



LARA BEATRIZ OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA ORGANOGÊNESE
IN VITRO DE *Eucalyptus urophylla* E *Eucalyptus grandis***

LAVRAS – MG

2025

LARA BEATRIZ OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE
Eucalyptus urophylla E *Eucalyptus grandis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

Dr(a). Marlúcia Souza Pádua
Coorientadora

Dr(a). Giovana Esteves
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2025**

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

Oliveira, Lara Beatriz.
caracterização histológica da organogênese in vitro de *Eucalyptus urophylla* e
Eucalyptus grandis / Lara Beatriz Oliveira. - 2025.
78 p. : il.

Orientador: Luciano Vilela Paiva
Coorientadora: Marlúcia Souza Pádua
Coorientadora: Giovana Esteves

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2025.
Bibliografia.

1. Eucalipto. 2. Organogênese indireta. 3. TDZ. 4. Brotações. 5. Histologia. I.
Paiva, Luciano Vilela. II. Pádua, Marlúcia Souza. III. Esteves, Giovana. IV.
Universidade Federal de Lavras. V. Título.

LARA BEATRIZ OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DA ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE
Eucalyptus urophylla E *Eucalyptus grandis***

**HISTOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *IN VITRO* ORGANOGENESIS OF
Eucalyptus urophylla AND *Eucalyptus grandis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de setembro de 2025

Dr (a). TÁCILA RAYENE DOS SANTOS MARINHO - UFLA

Dr (a). CAROLINE DE OLIVEIRA TIMOTEO - UFLA

Dr. LUCIANO VILELA PAIVA - UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

**LAVRAS – MG
2025**

A minha família que sempre me apoiou, em especial a minha avó
Maria de Lurdes, cuja maior alegria era a minha formação,
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, meus pais que sempre me incentivaram e apoiaram meus estudos.

A minha querida avó que sempre me falava da importância de se estudar e aprender uma profissão, para que eu fosse uma pessoa independente e capaz de conquistar todos os meus objetivos.

As pessoas que fazem parte do Laboratório Central de Biologia molecular (LCBM) da UFLA. Essas pessoas sempre foram muito solícitas e sempre me ajudaram a resolver qualquer problema que surgia durante a minha pesquisa.

As minhas Co-orientadoras Marlúcia e Giovana, que me orientaram e me ensinaram muito durante o tempo do meu mestrado.

Ao meu orientador Luciano, que além dos conhecimentos teóricos e práticos do laboratório, também me deu conselhos muito importantes para a vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, agradeço pelo apoio e suporte acadêmico.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

O eucalipto, espécie originária da Austrália, possui grande valor comercial para as indústrias de papel e celulose, carvão e energia, para as indústrias farmacêuticas e de cosméticos. O Brasil é o maior exportador de papel e celulose, sendo o eucalipto a cultura mais cultivada dentro da silvicultura brasileira, ocupando 77% da área plantada. Métodos de propagação e cultivo *in vitro* são empregados em laboratório com a finalidade de se desenvolver mudas de eucalipto com as características desejáveis de resistência e produtividade. Dentre tais metodologias, a calogênese e a regeneração são empregadas como um meio de se obter tais mudas, por meio do uso adequado de reguladores de crescimento vegetal. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a origem das brotações em calos de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*, durante a etapa de regeneração, induzidos a partir do uso de diferentes concentrações do regulador de crescimento vegetal Thidiazuron (TDZ). Foi estabelecida uma cultura de calos a partir de explantes de folhas, cotilédones e ápices retirados de plantas oriundas de sementes com seis semanas de germinação. Após 30 dias de calogênese, os calos foram colocados para regenerar. Cortes histológicos foram feitos em calos de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*, que tinham dois meses de regeneração. Como resultados, *Eucalyptus grandis* foi o genótipo mais responsivo, pois apresentou um número maior de brotações. A concentração de TDZ mais eficiente foi de 0,025 mg/L para *Eucalyptus grandis* e 0,025 mg/L e 0,050 mg/L para *Eucalyptus urophylla*. O ápice foi o melhor tipo de explante utilizado nesse experimento, pois apresentou uma melhor regeneração do que os demais. Análises das imagens dos cortes histológicos mostraram que, à medida que avançávamos nos cortes, foi possível visualizar a origem das brotações. Conclui-se que as brotações presentes nos calos das duas espécies de eucalipto surgiram a partir de células próximas aos sistemas condutores do explante original, onde feixes vasculares jovens se dispõem junto aos maduros, fornecendo suporte estrutural e sinalização local que favorecem a regeneração. Esses resultados geraram informações úteis sobre como as escolhas do genótipo, do tipo de explante e da concentração de reguladores de crescimento influenciam as etapas de calogênese e a regeneração de brotos em eucaliptos. As análises histológicas mostraram a localização da origem das brotações, informação bastante importante para protocolos subsequentes de transformação genética.

Palavras-chave: eucalipto; organogênese indireta; TDZ; brotações; histologia.

ABSTRACT

Eucalyptus, a species native to Australia, has great commercial value for the pulp and paper, coal, and energy industries, as well as for the pharmaceutical and cosmetics industries. Brazil is the largest exporter of pulp and paper, and eucalyptus is the most widely cultivated crop in Brazilian forestry, occupying 77% of the planted area. In vitro propagation and cultivation methods are used in laboratories to develop eucalyptus seedlings with the desired resistance and productivity characteristics. Among these methodologies, callogenesis and regeneration are employed as a means of obtaining such seedlings through the appropriate use of plant growth regulators. Therefore, the objective of this study was to evaluate the origin of callus shoots in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* during the regeneration stage, induced by the use of different concentrations of the plant growth regulator Thidiazuron (TDZ). A callus culture was established from leaf, cotyledon, and apex explants taken from plants grown from seeds six weeks after germination. After 30 days of callus formation, the calli were allowed to regenerate. Histological sections were taken from calli of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla*, which had two months of regeneration. *Eucalyptus grandis* was the most responsive genotype, presenting the highest number of shoots. The most effective TDZ concentration was 0.025 mg/L for *Eucalyptus grandis* and 0.025 mg/L and 0.050 mg/L for *Eucalyptus urophylla*. The apex was the best explant type used in this experiment, as it presented better regeneration than the others. Analysis of the histological section images showed that, as the sections progressed, the origin of the shoots became visible. It is concluded that the shoots present in the callus of both eucalyptus species arose from cells close to the conduction systems of the original explant, where young vascular bundles are located close to mature ones, providing structural support and local signaling that favor regeneration. These results yielded useful information on how choices of genotype, explant type, and growth regulator concentration influence the callus formation and shoot regeneration stages in eucalyptus. Histological analyses revealed the location of the shoots' origin, crucial information for subsequent genetic transformation protocols.

Keywords: eucalyptus; indirect organogenesis; TDZ; shoots; histology.

INDICADORES DE IMPACTOS

O presente trabalho apresenta impactos tecnológicos e ambientais, com possíveis desdobramentos econômicos e sociais, ao contribuir para o aperfeiçoamento de protocolos de regeneração *in vitro* em espécies de eucalipto de importância comercial. Os resultados obtidos permitem o avanço de metodologias de propagação vegetal com maior eficiência e precisão, o que favorece o desenvolvimento de mudanças genéticas direcionadas em futuros estudos, contribuindo para a produção de mudas mais adaptadas, produtivas e resistentes, especialmente em relação as mudanças climáticas. Ainda que o trabalho tenha sido realizado em ambiente laboratorial, os conhecimentos gerados possuem um potencial bem mais amplo no médio e longo prazo, sobretudo junto a empresas de melhoramento florestal, viveiros comerciais e produtores rurais, os quais poderão se beneficiar de tecnologias mais eficazes para clonagem e melhoramento genético de eucalipto. O território potencialmente impactado inclui regiões de cultivo de eucalipto no Brasil, especialmente Minas Gerais, estado com forte atividade de silvicultura, além de outros polos de produção de papel, celulose e carvão vegetal. O trabalho não contou diretamente com a participação de comunidades externas à UFLA ou ações extensionistas com público-alvo definido durante sua execução, mas o conhecimento produzido possui relevância prática e aplicabilidade potencial em cadeias produtivas estratégicas. Os impactos se inserem principalmente na área temática 7 – Tecnologia e Produção, com interface com a área 5 – Meio Ambiente, uma vez que promovem inovação na produção vegetal com menor dependência de recursos naturais e maior sustentabilidade. Por fim, o trabalho está alinhado aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, sendo a primeira delas a ODS 9 – Indústria, Inovação e Infraestrutura, por fomentar o desenvolvimento tecnológico na biotecnologia vegetal, a ODS 12 – Consumo e Produção Responsáveis, ao permitir práticas de cultivo mais eficientes e menos impactantes, a ODS 13 – Ação contra a Mudança Global do Clima, ao apoiar, indiretamente, o desenvolvimento de variedades mais adaptadas e, por fim, a ODS 15 – Vida Terrestre, ao contribuir para práticas sustentáveis na silvicultura e conservação de ecossistemas florestais.

IMPACT INDICATORS

This work presents technological and environmental impacts, with potential economic and social implications, by contributing to the improvement of in vitro regeneration protocols in commercially important eucalyptus species. The results obtained allow for the advancement of plant propagation methodologies with greater efficiency and precision, which favors the development of targeted genetic modifications in future studies, contributing to the production of more adapted, productive, and resilient seedlings, especially in relation to climate change. Although the work was conducted in a laboratory environment, the knowledge generated has much broader potential in the medium and long term, especially for forestry improvement companies, commercial nurseries, and rural producers, who could benefit from more effective technologies for cloning and genetic improvement of eucalyptus. The potentially impacted territory includes eucalyptus-growing regions in Brazil, especially Minas Gerais, a state with strong forestry activity, as well as other centers of paper, pulp, and charcoal production. The project did not directly involve communities outside UFLA or extension activities with a defined target audience during its implementation, but the knowledge produced has practical relevance and potential applicability in strategic production chains. The impacts fall primarily within thematic area 7 – Technology and Production, interfacing with area 5 – Environment, as they promote innovation in plant production with reduced dependence on natural resources and greater sustainability. Finally, the project is aligned with the UN Sustainable Development Goals (SDGs), the first of which is SDG 9 – Industry, Innovation, and Infrastructure, by fostering technological development in plant biotechnology; SDG 12 – Responsible Consumption and Production, by enabling more efficient and less impactful cultivation practices; SDG 13 – Climate Action, by indirectly supporting the development of more adapted varieties; and, finally, SDG 15 – Life on Land, by contributing to sustainable practices in forestry and conservation of forest ecosystems.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	<i>Eucalipto spp.</i> e importância econômica	12
2.2	Importância na Biotecnologia Vegetal.....	15
2.3	Cultura de tecidos de <i>Eucalipto spp.</i>	16
2.3.1	Cultura de calos	22
2.3.2	Calogênese induzida por TDZ.....	24
2.4	Histologia de calos	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo Geral.....	29
3.2	Objetivos Específicos	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Desinfestação e germinação das sementes de Eucalipto	29
4.2	Calogênese	30
4.3	Regeneração dos calos de eucalipto	31
4.4	Histologia em resina	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1	Calogênese	34
5.2	Regeneração	41
5.3	Histologia.....	44
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXO A – CONCENTRAÇÕES DOS MEIOS DE CULTURA	67

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus*, originário da Austrália, representa uma das principais fontes de matéria-prima para a silvicultura brasileira, destacando-se especialmente na produção de celulose, papel, madeira serrada e biomassa (LONGUE JÚNIOR,2013; SALEHI et. al, 2019; IBÁ,2024). Entre as espécies mais cultivadas no país, *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis* possuem uma rápida taxa de crescimento e a capacidade de se adaptar a diferentes condições climáticas (BANDARA et. al,2017; DLAMINI et al., 2017). Entretanto, a propagação convencional dessas espécies enfrenta desafios relacionados à sanidade vegetal e baixa taxa de multiplicação, o que tem impulsionado a utilização de técnicas mais eficientes, como a cultura de tecidos (SHARMA et. al,2023).

