,90	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	37,50±18,30	62,50±18,30
1M x 0,003 CL x 0,5 ANA	0,00±0,00	50,00±18,90	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
1M x 0,003 CL x 1,0 ANA	50,00±18,90	50,00±18,90	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
1M x 0,005 CL x 0,5 ANA	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	87,50±12,50	12,50±12,50	0,00±0,00
1M x 0,005 CL x 1,0 ANA	0,00±0,00	50,00±18,90	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00
3M x 0,000 CL x 0,5 ANA	0,00±0,00	50,00±18,90	0,00±0,00	50,00±18,90	0,00±0,00	50,00±18,90	50,00±18,90	0,00±0,00
3M x 0,000 CL x 1,0 ANA	50,00±18,90	50,00±18,90	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
3M x 0,001 CL x 0,5 ANA	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
3M x 0,001 CL x 1,0 ANA	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
3M x 0,003 CL x 0,5 ANA	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00
3M x 0,003 CL x 1,0 ANA	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	50,00±18,90	50,00±18,90	0,00±0,00
3M x 0,005 CL x 0,5 ANA	50,00±18,90	50,00±18,90	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
3M x 0,005 CL x 1,0 ANA	0,00±0,00	0,00±0,00	50,00±18,90	0,00±0,00	87,50±12,50	12,50±12,50	0,00±0,00	0,00±0,00

OXI = Oxidação observada nos explantes. VIG = Vigor apresentado pelos explantes. 1M = Uma membrana porosa. 3M = Três membranas porosas. SM = Ausência de membrana porosa. CL = concentrações de cloro. ANA = concentrações de regulador de crescimento (ANA mg/L<sup>-1</sup>). Fonte: Do autor (2020).



**APÊNDICE F.** Tabela de análise de variância dos parâmetros pigmentos fotossintéticos

**Tabela 11.** Resumo da análise de variância do conteúdo de pigmentos de *Corymbia maculata* cultivada *in vitro* em relação ao uso de membranas, concentrações de cloro e regulador de crescimento.

Causas de Variação	GL	Quadrados Médios				
		Clorofila a (mg mg <sup>-1</sup> )	Clorofila b (mg mg <sup>-1</sup> )	Carotenóides (mg mg <sup>-1</sup> )	Total (mg mg <sup>-1</sup> )	a/b (mg mg <sup>-1</sup> )
Cloro	3	0,2222 <sup>NS</sup>	1,5491*	6,0807 <sup>NS</sup>	0,6515 <sup>NS</sup>	1,3664 <sup>NS</sup>
ANA	1	2,1201 <sup>NS</sup>	0,0156 <sup>NS</sup>	19,4233 <sup>NS</sup>	1,2080 <sup>NS</sup>	2,0847 <sup>NS</sup>
Membranas	2	0,4128 <sup>NS</sup>	0,5694 <sup>NS</sup>	15,8389 <sup>NS</sup>	1,1461 <sup>NS</sup>	0,1916 <sup>NS</sup>
Cloro x ANA	3	1,0746 <sup>NS</sup>	0,1010 <sup>NS</sup>	11,7575 <sup>NS</sup>	0,5808 <sup>NS</sup>	0,6399 <sup>NS</sup>
Cloro x Membrana	6	1,2427 <sup>NS</sup>	0,2509 <sup>NS</sup>	4,4697 <sup>NS</sup>	0,6787 <sup>NS</sup>	0,6399 <sup>NS</sup>
ANA x Membrana	2	0,0627 <sup>NS</sup>	1,0553 <sup>NS</sup>	0,2729 <sup>NS</sup>	0,8818 <sup>NS</sup>	0,8574 <sup>NS</sup>
Cloro x ANA x Membrana	6	1,1499 <sup>NS</sup>	1,3817**	4,5116 <sup>NS</sup>	2,6814**	0,8335 <sup>NS</sup>
Residue	48	0,600	0,5084	2,2580	0,7593	0,2304
Média	-	4,97	4,08	5,70	6,44	3,93
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	15,59	17,45	26,35	13,52	20,61

<sup>NS</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. \* e \*\* valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. GL = graus de liberdade. CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental. Fonte: Do autor (2020).

**APÊNDICE G.** Valores médios dos parâmetros pigmentos fotossintéticos

**Tabela 12.** Valores médios de clorofila b ( $\text{mg mg}^{-1}$ ) de *Corymbia maculata* em relação ao uso de membranas porosas, concentrações de cloro e regulador de crescimento.

Cloro (%)	Sem Membrana		Uma membrana		Três membranas	
	ANA ( $\text{mg L}^{-1}$ )		ANA ( $\text{mg L}^{-1}$ )		ANA ( $\text{mg L}^{-1}$ )	
	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0
0,000	21,24±3,74Aa	14,34±5,33Aa	13,43±9,17Ba	33,43±5,33Aa	21,92±1,34Aa	18,02±2,77Aa
0,001	14,83±2,60Aa	11,07±2,83Aa	19,95±4,67Aa	15,29±0,56Ab	10,56±0,36Ab	15,23±2,63Aa
0,003	13,44±3,41Aa	16,42±4,06Aa	14,86±3,80Aa	19,05±3,90Ab	18,72±1,17Aa	13,23±1,10Aa
0,005	20,41±4,19Aa	17,22±2,07Aa	18,01±4,33Aa	16,74±2,66Ab	17,16±2,81ABa	20,37±4,33Aa

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  $\pm$  desvio padrão.

**Tabela 13.** Valores das médias de pigmentos totais ( $\text{mg mg}^{-1}$ ) de *Corymbia maculata* em relação ao uso de membranas porosas, concentrações de cloro e regulador de crescimento.