A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta biotecnológica amplamente empregada para a multiplicação clonal, conservação de germoplasma e melhoramento genético (KENDURKAR et. al,2018; EL-ESAWI,2016). Dentro desse contexto, a calogênese, que é formação de calos a partir de tecidos vegetais, representa uma das etapas empregadas para a regeneração de plantas *in vitro*, especialmente quando associada a protocolos de organogênese indireta. A eficiência desse processo está diretamente relacionada a fatores como o genótipo da planta e a composição do meio de cultura, e é influenciada principalmente pela presença de reguladores de crescimento vegetal, como as citocininas (EFFERTH, 2019).

O Thidiazuron (TDZ) é uma citocinina sintética que tem se mostrado altamente eficaz na indução de calos em diversas espécies vegetais, incluindo o eucalipto (SHARMA et. al, 2014). No entanto, a resposta morfogênica pode variar consideravelmente entre diferentes concentrações de TDZ e entre genótipos, o que reforça a necessidade de estudos mais específicos com foco em padronizar protocolos que sejam eficientes e reprodutíveis (SAEED et. al, 2022; PAI et. al, 2018).

Diante desse contexto, esta dissertação teve como objetivo avaliar a influência do genótipo (*Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*) e de diferentes concentrações de TDZ no estabelecimento de um protocolo de calogênese eficiente, visando maximizar a regeneração de brotos. Além disso, a análise histológica dos calos permitirá testar a hipótese referente a origem das brotações, se estas seriam advindas de células mais superficiais da massa calosa ou mais internas. Dessa forma, os resultados obtidos não apenas ampliam a compreensão anatômica do processo regenerativo, mas também oferecem subsídios práticos para a

otimização de protocolos de micropropagação e transformação genética, com aplicações diretas na silvicultura de eucaliptos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Eucalipto spp.* e importância econômica

O *Eucalyptus* é um gênero composto por espécies arbóreas originárias do continente australiano, tal gênero foi primeiramente descrito em 1788 pelo botânico francês Charles Louis L'Héritier de Brutelle (LONGUE JÚNIOR,2013). Em 1792, o eucalipto foi introduzido na Europa, tornando-se a espécie mais cultivada até o século XIX (POTTS,2004). Sendo a planta de crescimento rápido mais valiosa no mundo, o gênero *Eucalyptus* é composto por mais de 900 espécies e seus híbridos, pertencentes a família *Myrtaceae* (BYRNE, 2008).

Desde sua descoberta até os dias atuais, o eucalipto tem sido fonte de matéria-prima para os mais variados tipos de indústrias, sua madeira é utilizada nas fábricas de papel e celulose, assim como seu carvão vegetal serve de combustível para siderúrgicas. Além da madeira, o eucalipto também é considerado uma planta medicinal e aromática, utilizado na indústria farmacêutica e de cosméticos, pelos óleos essenciais extraídos de suas folhas (SALEHI et. al,2019). Espécie nativa da Austrália, o *Eucalyptus grandis* cresce rapidamente com árvores eretas, que chegam até 50 metros de altura com um DAP (diâmetro a altura do peito) de 1,2 a 2 metros. Sua madeira caracterizada macia, é formada por fibras sem curvaturas o tornando matéria prima adequada para a confecção de polpas, chapas artificiais, suporte de minas, produção de lenhas, além de ser empregado em programas de paisagismo (BANDARA et. al,2017). Oriundo de arquipélagos da Indonésia, o *Eucalyptus urophylla*, possui árvores perenes que atingem os 60 metros de altura e um DAP de 2 metros, sendo utilizado na indústria madeireira para a produção de chapas artificiais e polpa (DLAMINI et al., 2017).

No Brasil em 1904, o pesquisador Edmundo Navarro de Andrade, foi o cientista responsável por estudar e cultivar as primeiras plantações de eucaliptos, que eram utilizadas pelo setor ferroviário, como combustível para as caldeiras de máquinas a vapor e como moirões para a construção de cercas em propriedades rurais (MARTINI,2004). Os trabalhos do pesquisador Edmundo Navarro de Andrade, foram os responsáveis pela chegada no Brasil de uma ampla gama de espécies de eucalipto, o que culminou na formação de um dos maiores bancos de germoplasma brasileiro localizado no estado de São Paulo (FERREIRA et. al, 1997). Entre as décadas de 1970 e 1980, os eucaliptos cultivados no território brasileiro se tornaram

fonte de matéria-prima para as indústrias de papel e celulose, carvão vegetal e energia, além da produção de madeira maciça e madeira industrializada (ASSIS, 2000). Anos mais tarde com a crescente procura do mercado por novos produtos derivados da madeira, as empresas do setor florestal precisaram diversificar, para além da produção de celulose e energia, com a produção de bioprodutos como combustíveis e géis (SOARES, 2003).

Dentre as principais vantagens do território brasileiro para a alta produtividade florestal, o destaque é o clima tropical e subtropical que domina no país, tal clima gera um crescimento quase constante das plantas de eucalipto resultando em significativo acúmulo de biomassa. Além do clima, análises de solo e a criação de programas de melhoramento genético, também contribuíram para ampliar a indústria florestal brasileira (Associação Brasileira de Celulose e Papel, 2012; Valverde, 2012). Nessa época, as espécies de eucalipto mais cultivadas eram *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus saligna*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus viminalis*, *Eucalyptus dunnii*, *Eucalyptus pellita* e seus híbridos (LONGUE JÚNIOR,2013).

Cobrindo a maior parte da área total de florestas plantadas no Brasil, as plantações de eucalipto ocupam um total de 77% da área plantada, sendo a espécie mais cultivada, seguida por pinus com 19% e as demais espécies com 4%. A silvicultura brasileira em 2021, obteve uma produção de aproximadamente US\$ 17,1 bilhões, o que representa 7,3% da produção total (IBGE, 2021). De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2021), o Brasil é o maior exportador mundial de papel e celulose, exportando 16,4 bilhões de toneladas. Como produtor, o Brasil fica atrás apenas dos Estados Unidos que produziu em 2021 49,7 milhões de toneladas, enquanto o Brasil produziu 23,1 milhões de toneladas no mesmo ano (KIMURA et. al,2025).

Segundo o relatório da Indústria Brasileira de Árvores (Ibá) de 2024, o setor florestal brasileiro tem mais de 10 milhões de hectares de árvores plantadas, um crescimento de 3% em relação ao ano de 2023, tal crescimento gera uma demanda maior por mão de obra especializada em manejo florestal, o que não é de fácil acesso em algumas regiões brasileiras, fazendo com que investimentos em mecanização sejam de suma importância para se consiga atingir os níveis de qualidade e produtividade necessários a silvicultura brasileira (IPEF,2025). As florestas do setor florestal brasileiro têm um caráter de sustentabilidade e preservação ambiental, pois utiliza áreas devastadas pela ação humana para a plantação das florestas cultivadas e, ainda adota um método de plantio, denominado plantio em mosaico, onde as árvores cultivadas dividem espaço com plantas nativas da região a fim de preservar a paisagem natural, sendo 6,91 milhões de

hectares de florestas naturais, que sequestram da atmosfera 4,92 bilhões de toneladas de CO₂ (IBÁ,2024). Impactos ambientais, tais como as mudanças climáticas, tem feito com que as indústrias florestais busquem por novas estratégias para o cumprimento das metas climáticas estabelecidas pela ONU, dentre elas destaque-se a geração de créditos de carbono, a busca por estratégias de recuperação de áreas degradadas e a preservação dos recursos hídricos (STAC,2025).

A silvicultura brasileira arrecadou US\$ 10,6 bilhões em celulose para exportação, sendo o Brasil o maior exportador de celulose no mundo exportando mais de 19,7 milhões de toneladas (SIQUEIRA et. al, 2025). São cerca de 1,8 milhões de árvores plantadas por dia, oferecendo matéria prima para os mais variados setores como os de papel e celulose, madeiras, embalagens, pisos laminados, produtos para a geração bioenergética, para as indústrias de cosméticos, farmacêuticas, alimentícias e têxteis (IBGE,2019). Os resíduos gerados pelas indústrias da silvicultura são o licor preto, serragem, lama de cal, resíduos florestais (galhos, cascas e folhas) e cinzas de caldeira, dos quais 645 toneladas são destinadas para o setor de bioenergia, o restante sendo reciclado ou reutilizado pelas fabricas de madeira (IBÁ,2024). A transição para materiais renováveis, como o uso da madeira para a fabricação de biocombustíveis, bioplásticos, embalagens biodegradáveis e fibras têxteis tem integrado a cadeia de produtos florestais brasileiros (STAC,2025).

Dentro dos 10 milhões de hectares de árvores plantadas em território brasileiro, as plantações de eucalipto compõem 7,8 milhões de hectares, um total de 77% da área plantada no Brasil (IBÁ, 2024). Os principais estados dedicados aos plantios florestais são Minas Gerais com 2.200.351 hectares de eucalipto e R\$ 8,5 bilhões em produção, seguido por Mato Grosso do Sul com 1.329.132 hectares de eucalipto, São Paulo com 997.543 hectares de eucalipto, Paraná com 438.721 hectares de eucalipto e Santa Catarina com 326.134 hectares de eucalipto (SIQUEIRA et. al, 2025). A produtividade do eucalipto brasileiro com 7,2 anos de idade é de 33,7 m³/ha/ano (com casca), na qual o estado mais produtivo gerou 41,1 m³/ha/ano e o menos produtivo cerca de 20 m³/ha/ano (IBÁ, 2024). Segundo a Agência Brasileira de Promoção de Exportações (Apex), estima-se que o Brasil tenha a capacidade de expandir a área florestal plantada em até 40% nos próximos anos, porém tal expansão deve ser feita com responsabilidade ambiental (STAC,2025).

Quanto ao setor de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I), R\$ 122 milhões foram investidos em 2023 pelas empresas de silvicultura em projetos científicos, que tinham por objetivos, a otimização dos processos da indústria florestal (30%) que abrange boas práticas

para o manejo do solo, testes para novas matérias primas e melhorias no setor energético, o melhoramento de processos de produção e criação de novos produtos (27%) visando novos mercados para os bioprodutos, a busca por novas tecnologias (20%) como mecanização, automação e a implementação de softwares eficientes, programas de melhoramento genético (9%) para a obtenção de clones melhorados e métodos de propagação eficazes (IBÁ,2024). Além de outros projetos de PD&I (14%), que visam questões como as mudanças climáticas e seus efeitos na produtividade florestal, o manejo sustentável de resíduos, visando diminuir os impactos negativos ao meio ambiente e também o setor de economia circular, e também investimentos voltados ao plantio de florestas nativas (ROLIM et. al,2020).

2.2 Importância na Biotecnologia Vegetal

O uso das ferramentas biotecnológicas aliadas aos programas de melhoramento genético tem tido grande impacto no setor florestal, com pesquisas que visam melhorar a qualidade dos produtos florestais e suprir as demandas das indústrias de madeira e de celulose (KENDURKAR et. al,2018). Algumas das ferramentas biotecnológicas que tem sido empregadas são: técnicas de engenharia genética, regeneração *in vitro* e o uso de marcadores moleculares, visando melhorar a qualidade da madeira produzida, acelerar o crescimento e desenvolvimento das árvores cultivadas e selecionar os genótipos mais promissores para o plantio florestal, ou seja, aqueles que apresentam melhor adaptabilidade ambiental e climática, resistência a pragas e também as mudanças climáticas (SHARMA et. al,2023).

A edição genômica utilizada no melhoramento de espécies florestais para a obtenção de características desejáveis vem sendo empregada com sucesso em algumas espécies arbóreas como *Pinus*, *Populus*, *Cryptomeria japonica* e *Picea glauca*, o que abre subsídios para a utilização dessas técnicas em outras espécies lenhosas, como o eucalipto (POOVAIAH et. al, 2021). Descobertas recentes de fatores de regulação relacionados com a regeneração de cultivares tem sido uteis para a elaboração de protocolos de transformação genética, que podem ser empregados em várias espécies arbóreas, independente do seu genótipo e das características de seu material vegetal (FENG et. al,2021).

Outro fator a ser levado em consideração relacionado ao melhoramento florestal é o longo período de duração desse melhoramento, pois as árvores, geralmente perenes, levam muitos anos até alcançarem a idade reprodutiva. Reguladores genéticos responsáveis pela transição da fase vegetativa para a reprodutiva já forma localizados em espécies de coníferas e angiospermas, fornecendo subsídios para estimular o rápido desenvolvimento reprodutivo em

outras espécies florestais de maior interesse (MA J et. al, 2022). Outra restrição do processo de reprodução tradicional é o longo período necessário para fazer a fenotipagem dos descendentes, pois nesse caso é necessário esperar que os indivíduos alcem a maturidade completa. Pesquisas genéticas focadas em reduzir esse tempo permitiriam um ganho não somente de tempo para a seleção dos fenótipos de interesse como também teria impacto econômico (HURMEKOSKI et. al,2018).

Dados experimentais de testes clonais juntamente com estudos teóricos, mostram que a silvicultura clonada é a solução mais efetiva para ampliar os avanços no melhoramento genético em larga escala. Embora existam riscos no que se refere a clonagem genética, como a disseminação de doenças graves e diminuição da variabilidade e biodiversidade, tais problemáticas não são tão graves quando aplicadas em cultivares, que possuem períodos de rotação mais curtos (WU, 2018). Recentemente, os programas de silvicultura clonada aplicados para o cultivo de árvores de crescimento rápido como o eucalipto, salgueiro e álamo, tem apresentado resultados promissores (SONG et. al,2018). Tais cultivares geralmente estão localizadas em terrenos férteis e planos, com o uso apropriado de fertilizantes específicos e um ciclo curto de rotação. Como se trata de plantas clonadas, essas culturas possuem taxa de crescimento regular, o que permite que a madeira extraída tenha propriedades físicas e químicas mais estáveis. Essas características fazem com que os produtos florestais derivados dessas culturas tenham uma qualidade uniforme, uma produtividade maior e uma melhor aceitação no mercado madeireiro, possibilitando um maior ganho econômico e competitivo no mercado global (SONG et. al,2018).

2.3 Cultura de tecidos de *Eucalipto spp.*

Nos programas de melhoramento convencionais, uma das formas de cultivo do eucalipto era por meio do plantio das sementes para a obtenção de mudas, porém tal metodologia era bastante demorada e dispendiosa, juntamente com os crescentes problemas com a carga genética das plantas (KENDURKAR et. al,2018). Com os avanços das pesquisas, surgiram as técnicas de cultivo *in vitro*, que proporcionaram um ambiente mais eficiente na propagação e conservação do germoplasma dos eucaliptos, sendo a micropropagação uma das técnicas mais promissoras, que usa dos conhecimentos de organogênese e embriogênese somática para a propagação de plantas (EL-ESAWI,2016).

Os primeiros experimentos envolvendo culturas de tecidos com eucalipto iniciaram entre as décadas de 1950 e 1960, porém os conhecimentos da época acerca do cultivo *in vitro*,

esterilização dos materiais e também dos nutrientes e hormônios necessários para um bom desenvolvimento das plantas eram fatores limitantes naquela época (LE ROUX et. al, 1991). Porém, foi entre as décadas de 1970 e 1980, que os pesquisadores australianos Dr. Griffin e Dr. Carron, conduziram estudos e obtiveram os primeiros protocolos eficientes para a propagação em grande escala de espécies de eucalipto, através da cultura de tecidos (KENDURKAR et. al,2018).

A partir de 1981, experimentos com espécies de *Eucalyptus polybractea*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus gomphocephala* e *Eucalyptus viminalis* obtiveram sucesso ao realizar a regeneração de plantas oriundas da indução de calos (DURAND-CRESSWELL et. al, 1982). A organogênese foi outra técnica bem-sucedida para a propagação do eucalipto, tal método consiste na utilização de partes das plantas de eucalipto como caules, raízes e folhas que são submetidos a um ambiente controlado e a um meio de cultura, que tenha todos os nutrientes e reguladores necessários para estimular os explantes a gerarem órgãos a partir desses tecidos extraídos das plantas (DE FOSSARD et. al, 1978). A indução de órgãos pode ser feita de maneira direta, denominada de organogênese direta, onde os órgãos são formados diretamente dos explantes ou, pelo processo de organogênese indireta, onde calos são induzidos e eles darão origem aos órgãos. Tanto os órgãos formados na organogênese direta quanto os calos da organogênese indireta são induzidos mediante o uso de reguladores de crescimento vegetal (ZHANG et. al,2022).

Tal fato teve grande impacto na indústria florestal, onde a cultura *in vitro* de eucalipto proporcionou a obtenção de mudas geneticamente idênticas e livres de patógenos para as florestas comerciais (TRIGIANO et. al,2010). Devido as melhorias obtidas através da cultura de tecidos, o cultivo *in vitro* vem sendo vastamente aplicado nos programas de melhoramento de eucalipto atuais, com o foco em aumentar as taxas de crescimento e produtividade, além de tentar obter plantas que sejam resistentes a doenças e com características geneticamente vantajosas (CASSELLS, 2012).

A propagação *in vitro* desempenha papel central na conservação genética de espécies de eucalipto de elevado valor econômico, além de contribuir para a preservação da biodiversidade e para práticas de manejo florestal sustentável (CASSELLS, 2012). O êxito da micropropagação depende, de forma decisiva, da manutenção de condições rigorosas de assepsia ao longo de todo o protocolo. Um aspecto essencial é a utilização de explantes livres de contaminação microbiana, uma vez que, por não serem totalmente estéreis, podem constituir importantes fontes de contaminação das culturas *in vitro* (TRIGIANO et. al,2010).

Explantes obtidos de plântulas provenientes de sementes são amplamente utilizados para estabelecer protocolos *in vitro*, sobretudo pela possibilidade de descontaminação prévia das sementes e pela juvenilidade do material, que aumenta a competência morfogênica (AL-AHMAD, 2020; JUI et. al,2023). Contudo, por derivarem de reprodução sexuada, esses explantes não asseguram fidelidade clonal ao genótipo de interesse; a variação decorre principalmente de segregação e recombinação genética, e não apenas de mutações (WENDLING et al., 2015).

Quando a prioridade é a fidelidade clonal, a cultura de gemas axilares/segmentos nodais é preferível, pois preserva a identidade genotípica e permite altas taxas de multiplicação em espécies lenhosas. Ápices caulinares (meristemas apicais) também podem gerar material fiel ao tipo e, em alguns casos, livre de patógenos; porém, o reduzido tamanho do tecido e a maior carga microbiana de materiais adultos exigem protocolos de assepsia e manejo antioxidante mais rigorosos, o que pode limitar seu uso rotineiro (WENDLING et al., 2015).

O ápice caulinar apresenta elevada totipotência, sendo capaz de originar diferentes tecidos vegetais e até regenerar uma planta completa. Essa capacidade está relacionada ao fato de suas células meristemáticas apresentarem baixo grau de diferenciação e alta atividade proliferativa, o que favorece a regeneração *in vitro* (MEKONEN et. al,2021). Por sua plasticidade, são muito usados na regeneração direta, o que diminui os riscos de mutações indesejadas que podem ocorrer em culturas de calos e que podem resultar em variação somaclonal (ISAH,2019). Além disso, os ápices possuem uma alta taxa de multiplicação e baixas taxas de contaminação, o que é ideal para o sucesso na micropropagação. Porém, os ápices de melhor qualidade exigem o uso de material vegetativo jovem, o que pode ser difícil de encontrar em plantas adultas (SHARMA et. al,2023).

Assim como os ápices, os cotilédones são extraídos de plantas jovens sendo ideias para estudos de embriogênese somática, pois possuem alto potencial embriogênico, fazendo com que um único explante de cotilédone seja capaz de formar muitas plantas. Entretanto, é necessário o uso de antioxidantes no meio de cultura que irá receber os explantes de cotilédones, pois estes são muito suscetíveis a oxidação e a necrose, e também apresentam dificuldade em se regenerar via organogênese (SHARMA et. al,2023). Podendo ser retiradas de plântulas ou plantas adultas, as folhas são de fácil obtenção e manipulação, além de apresentarem excelente resposta na organogênese indireta, porém possuem uma taxa de sucesso na regeneração inferior a 15% de brotações por explantes, além de seus explantes terem alto risco de variação somaclonal por passarem por uma cultura de calos (WANG et. al, 2024).

A micropropagação é uma técnica de cultivo *in vitro* utilizada para obter plantas geneticamente fiéis ao material de origem, com características de interesse científico e comercial (DEBERGH et al., 1991). O processo compreende cinco estágios principais: preparação do protocolo, obtenção de culturas viáveis e assépticas, multiplicação do material vegetal, propagação em larga escala e estabelecimento *ex vitro* ou conservação em bancos de germoplasma (DEBERGH et al., 1991). A assepsia dos explantes é realizada por lavagem em água corrente, seguida de imersão em álcool etílico (70%) ou agentes desinfetantes, como NaOCl, Ca (OCl)₂ ou HgCl₂, e finalizada com enxágue em água destilada estéril (KUPPUSAMY et al., 2019).