Cloro (%)	Sem Membrana		Uma membrana		Três membranas	
	ANA ( $\text{mg L}^{-1}$ )		ANA ( $\text{mg L}^{-1}$ )		ANA ( $\text{mg L}^{-1}$ )	
	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0
0,000	54,74±10,51Aa	33,09±6,14Ba	30,71±4,56Ba	59,86±13,75Aa	50,55±2,24Aa	36,15±8,59Ab
0,001	33,65±5,26Ab	35,19±5,70Aa	54,62±11,16Aa	44,87±0,90Aa	30,01±6,78Ab	44,29±7,50Aba
0,003	30,87±2,68Ab	42,23±4,66Aa	35,46±9,59Aa	44,98±4,82Aa	47,32±1,19Aa	40,38±3,23Aba
0,005	40,56±5,64ABa	43,54±2,69Aa	43,12±6,75Aa	47,89±6,44Aa	39,01±1,86Ba	55,64±4,30Aa

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  $\pm$  desvio padrão. Fonte: Do autor (2020).

**APÊNDICE H.** Tabela de análise de variância dos parâmetros de enraizamento.

**Tabela 14.** Resumo da análise de variância do percentual de enraizamento, número de brotos e comprimento dos brotos (>0,5 cm) de *Corymbia maculata* cultivado *in vitro* em relação ao tempo de exposição ao regulador, presença de carvão ativado e luminosidade.

Causas de Variação	GL	Quadrados Médios	
		ENR (%)	COM (cm)
Tempo	2	3,9681**	0,0532 <sup>NS</sup>
Resíduo Tempo	27	0,3211 <sup>NS</sup>	0,0431 <sup>NS</sup>
Carvão	1	11,5341**	2,298**
Luminosidade	1	0,0286 <sup>NS</sup>	4,48**
Tempo x Carvão	2	3,2001**	0,0652 <sup>NS</sup>
Tempo x Luminosidade	2	2,0665**	0,0602 <sup>NS</sup>
Carvão x Luminosidade	1	0,7835 <sup>NS</sup>	0,1722*
Tempo x Carvão x Luminosidade	2	1,6785*	0,0561 <sup>NS</sup>
Resíduo	81	0,3514	0,0357
Média	-	5,08	3,12
CV <sub>exp.</sub> (%)	-	36,49	10,87

<sup>NS</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. \* e \*\* valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. GL = graus de liberdade. CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental. ENR = percentual de enraizamento dos explantes. COM = comprimento das microestacas (>0,5 cm) por explante. Fonte: Do autor (2020).

**APÊNDICE I.** Valores médios dos parâmetros do enraizamento

**Tabela 15.** Valores médios do percentual de enraizamento de *Corymbia maculata* em relação ao tempo de exposição ao regulador, presença de carvão ativado e luminosidade.

Tempo de Exposição ao AIB	Carvão (100 mg L <sup>-1</sup> )		Ausência Carvão	
	Luminosidade		Luminosidade	
	Presença	Ausência	Presença	Ausência
0	0,00±0,00Aa	2,50±2,50Aa	10,50±5,24Aa	0,00±0,00Ab
24	0,00±0,00Aa	0,00±0,00Aa	7,50±3,82Aa	0,00±0,00Bb
48	0,00±0,00Aa	2,50±2,50Aa	10,50±3,68Ba	27,50±5,83Aa

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 ± desvio padrão.

**Tabela 16.** Valores médios de comprimento das microestacas (>0,5 cm) por explante de *Corymbia maculata* em relação ao tempo de exposição ao regulador, presença de carvão ativado e luminosidade.

Tempo de Exposição ao AIB	Carvão (100 mg L <sup>-1</sup> )		Ausência Carvão	
	Luminosidade		Luminosidade	
	Presença	Ausência	Presença	Ausência
0	1,94±0,08Bb	2,96±0,09Ab	3,02±0,09Ba	4,37±0,32Aa
24	1,70±0,09Bb	3,23±0,13Ab	3,10±0,07Ba	3,96±0,19Aa
48	1,70±0,09Bb	3,81±0,11Aa	2,80±0,09Ba	4,47±0,61Aa

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 ± desvio padrão. Fonte: Do autor (2020).

**APÊNDICE J.** Valores médios dos parâmetros oxidação e vigor durante a fase de enraizamento

**Tabela 17.** Valores médios de oxidação e vigor do explante de *Corymbia maculata* em relação às escalas de notas adotadas.

Tratamento	OXI (%)				VIG (%)			
	Escala de Notas				Escala de Notas			
	0-25	25-50	50-75	75-100	0-25	25-50	50-75	75-100
0h x SC x SL	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
0h x SC x PL	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	70,00±15,27	30,00±15,27	0,00±0,00	0,00±0,00
0h x PC x SL	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	40,00±16,33	0,00±0,00	40,00±16,33	20,00±13,33
0h x PC x PL	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
24h x SC x SL	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
24h x SC x PL	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
24h x PC x SL	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	30,00±15,27	40,00±16,33	30,00±15,27	0,00±0,00
24h x PC x PL	30,00±15,27	70,00±15,27	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
48h x SC x SL	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	80,00±13,33	20,00±13,33	0,00±0,00
48h x SC x PL	50,00±16,67	50,00±16,67	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
48h x PC x SL	60,00±16,33	40,00±16,33	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
48h x PC x PL	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

OXI = Oxidação observada nos explantes. VIG = Vigor apresentado pelos explantes. h = Horas de exposição ao regulador. SC = Ausência Carvão. PC = Presença de Carvão. SL = Ausência de luminosidade. PL = Presença de luminosidade. Fonte: Do autor (2020).