Os explantes são cultivados em meios ajustados às necessidades de cada espécie, incluindo nutrientes, reguladores de crescimento e condições ambientais. Após a formação dos brotos, procede-se à multiplicação e ao desenvolvimento radicular, preparando as plantas para o estabelecimento em campo ou para preservação em germoplasma (DEBERGH et al., 1991).

Inúmeros fatores impactam diretamente na micropropagação das plantas, sendo eles a concentração dos reguladores de crescimento principalmente auxinas e citocininas, que influenciam no crescimento e desenvolvimento das brotações, a quantidade de vitaminas e nutrientes disponíveis para os explantes, a existência de uma fonte de carbono adequada para fornecer energia as plantas, macro e micronutrientes, que são necessários ao metabolismo vegetal (ZHAO,2014; FRICK et. al,2018).

Além disso, é fundamental fornecer um fotoperíodo adequado, ajustado às necessidades específicas da espécie em micropropagação, de modo que as fases de iniciação, alongamento e enraizamento das plântulas ocorram sem anomalias, como deformações durante o desenvolvimento dos explantes. O monitoramento rigoroso desses fatores é crucial para garantir o desenvolvimento saudável e satisfatório das plântulas (SHARMA et al., 2023). Os hormônios vegetais são compostos químicos presentes em todas as plantas, sendo os responsáveis pelo crescimento, desenvolvimento e produtividade das mesmas. Eles interferem nos processos de divisão celular, enraizamento, desenvolvimento das plântulas, amadurecimento dos frutos, senescência das folhas, dentre outros fatores. A auxina, por exemplo, é um hormônio vegetal relacionado com a divisão celular e alongação das plantas, sendo essa armazenada como AIA (O ácido indol-3-acético) ou AIB (ácido indol-3-butírico) (ZHAO,2014; FRICK et. al, 2018).

Os reguladores de crescimento são os análogos sintéticos dos hormônios vegetais utilizados na propagação *in vitro* das plantas com o intuito de promover a proliferação dos

brotos e o desenvolvimento de órgãos e tecidos vegetais de acordo com o foco do estudo. Em um estudo realizado em 2022, com *Eucalyptus cloeziana*, pesquisadores constataram que deveria existir um balanço ideal entre as concentrações de auxina e citocinina para promover a organogênese, mostrando que os hormônios estão correlacionados (DE OLIVEIRA et. al,2022). A 6-Benzilaminopurina (BAP) foi uns dos primeiros hormônios sintéticos produzidos, apresentando bioatividade semelhante às citocininas. Tal regulador de crescimento vegetal foi empregado com sucesso na organogênese de explantes de *Eucalyptus urophylla*, onde promoveu o desenvolvimento de raízes adventícias e reduziu a oxidação dos explantes (HUANG et. al,2020).

A auxina desempenha várias funções regulatórias relacionadas ao gênero *Eucalyptus spp.*, como estimular crescimento, divisão e diferenciação celular, além de ser capaz de promover o alongamento axial (ABIRI et. al, 2020). Fica claro por meio desses estudos, que a combinação e concentração adequada dos reguladores de crescimento é imprescindível para que esses compostos tenham o efeito desejado nos explantes NAZIRAH et. al,2021).

Escolher o tipo de meio de cultura no momento do cultivo *in vitro* de qualquer espécie vegetal é importante e tem um efeito na maneira como cada espécie irá responder e se desenvolver. Além do tipo de meio, sua consistência seja ela sólida, semi-sólida ou líquida, acarreta em uma resposta positiva ou negativa dos explantes *in vitro*. A introdução de explantes em meio semi-sólido contendo os agentes gelificantes 4–8 g/L de ágar e 1,5–4,0 g/L de gelrite com um pH de 6, promove a proliferação inicial de brotações, assim como alguns tipos de meios líquidos (KAUR,2017). Em trabalhos envolvendo a micropropagação de eucalipto, os meios de cultura geralmente utilizados são MS (Murashige e Skoog, nas concentrações $\frac{1}{2}$, ou $\frac{1}{4}$), o meio de cultura JADS (Juan, Antonio, Diva e Silvian), o meio DKW (Driver e Kuniyaki Walnut) e o meio de cultura WPM (Woody Plant Medium). Para a multiplicação dos brotos de eucalipto, por exemplo, o meio líquido foi relatado como o mais adequado (CHEN et. al, 2001). Na propagação de *Eucalyptus benthamii*, o meio WPM foi o que obteve os melhores resultados (BRONDANI et. al,2012). Entretanto, o tipo de meio e como será a resposta do explante está relacionada a espécie e também a idade dos mesmos (BRONDANI et. al,2012).

O meio de cultura JADS, desenvolvido especificamente para o cultivo *in vitro* de eucalipto, fornece os nutrientes ideais para o crescimento, multiplicação e aclimação das plântulas, promovendo a produção de matéria seca e o desenvolvimento adequado antes do plantio em campo (CORREIA et. al,2020; CORREIA et. al,2012). A micropropagação de

plantas depende do equilíbrio entre compostos orgânicos e inorgânicos no meio de cultura, como cálcio, potássio, ferro e nitrogênio, que atuam como macro e micronutrientes essenciais ao metabolismo vegetal, influenciando diretamente a proliferação, diferenciação e formação de órgãos nas plantas (NGOMUO et. al, 2014). Enquanto os macronutrientes são requeridos em concentrações superiores a 0,5 mM/L e desempenham funções estruturais e metabólicas, os micronutrientes, mesmo em menores quantidades, como o boro e o ferro, são igualmente fundamentais; sua deficiência pode comprometer o desenvolvimento celular, como observado na necrose de calos de *E. grandis* (AL-AIZARI et. al,2020; AL-MAYAH, 2020). Apesar dos avanços, ainda são limitados os estudos que buscam otimizar as concentrações desses compostos nos meios de cultura frente à complexidade dos processos metabólicos envolvidos (BRUNONI et. al, 2014; LOPES DA SILVA et. al, 2015).

Outro fator que impacta o sucesso do cultivo *in vitro* é a fonte de carbono, que atua como substrato energético para as células vegetais. Os carboidratos são moléculas indispensáveis, especialmente no que se refere ao metabolismo energético celular (NGUYEN et. al,2020). Glicose, sacarose, frutose e galactose são os carboidratos comumente usados no cultivo *in vitro* de plantas, com destaque para a sacarose que é o açúcar mais utilizado na propagação do eucalipto graças a sua facilidade de transporte nos tecidos vegetais (GAGO et. al, 2021).

Sendo um açúcar não redutor, a sacarose é um dissacarídeo, ou seja, é formada por dois monossacarídeos a glicose e a frutose. Algumas pesquisas relataram que altas concentrações de sacarose no meio de cultura poderiam interferir na disponibilidade de água e nutrientes nas plantas, além de alterar as enzimas responsáveis pela fotossíntese nas células vegetais, outros dizem que quantidades elevadas de sacarose no meio de cultura não causaria nenhum dano aos explantes (NGUYEN et. al,2020). Um estudo feito com *E. cloiziana*, foi observado que concentrações maiores que 15 g/mL de sacarose e glicose no meio resultavam em um tamanho reduzido dos brotos (GAGO et. al, 2021). O uso de 3% de sacarose em meio MS resultou em um aumento de até 7 vezes na multiplicação dos brotos, já a ausência de sacarose no meio impediu a multiplicação desses brotos (GAGO et. al, 2022).

A radiação luminosa é indispensável para os organismos vegetais, pois sendo seres fotossintetizantes, precisam dela para realizar a fotossíntese e produzir energia. Vários estudos com híbridos de plantas foram feitos com o intuito de entender como a radiação luminosa interferiria nas culturas *in vitro* (BATISTA et al., 2018). Tais estudos, utilizaram lâmpadas fluorescentes, LEDs brancos, LEDs vermelhos, LEDs azuis e LEDs vermelhos-azuis em

híbridos de *E. grandis* × *E. urophylla*, mostrando que o uso das lâmpadas fluorescentes e dos LEDs vermelhos-azuis foram os melhores para o desenvolvimento dos híbridos (BATISTA et al., 2018). Outro estudo com os mesmos híbridos cultivados em biorreatores, concluiu que o uso de fontes luminosas azuis e amarelas levava a uma maior quantidade de brotações por explante (SOUZA et. al, 2020). Já para as espécies de *E. saligna* e *E. globulus*, o efeito da luz branca no enraizamento foi positivo para *E. saligna*, proporcionou um aumento na taxa de enraizamento, quando seus explantes foram expostos a luz branca. Esses estudos mostram que a escolha da fonte luminosa mais adequada irá depender das condições de cultivo *in vitro*, mais principalmente estará ligada ao genótipo em cultivo (SOUZA et. al, 2020).

Embora existam várias pesquisas com foco na micropropagação vegetal, existem vários problemas; como exemplo a contaminação dos explantes, a oxidação, a sobrevivência dos explantes *ex vitro*, dentre outros. O estabelecimento de protocolos mais eficientes para a propagação de espécies de eucalipto requer estudos mais profundos, pois cada genótipo possui necessidades próprias de nutrientes, tipos de meio de cultura, fonte de carbono, presença de reguladores de crescimento, etc. Contornar tais problemáticas é essencial para a construção de protocolos que sejam adequados para os vários genótipos de eucalipto (SHARMA et. al,2023).

2.3.1 Cultura de calos

Utilizada em diversas áreas científicas e comerciais, a técnica de cultura de tecidos vegetais é fundamental na biotecnologia vegetal, permitindo o estudo e a manipulação de diferentes espécies. Em muitas plantas terrestres, fragmentos de tecido podem ser induzidos à formação de calos, que são massas de células indiferenciadas com potencial de diferenciação em quaisquer tecidos vegetais ou de regeneração de uma planta completa. Para isso, os explantes são cultivados *in vitro* em meio gelificado, estéril e enriquecido com reguladores de crescimento, como auxinas e citocininas, que promovem a proliferação celular e a formação do calo (EFFERTH, 2019).

Ao serem mantidas as condições de esterilidade, nutrição e dosagem de reguladores de crescimento adequada as culturas de calos podem ser subcultivadas indefinidamente (JIANG et. al,2015). Existem diferenças entre o cultivo de calos e o cultivo de células vegetais diferenciadas, pois os calos são mais semelhantes as células presentes nas regiões meristemáticas das plantas, que são células incapazes de realizar fotossíntese por não possuírem cloroplastos, entre outras características (JIANG et. al,2015). Ao serem colocadas em meios de cultura adequado para o desenvolvimento de uma planta, os calos são capazes de se

diferenciar e promover a regeneração de uma planta completa. Quanto as condições de crescimento, existem os calos que precisam do escuro para se desenvolver, e há aqueles que necessitam de um fotoperíodo específico, como por exemplo, 16h de luz e 8 horas de escuridão (EFFERTH, 2019).

Existem dois tipos de calos, os compactos e os friáveis, os calos compactos são formados por uma massa de células indiferenciadas mais firmes, enquanto que os calos friáveis são uma massa de células mais frágil, que se desfazem facilmente, sendo muito úteis em culturas de células únicas em meio líquido (EFFERTH, 2019).

Nos primórdios do século 20, foram realizados os primeiros cultivos de calos, raízes e embriões pelo cientista Gottlieb Haberlandt (1854–1945). Entre as décadas de 40 e 60, os avanços constantes nas técnicas de cultivo de tecidos vegetais tinham como objetivo a investigação da dinâmica celular, ou seja, o funcionamento do metabolismo celular, os processos de embriogênese, morfogênese e nutrição, e também como ocorriam as patologias, podendo tais informações serem usadas para gerar plantas resistentes a patógenos, além de inferir quais seriam as condições mais adequadas para a propagação clonal e criação de germoplasma. Com o surgimento das pesquisas genéticas, novas áreas de aplicação das culturas de calos foram desenvolvidas (THORPE,2007).

Algumas vantagens do cultivo de calos em comparação ao cultivo de plantas completas incluem a possibilidade de produzir compostos derivados do tecido vegetal de forma controlada, minimizando a influência do ambiente externo ao frasco de cultivo (FINER et. AL, 1989). Além disso, os explantes permanecem protegidos contra os ataques de insetos e, quando mantida a esterilidade adequada, contra microrganismos (CHAVEZ et. Al,1998). Outro aspecto relevante é que esse tipo de cultura pode ser empregado na propagação de espécies vegetais em risco de extinção ou de espécies raras com alto valor econômico (CHEN et. Al, 2000). Sabe-se que diferentemente das células animais as células vegetais são totipotentes, têm a capacidade de regenerar qualquer parte do tecido vegetal e até mesmo uma planta completa (BURRIS et. al, 2009). Um estudo inferiu que os calos são formados através de células tronco vegetais pré-existentes (SUGIMOTO et. al,2011; WANG et. al,2011). Os processos moleculares pelos quais as células tronco vegetais são capazes de se diferenciarem e se desdiferenciarem ainda não estão muito claros, o que se tem conhecimento é que os genes responsáveis por tais processos não são regulados somente por fatores de transcrição, mas também envolvem fatores epigenéticos como a metilação do DNA e alterações nas proteínas histonas responsáveis pelo dobramento

das cadeias de nucleotídeos (JIANG et. al,2015). Em plantas, denominadas organismos modelos por serem usadas em várias pesquisas como a *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, observou-se que a concentração de auxinas nos calos embrionários leva a formação de células troncos, que são reguladas pela proteína PINFORMED1 (PIN1) (SU et. al,2009).

O desenvolvimento meristemático e a distribuição de hormônios vegetais ao longo do tempo e do espaço foram estudados por meio de microscopia de células vegetais *in vivo*. Observou-se que fatores de transcrição, microtúbulos, vias de regulação do WUSCHEL (WUS) mediadas por citocinina e a ação das auxinas na formação dos primórdios foliares são fundamentais para o desenvolvimento vegetal (SIJACIC et al., 2010). A dediferenciação celular e a constituição dos meristemas envolvem fatores de transcrição como WUS e WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION (WIND), que atuam como repressores conferindo totipotência às células-tronco. Em contrapartida, o TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PROLIFERATING CELL FACTOR (TCP), presente no meristema apical, funciona como ativador transcricional responsável por inibir a totipotência das células-tronco meristemáticas (IKEDA et al., 2014).

A calogênese é o processo pelo qual células vegetais indiferenciadas se multiplicam e regeneram uma planta completa, sendo influenciada por fatores morfológicos e fisiológicos, como a presença de reguladores de crescimento vegetal e ativação gênica (JIANG et. al,2015). Embora os calos sejam frequentemente associados a "células-tronco vegetais", eles são formados por diferentes tipos celulares de um tecido heterogêneo, mas apresentam homogeneidade suficiente para permitir a clonagem de plantas com características desejáveis via micropropagação (SUGIMOTO et. al,2011). O desenvolvimento e a manutenção desses calos dependem do genótipo da planta e de condições específicas de cultivo, como meio de cultura, pH, luminosidade, temperatura e presença de nutrientes e vitaminas, sendo que, por exemplo, fosfatos favorecem o crescimento celular, enquanto altos níveis de íons amônio podem prejudicar o metabolismo de compostos secundários (EFFERTH, 2019).

2.3.2 Calogênese induzida por TDZ

Os reguladores de crescimento vegetal (PGRs) são moléculas essenciais para o desenvolvimento das plantas, atuando em processos como divisão, alongamento e diferenciação celular. Em condições de cultivo *in vitro*, são aplicados para induzir e controlar a morfogênese, o que resulta na formação de calos, brotos, raízes, além de processos como a embriogênese somática e a micropropagação (TEALE et al., 2006). Entre os principais PGRs, destacam-se as

auxinas e citocininas. As auxinas favorecem a divisão, alongamento e diferenciação celular, além do crescimento em direção a luz (PERROT-RECHENMANN, 2010), enquanto as citocininas estimulam a formação de gemas e brotos, além de influenciar a divisão celular (HWANG et al., 2015). O efeito de ambos depende da concentração e das condições do meio de cultura (KAPCHINA-TOTEVA et al., 2000).

Dentre os PGRs, destaca-se o Thidiazuron (TDZ), uma ureia fenil-substituída ($C_9H_8N_4OS$), estruturalmente diferente das auxinas e citocininas, mas com alta eficácia na indução de regeneração, brotação e senescência foliar (LESHEM et al., 1994; FERRANTE et al., 2003). O TDZ é solúvel em diversos solventes, incluindo água em pH 5,9, e embora estável, sua decomposição libera fumos tóxicos (SHARMA et al., 2014; SAEED et al., 2022; PAI et al., 2018). Estudos mostram que o TDZ apresenta desempenho superior a outras citocininas, promovendo regeneração de brotos, indução de raízes adventícias e calos, mesmo em espécies recalcitrantes (ALVARENGA et al., 2015). Seu mecanismo de ação envolve vias genéticas, metabólicas e enzimáticas associadas à morfogênese e embriogênese. Além disso, o TDZ inibe a enzima CKX, aumentando a concentração de citocininas endógenas (IKEUCHI et al., 2017).

Comparado às citocininas de adenina, o TDZ induz maior expressão de genes relacionados à divisão celular e pode até substituir auxinas em determinadas respostas fisiológicas, melhorando a produtividade vegetal (RASOULI et al., 2015; VAN VOORTHUIZEN et al., 2021). Em estudos, aumentou a massa e o número de frutos (FAGUNDES et al., 2017) e demonstrou capacidade de preservar a clorofila, contribuindo para o vigor dos tecidos cultivados (FAGUNDES et al., 2017). A eficiência do TDZ depende diretamente da concentração utilizada e da espécie vegetal. Em cultivos de cevada e trigo, o TDZ promove rápida regeneração e formação de calos embriogênicos (GUO et al., 2013; NISLER et al., 2021). No entanto, concentrações elevadas ou uso prolongado podem causar anormalidades, como escurecimento ou necrose dos calos, devido ao aumento da produção de etileno endógeno (POUREBAD et al., 2015; KHAN et al., 2016).

A dose ideal de TDZ varia entre espécies, enquanto algumas requerem concentrações mais altas, outras respondem melhor a doses menores. Em *Asparagus racemosus*, por exemplo, $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ de TDZ induziu calogênese em 40% dos explantes (TRIVEDI et al., 2010), demonstrando a sensibilidade interespecies. Em amendoim, concentrações superiores a $1 \text{ }\mu\text{M}$ causaram oxidação dos calos, reforçando a necessidade de ajuste preciso da dose (KHAN et al., 2016). Além da dose, o tempo de exposição ao TDZ é crucial para o sucesso morfogênico. Recomenda-se períodos de até duas semanas para evitar efeitos indesejáveis (YÜCESAN,

2018). Em *Saussurea involucrata*, a indução de calos foi observada após 14 dias com baixas doses (GUO et al., 2012).

Apesar dos benefícios, o uso prolongado e excessivo de TDZ pode comprometer o desenvolvimento de calos. Em *Camellia sinensis* e sementes de ervilha, o contato prolongado resultou em necrose e perda da capacidade regenerativa (LU, 1993; ZHIHUI et al., 2009). Esses efeitos adversos são atribuídos à resistência do TDZ à degradação por citocinina-oxidases e à inibição de genes relacionados à biossíntese de giberelinas (GA), como GA20-oxidase e GA3-oxidase, levando à superexpressão de GA2-oxidase (KUMARI et al., 2018; ÇELIKEL et al., 2021).

No meio de cultura, o regulador de crescimento TDZ promove a divisão celular, estimulando a proliferação de células vegetais e a formação de calos. Diferentes órgãos da planta, como folhas, caules, raízes e cotilédones, podem ser utilizados como explantes. As células presentes nesses tecidos, quando estimuladas pelo TDZ, multiplicam-se e se organizam em massas indiferenciadas denominadas calos (ALI et. al, 2022). A citocinina é um dos hormônios responsáveis por dar início a formação dos calos, porém ao ser usado o TDZ substitui a ação das citocininas, o mecanismo pela qual esse PGRs exerce tal função ainda não está completamente claro, mas antes de elucidar tais mecanismos, estudos anteriores sugeriram que transportadores responsáveis por levar as citocininas para as células vegetais também estariam relacionados ao transporte do TDZ, sendo eles os transportadores da subfamília G da cassete de ligação ao ATP, permeases de purina e transportadores de nucleosídeos de equilíbrio (DURÁN-MEDINA et. al, 2017). Uma vez dentro da célula o TDZ age em diferentes rotas metabólicas, como na regulação de enzimas responsáveis por modular a ação de outros PGRs, sugerindo que o TDZ provavelmente possui a capacidade de regular a ação de transcritos disponíveis no citoplasma vegetal (ERLAND et. al, 2020).

A eficiência do TDZ está associada à sua atuação semelhante à da citocinina natural, ativando vias metabólicas específicas nas células vegetais tanto direta quanto indiretamente (NISLER, 2018). Diretamente, ativa os receptores e vias de sinalização das citocininas e indiretamente, inibi a enzima CKX, responsável pela degradação dessas citocininas. O TDZ pode bloquear os sítios de ligação da CKX, competindo com a citocinina e sendo degradado em seu lugar, embora seja considerado um inibidor fraco dessa enzima em comparação com outros compostos de ureia. Ainda assim, sua presença leva ao acúmulo de citocininas naturais, o que estimula a divisão celular e a formação de calos (NISLER et. al, 2021).

A iniciação da calogênese via TDZ está relacionada a uma série de eventos metabólicos, tais como vias sinalizadoras, transporte de sinais dentro das células, um sistema de sinalização secundário e também mecanismos de resposta ao estresse (JONES et. al, 2007). Por exemplo, um explante de folha possui os neurotransmissores serotonina, melatonina e indolamina que entram em contato com o TDZ que promove a regeneração dos calos, porém tal processo sofre a ação de inibidores de ação da auxina e de transporte da auxina, que diminuem o processo regenerativo do TDZ, mas geram um aumento na concentração dos neurotransmissores serotonina e melatonina (ERLAND et. al, 2020) Inibidores de transporte de cálcio e sódios reduzem a morfogênese induzida pelo TDZ, entretanto levam ao aumento de indolamina. Ao se quebrarem as pontes de amida do TDZ, ocorre a liberação de enxofre e nitrogênio, que estão relacionados com a indução dos calos. Ademais, o TDZ impede a síntese de derivados de diterpenoides e promove a síntese de derivados de triterpenoides, além de proporcionar o acúmulo de outros PGRs relacionados a iniciação da calogênese (WANG et. al, 2020).

Além dos metabólitos e enzimas, o TDZ também gera efeitos nas expressões gênicas. Um estudo mostrou que a indução de calos pelo TDZ está relacionada ao efeito que o mesmo tem sobre certos tipos de genes, que possuem relação com a proliferação de calos, tal trabalho foi realizado com explantes de *Asparagus racemaceus*, cujos padrões de expressão gênica foram alterados quando o TDZ foi introduzido (TRIVEDI et, al, 2010; KUMARI et. al, 2018). Em 2006, um estudo mostrou que a aplicação do TDZ levava a ativação dos genes TFL1 e TFL2 em explantes de *Arabidopsis*, promovendo a formação de calos nessas plantas (GUAN et. al, 2006). Nas culturas *in vitro* de alfafa, a indução da expressão dos genes TPP e ACS ligados ao estresse também levou a formação de calos (ZHANG et. al, 2006). Alteração na atividade das citocininas e translocação de auxinas em nível genético é um dos efeitos do TDZ, que é capaz de gerar a expressão de genes responsáveis pela sinalização de citocininas, como os genes presentes nos calos de *Roza canina*. Tais descobertas fornecem os subsídios necessários para concluir que o TDZ é capaz de influenciar nas expressões dos genes para promover a calogênese (KUMARI et. al, 2018; KOU et. al, 2016).

2.4 Histologia de calos

A relevância do uso de técnicas histológicas para o estudo da calogênese foi primeiramente evidenciada nos trabalhos de Skoog e Miller (SKOOG et al., 1957), que definiram o calo como um tecido vegetal de crescimento desorganizado, composto por uma massa celular desdiferenciada. Essa definição reflete as características histológicas dos calos,

posteriormente descritos de forma mais detalhada como um sistema integrado, originado da proliferação celular de diferentes tecidos vegetais. Inicialmente composto por células relativamente homogêneas, o calo torna-se progressivamente heterogêneo, adquirindo capacidade de formar qualquer órgão ou tecido vegetal, ou até regenerar a planta completa (KRUGLOVA et al., 2018).

Diversas tentativas foram realizadas para determinar o período exato de formação dos calos e seu desenvolvimento *in vitro*. Estudos destacam etapas críticas, incluindo fases de indução e expressão, que diferenciam a formação de calos primários, sua complexidade estrutural e as vias morfogênicas envolvidas no desenvolvimento do calo (KRUGLOVA et al., 2023).

Um estudo realizado em 2020 (KLIMEK-CHODACKA et. al, 2020), avaliou a eficiência na indução e regeneração de calos em plantas do gênero *Nigella L. (Ranunculaceae)*, as análises microscópicas das lâminas histológicas revelaram áreas embriogênicas e não embriogênicas bem distintas. As zonas embriogênicas eram constituídas por células compactas pequenas, com formato isodiamétrico, cujo os núcleos eram grandes e com coloração azul escura e nucléolos protuberantes, evidenciando uma natureza meristemática. Já as zonas não embriogênicas eram compostas por células vacuoladas grandes, com um arranjo livre e grandes espaços intracelulares (KLIMEK-CHODACKA et. al,2020).

As regiões meristemáticas do tecido embriogênico deram origem a embriões somáticos, nos quais foi possível observar diferentes estágios de desenvolvimento. Também foi visualizada a presença de pró-embriões somáticos com uma estrutura semelhante ao suspensor. Já os aglomerados embriogênicos produziram embriões com formato globular com protoderme ao redor, posteriormente evoluindo para embriões em coração com a protoderme bastante diferenciada e cotilédones definidos (PINKER et al, 2018). Em algumas amostras, os embriões estavam ligados ao tecido dos calos através de estruturas multicelulares parecidas com o suspensor, porém não era algo frequentemente observado. Quanto aos embriões já maduros, o domínio basal que é formado por hipocótilo, a radícula e o meristema da raiz, se encontrava em estágio de desenvolvimento bem avançado, cuja região meristemática apresentava divisões celulares abundantes (SZEWCZYK-TARANER et. al, 2015). Eventualmente, dentro da região não embriogênica surgiram áreas de tecidos vasculares que se dispersaram pelo tecido. A partir dessas análises, os pesquisadores conseguiram visualizar e diferenciar as regiões responsáveis pela formação dos diferentes tecidos, informação essa bastante útil para estudos subsequentes

como morfogênese, embriogênese somática e até transformação genética (KLIMEK-CHODACKA et. al,2020).

Estudos recentes sobre a histologia de calos em *Eucalyptus cloeziana* revelam que regiões com competência meristemática, caracterizadas por células pequenas, paredes finas, morfologia isodiamétrica e alta razão núcleo/citoplasma, estão presentes nas amostras, mostrando alta atividade celular e capacidade de formar novos tecidos, incluindo feixes vasculares e meristemoides ativos (OBERSCHELP et al.,2015). O acúmulo de substâncias ergásticas nessas áreas indica um elevado potencial morfogênico, confirmando que calos induzidos *in vitro* são fontes eficientes de células competentes para organogênese e regeneração vegetal. Esses achados ressaltam a importância do estudo histológico para entender a competência celular e desenvolver protocolos eficazes de regeneração e micropropagação em plantas de interesse (ZICHNER ZORZ et al., 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a origem das brotações em calos de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*, induzidos a partir do uso de diferentes concentrações de TDZ.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a eficiência de diferentes concentrações de TDZ na indução de calos em *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*, com base na porcentagem de calos formados;

Determinar a concentração de TDZ mais adequada para a calogênese em cada espécie, baseado na quantidade de brotos que esses calos serão capazes de originar;

Comparar a resposta dos genótipos de eucalipto quanto à formação de calos e ao número de brotações geradas, baseado na porcentagem de explantes que serão capazes de gerar brotos;

Analisar, por meio de cortes histológicos, a origem das brotações nas diferentes regiões do tecido calogênico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desinfestação e germinação das sementes de Eucalipto

Para a germinação das sementes de eucalipto, foi preparado o meio MS (MURASHIGE and SKOOG,1962) na metade de sua concentração (ANEXO A), gelificado com $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ágar e o pH foi aferido para 5,8. Em seguida, o meio foi autoclavado por 20min a 121°C .

Para a desinfestação, as sementes foram levadas para câmara de fluxo laminar, onde foram colocadas em tubos eppendorf de 2 ml até a marca de 0,5 ml, juntamente com 1ml de álcool 70% durante 1 minuto. Posteriormente, foi retirado o álcool, e adicionado 1 ml de NaClO (teor de cloro ativo: 2,0% a 2,5% p/p) com uma gota de detergente comercial, deixando agir por 20 minutos e, a cada 5 minutos foi feita a agitação do tubo. Após os 20 minutos, as sementes foram lavadas 5 vezes com água destilada autoclavada. Terminadas as lavagens, as sementes foram selecionadas com o auxílio de pinças de ponta fina e uma lupa e inoculadas em frascos com meio de germinação.

Foram colocadas 12 sementes por frasco totalizando 86 frascos (43 para *E. urophylla* e 43 para *E. grandis*). Os frascos foram colocados em sala de crescimento para a germinação das sementes com temperatura de 27°C e fotoperíodo de 12 horas por 42 dias.

4.2 Calogênese

O meio de cultura utilizado para calogênese foi o MS (MURASHIGE and SKOOG,1962) na metade da concentração de nitratos (ANEXO A), contendo $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ágar, $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose e o pH 5,8. O meio foi autoclavado a 121°C por 20min. Após a autoclavagem, foram adicionadas as diferentes concentrações de TDZ.

Os explantes foram obtidos de plantas de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis* cultivadas por 42 dias *in vitro*. Foram utilizados três tipos de explantes: cotilédones, folhas e ápices caulinares, os quais foram seccionados em fragmentos de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$ e inoculados em placas de Petri contendo meio de calogênese (MS com metade da concentração de nitratos). O experimento foi conduzido segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco concentrações do regulador de crescimento TDZ como tratamentos: C: $0,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, T1: $0,025 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, T2: $0,050 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, T3: $0,075 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e T4: $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Para cada espécie e tratamento, foram utilizados 15 explantes distribuídos aleatoriamente em 15 placas de Petri, totalizando 75 placas por espécie. A distribuição dos tipos de explante por tratamento seguiu a proporção de 3 explantes de ápice caulinar, 6 de cotilédone e 6 de folha por concentração de TDZ, garantindo uniformidade no número total de repetições. Foram feitos números de placas diferentes para ápices, cotilédones e folhas, pois o objetivo

inicial no momento da inoculação dos explantes era fazer o maior número de placas possível para minimizar as perdas causadas por futuras contaminações. Após a inoculação, as placas foram mantidas em sala de cultivo com temperatura controlada a 27 °C, em condição de escuro contínuo, por um período de 30 dias, com renovação do meio de cultura após 15 dias. A avaliação da calogênese foi realizada ao final do período de cultivo.

Um segundo experimento foi conduzido com plantas de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus grandis* com 63 dias de germinação, utilizando o delineamento em blocos casualizados (DBC), com os blocos correspondendo aos dois dias consecutivos de execução do experimento. Essa estrutura experimental foi adotada devido ao elevado número de repetições (quantidade de explantes), que impossibilitou a condução de todas as inoculações em um único dia. Dessa forma, a divisão em dois blocos permitiu controlar a variabilidade associada a possíveis diferenças nas condições ambientais e operacionais entre os dias. Foram avaliados cinco tratamentos (C: 0,0 mg·L⁻¹ de TDZ; T1: 0,025 mg·L⁻¹; T2: 0,050 mg·L⁻¹; T3: 0,075 mg·L⁻¹; e T4: 0,1 mg·L⁻¹), com sete placas por genótipo em cada tratamento: uma placa com ápices (10 explantes), duas com cotilédones (10 explantes cada) e quatro com folhas (10 explantes cada), totalizando 35 placas por espécie. Três pesquisadores participaram da execução, cada um responsável por 70 placas, totalizando 210 placas por dia. Ao final do experimento, considerando os dois blocos (dias), foram inoculadas 420 placas no total.

4.3 Regeneração dos calos de eucalipto

Após os 30 dias de calogênese, os explantes foram transferidos para o meio de regeneração (MURASHIGE and SKOOG, 1962) suplementado com BAP 0,338 mg·L⁻¹ e ANA 0,0088 mg·L⁻¹ (ANEXO A) e colocados na sala de crescimento sob luz (fotoperíodo 16 horas por 8 horas) a 27°C para a indução de brotações. As trocas para um novo meio foram feitas após 15 dias de regeneração e após completados 30 dias de regeneração.

4.4 Histologia em resina

Para os cortes histológicos, foram selecionados apenas calos de ápice caulinar de *E. urophylla* e de *E. grandis*, que haviam completado 60 dias em regeneração, pois os calos oriundos de cotilédones dos dois genótipos trabalhados não formaram brotações, mesmo após 60 dias em meio de regeneração (Figura 1). Quanto aos calos de explantes foliares, somente três placas de *E. grandis*, nos tratamentos T1 (0,025 mg·L⁻¹), T2 (0,050 mg·L⁻¹) e T3 (0,075 mg·L⁻¹) formaram um número menor de brotos (Figura 10). Os calos selecionados para a

histologia, foram oriundos do experimento feito com plantas de 42 dias de germinação, pois o experimento realizado com plantas de 63 dias em germinação, teve um desempenho tanto na calogênese quanto na regeneração inferior aos explantes oriundos de plantas de 42 dias em germinação. Como o objetivo da etapa histológica era identificar o local de origem de formação das brotações, somente um tipo de explante que fosse selecionado e que apresentasse a presença de brotos seria suficiente para se obter tal resposta. Quanto aos tratamentos, os dois calos de ápice caulinar selecionados pertenciam ao tratamento T1 ($0,025 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), que se mostrou eficiente na regeneração de brotos nos dois genótipos de eucalipto.

Figura 1 – Cotilédones em processo de regeneração.



Legenda: A imagem mostra calos oriundos de explantes de cotilédones com 60 dias em meio de regeneração (MS com BAP e ANA). A primeira placa (a esquerda) são calos de *E. urophylla*, as demais placas são de *E. grandis*. Como pode ser observado na imagem, os calos de cotilédones dos dois genótipos não foram capazes de formarem brotos, mesmo após 60 dias em processo regenerativo.

Fonte: elaboração própria.

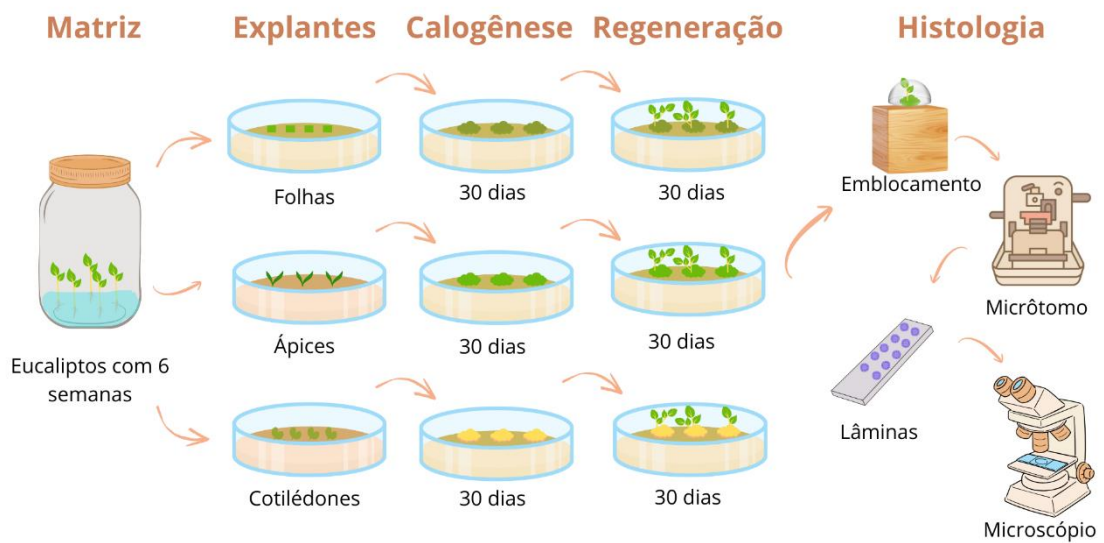
Foram então selecionados um calo de ápice caulinar de *E. urophylla* e um calo de ápice caulinar de *E. grandis*, que foram colocados em placas de vidro sob uma lupa e com o auxílio de pinça e bisturi foram removidas e contadas as brotações. Os calos foram cortados ao meio e colocados em tubos eppendorf contendo FAA (Formaldeído 15%, Ácido acético 15% e Álcool 70%) para a etapa de fixação. Após 4 dias em FAA, os calos foram desidratados em uma sequência de soluções com diferentes concentrações de etanol (70% até 100%), com intervalo de 1h entre cada concentração.

As amostras foram colocadas em solução de pré-infiltração, que consistiu em três etapas, sendo a primeira de etanol 100% e Histoiresina por 15 horas, depois duas trocas somente com Histoiresina, a primeira por 6 horas e a segunda por 15 horas. As amostras foram submetidas a solução de infiltração composta por Histoiresina mais ativo por 7 horas. Por último, as amostras foram polimerizadas com solução de Histoiresina, ativador e endurecedor, e colocadas em moldes. Os moldes foram levados para uma estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ para o endurecimento do material. Após endurecerem, as amostras foram coladas em um suporte de madeira e, foram

cortadas com o uso de um Micrótomo. As lâminas foram coradas com azul de toluidina (0,05%) e observadas ao microscópio.

As Figuras 2 e 3 apresentam os dois esquemas da metodologia empregada nos experimentos 1 e 2, abrangendo desde a preparação dos explantes, para os experimentos 1 e 2, e as análises histológicas feitas para o experimento 1, de modo a facilitar a compreensão.

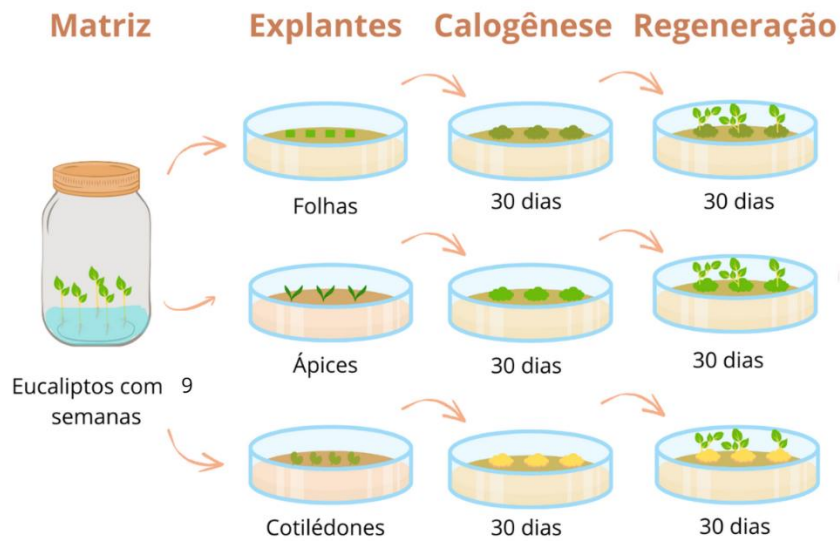
Figura 2 – Metodologia empregada no primeiro experimento.



Legenda: Esquema da metodologia utilizada na condução do primeiro experimento realizado com plantas de 42 dias em meio de germinação (MS na metade da sua concentração).

Fonte: elaboração própria.

Figura 3 – Metodologia empregada no segundo experimento.



Legenda: Esquema da metodologia utilizada na condução do segundo experimento realizado com plantas de 63 dias em meio de germinação (MS na metade da sua concentração).

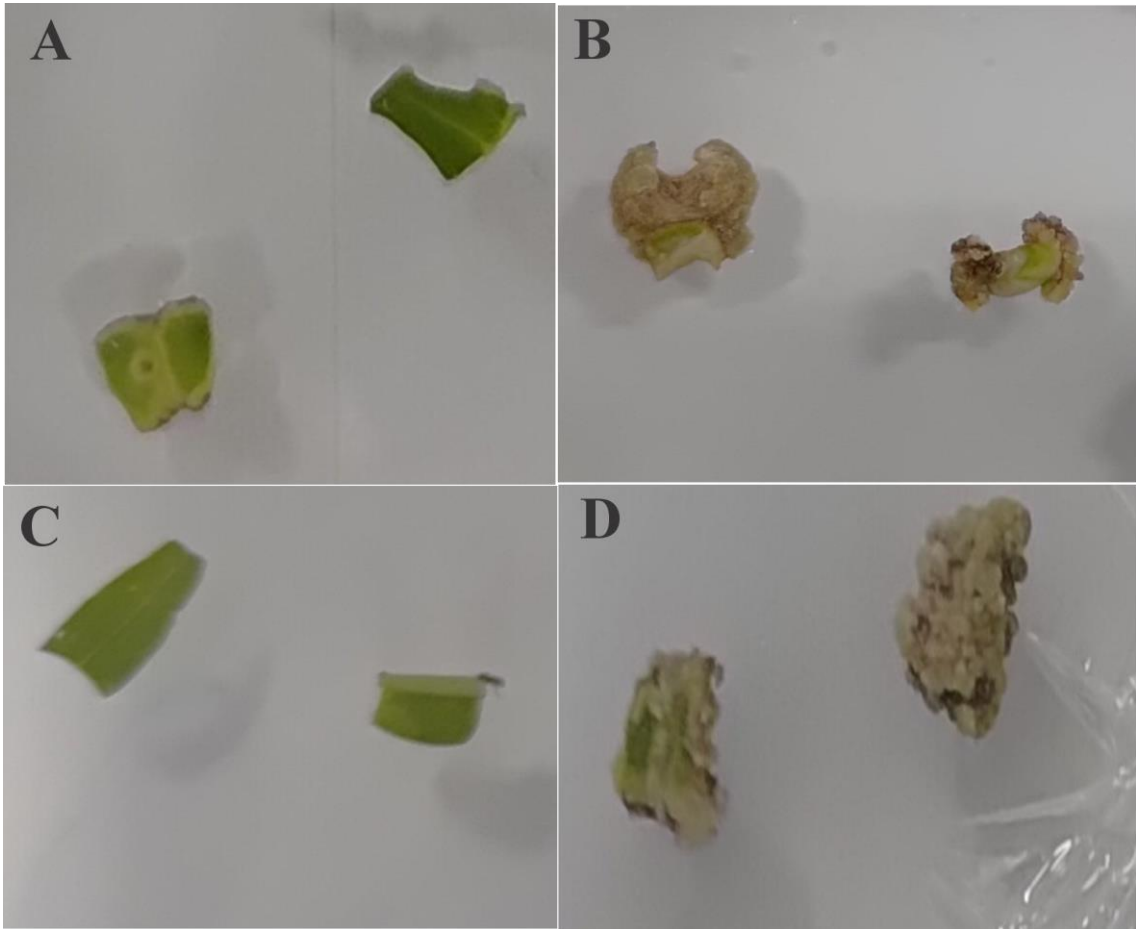
Fonte: elaboração própria.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Calogênese

A primeira observação feita foi quanto a idade dos explantes, foram testados explantes extraídos de plantas com 42 dias e 63 dias de germinação. As plantas de 63 dias possuíam folhas, cotilédones e ápices maiores do que as de 42 dias, as quais resultavam em um número maior de repetições (quantidade de ápice, cotilédone e folhas), porém no que se refere a formação de calos, todos os explantes retirados de plantas de 42 dias se transformavam em calos quando atingiam os 30 dias de indução nos meios com TDZ, isso para todos os tratamentos com TDZ e para ambos os genótipos trabalhados, ou seja, 100% de sucesso na formação de calos (Figuras 4, 5 e 6). Ao passo que, para os explantes de plantas de 63 dias foram observadas que algumas placas após os 30 dias de calogênese, continham explantes que não se tornaram calos (30% de explantes que formaram calos) (Figuras 4, 5 e 6).

Figura 4 – Calos foliares em processo de calogênese.



Legenda: Imagens de calos foliares com 30 dias de calogênese inoculados com 63 dias de germinação (A e C). Imagens de calos foliares com 30 dias de calogênese inoculados com 42 dias de germinação (B e D). Nas imagens A e B são calos de *Eucalyptus urophylla*. Nas imagens C e D são calos de *Eucalyptus grandis*.

Fonte: elaboração própria.

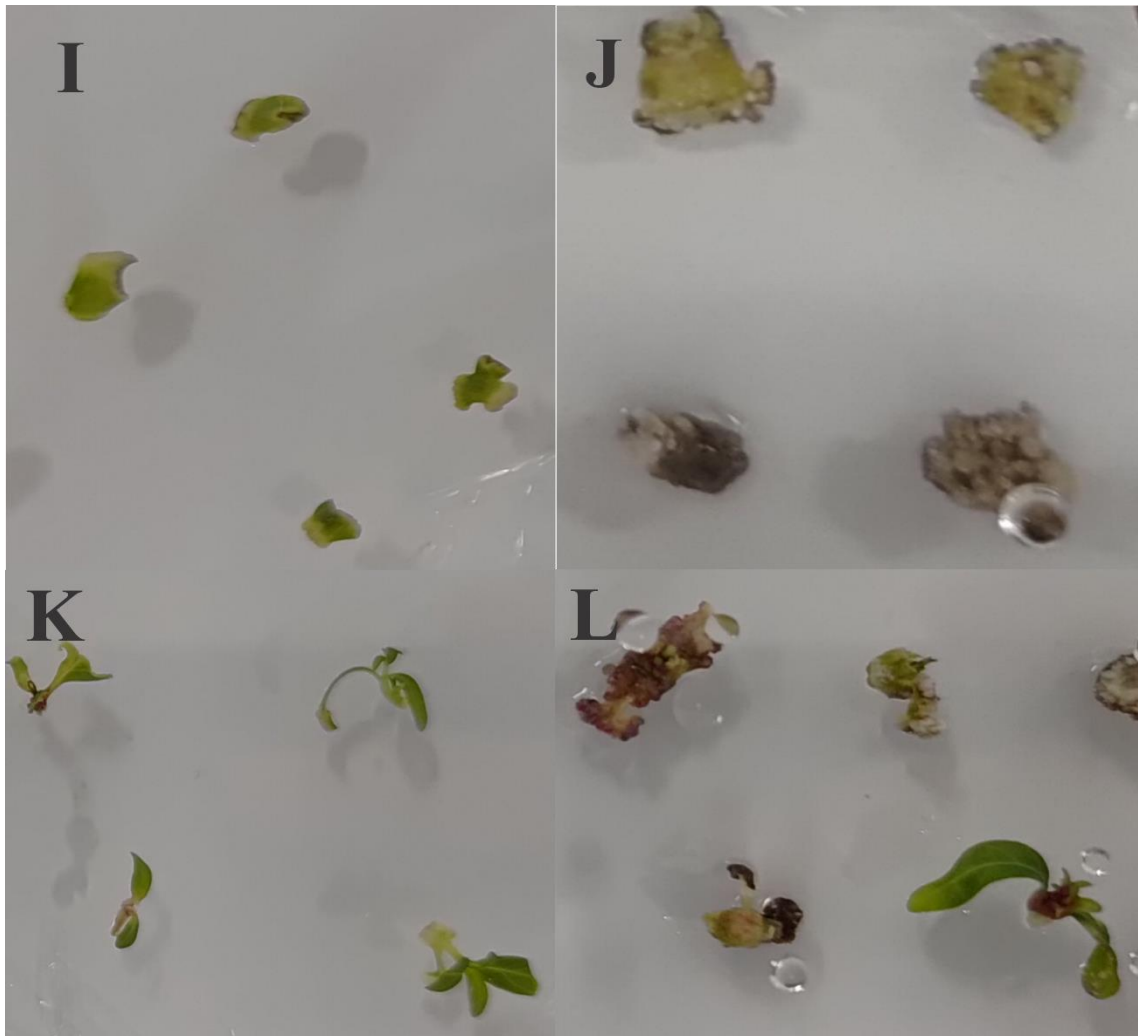
Figura 5 – Calos de cotilédones e ápices de *Eucalyptus grandis*.



Legenda: As imagens E e F apresentam calos de cotilédone de *E. grandis* com 30 dias de calogênese. Na imagem E são calos de cotilédone provenientes de plantas com 63 dias de germinação. Já na imagem F, são calos de cotilédone provenientes de plantas com 42 dias de germinação. As imagens G e H apresentam calos de ápice caulinar de *E. grandis* com 30 dias de calogênese. Na imagem G são calos de ápice provenientes de plantas com 63 dias de germinação e a imagem H são calos de ápices provenientes de plantas com 42 dias de germinação.

Fonte: elaboração própria

Figura 6 – Calos de cotilédones e ápices de *Eucalyptus urophylla*.



Legenda: As imagens I e J apresentam calos de cotilédone de *E. urophylla* com 30 dias de calogênese. Na imagem I são calos de cotilédone provenientes de plantas com 63 dias de germinação, enquanto que na imagem J temos calos de cotilédone provenientes de plantas com 42 dias de germinação. Já nas imagens K e L, apresentam-se calos de ápice caulinar de *E. urophylla* com 30 dias de calogênese. Na imagem K são calos de ápice provenientes de plantas com 63 dias de germinação e a imagem L são calos de ápices provenientes de plantas com 42 dias de germinação.

Fonte: elaboração própria.

De acordo com Oliveira et. al, 2024, as diferentes respostas a indução de calos apresentada pelos explantes oriundos de plantas com 42 dias de germinação e plantas com 63 dias pode estar intimamente relacionada a idade das mesmas. Existem vários fatores que fazem com que quanto mais jovem seja o tecido vegetal mais responsivo ele seja e um melhor desempenho ele apresente. Primeiramente, tecidos jovens tem uma maior atividade meristemática, principalmente aqueles presentes nos ápices caulinares, fazendo com que as respostas morfogênicas sejam mais eficazes na formação de calos e brotações. Além disso, os tecidos jovens possuem maior sensibilidade aos reguladores de crescimento presentes no meio

de cultura, pois possuem receptores celulares mais ativos em comparação com os tecidos mais velhos (DE OLIVEIRA, et. al, 2024).

Outro ponto a ser destacado foi a ocorrência de uma alta taxa de contaminação dos explantes durante a etapa de calogênese, contaminação essa causada quase que predominantemente pela presença de fungos nas placas dos explantes (Figura 7). Por conta disso, para as 150 placas inoculadas na calogênese, foram salvas somente 69 placas, ou seja, a taxa de contaminação desse experimento foi de aproximadamente 54%.

A contaminação microbiana em micropropagação, é a causa principal de perdas de materiais vegetais cultivados *in vitro*. Quando as contaminações são provenientes de fatores externos, como o uso de placas de Petri não estéreis ou o uso de equipamentos ou meio de cultura não autoclavados, o emprego de um protocolo de assepsia e esterilização eficientes são suficientes para combater o aparecimento de contaminações (OKOROAFOR, 2022; PARK et. al,2017; ANTHONYDHASON et. al,2018).

No entanto, quando a contaminação é endofítica, ou seja, originada do próprio material vegetal, o controle torna-se consideravelmente mais complexo (TEWELDE et al., 2020; KIM et al., 2017). Dessa forma, além dos cuidados com utensílios e meios de cultura, é fundamental considerar cuidadosamente a procedência do material vegetal utilizado na propagação *in vitro*. O sucesso do cultivo *in vitro* depende, portanto, da combinação entre a escolha criteriosa do

material vegetal e a aplicação de um protocolo de esterilização eficiente (SESSOU et al., 2020; SIVANESAN et al., 2021).

Figura 7 – Contaminação fúngica dos explantes.



Legenda: A imagem mostra explantes de cotilédone pertencentes a *Eucalyptus grandis* tirada após 15 dias em calogênese. Nessa imagem é possível visualizar o crescimento de fungos que envolveram os explantes.

Fonte: elaboração própria.

Em relação à resposta dos dois genótipos à indução de calos, observou-se que os calos de *Eucalyptus urophylla* tinha tendência maior a oxidação em relação aos calos de *Eucalyptus grandis* (Figura 8). Ambos os genótipos produziram calos compactos, porém os calos de *E. urophylla* eram ligeiramente mais úmidos e frágeis, podendo se partir ao serem manipulados com pinça, embora não se desintegrassem como calos friáveis. Quanto à contaminação, os explantes de *E. urophylla* demonstraram maior suscetibilidade em comparação a *E. grandis*. Em ambos os genótipos, os contaminantes, principalmente fungos, seguidos por bactérias,

geralmente se desenvolviam diretamente sobre o explante, embora, ocasionalmente, tenham surgido em outras regiões da placa de Petri.

Figura 8 – Explantes dos dois genótipos ao final da calogênese.



Legenda: A imagem à esquerda, mostra as características de calos foliares de *Eucalyptus urophylla* após completados 30 dias em calogênese. A imagem à direita, mostra as características de calos foliares de *Eucalyptus grandis* após completados 30 dias em calogênese. Em ambas as imagens é possível visualizar uma diferença em relação a coloração e aparência dos calos.

Fonte: elaboração própria.

O genótipo das espécies vegetais trabalhadas tem um impacto direto no sucesso da calogênese (HESAMI et. al, 2018; PHILLIPS et. al, 2019). Isso porque, a resposta das plantas ao cultivo *in vitro* é genótipo dependente, ou seja, cada planta, mesmo que sejam de um mesmo gênero, terão uma resposta individual aos estímulos provenientes do meio de cultura e dos reguladores de crescimento vegetal. Primeiramente, as plantas podem ter diferentes reações aos reguladores de crescimento, algumas podem ser mais sensíveis aos acúmulos dos mesmos e apresentarem uma resposta fisiológica mais rápida, ao passo que o contrário também seria verdadeiro (RAM et. al, 2024; NAGLE et. al, 2018).

A resposta gênica também influencia no desempenho das plantas, existem genes ligados aos processos de formação de calos e de regeneração de brotos e estes precisam estar ativos nas células vegetais durante as etapas de calogênese e de regeneração. Alguns genótipos possuem maior facilidade em expressar tais genes, o que resulta em uma melhor desdiferenciação celular e posterior regeneração (SILVA et. al, 2022; GORDON-KAMM et. al, 2019).

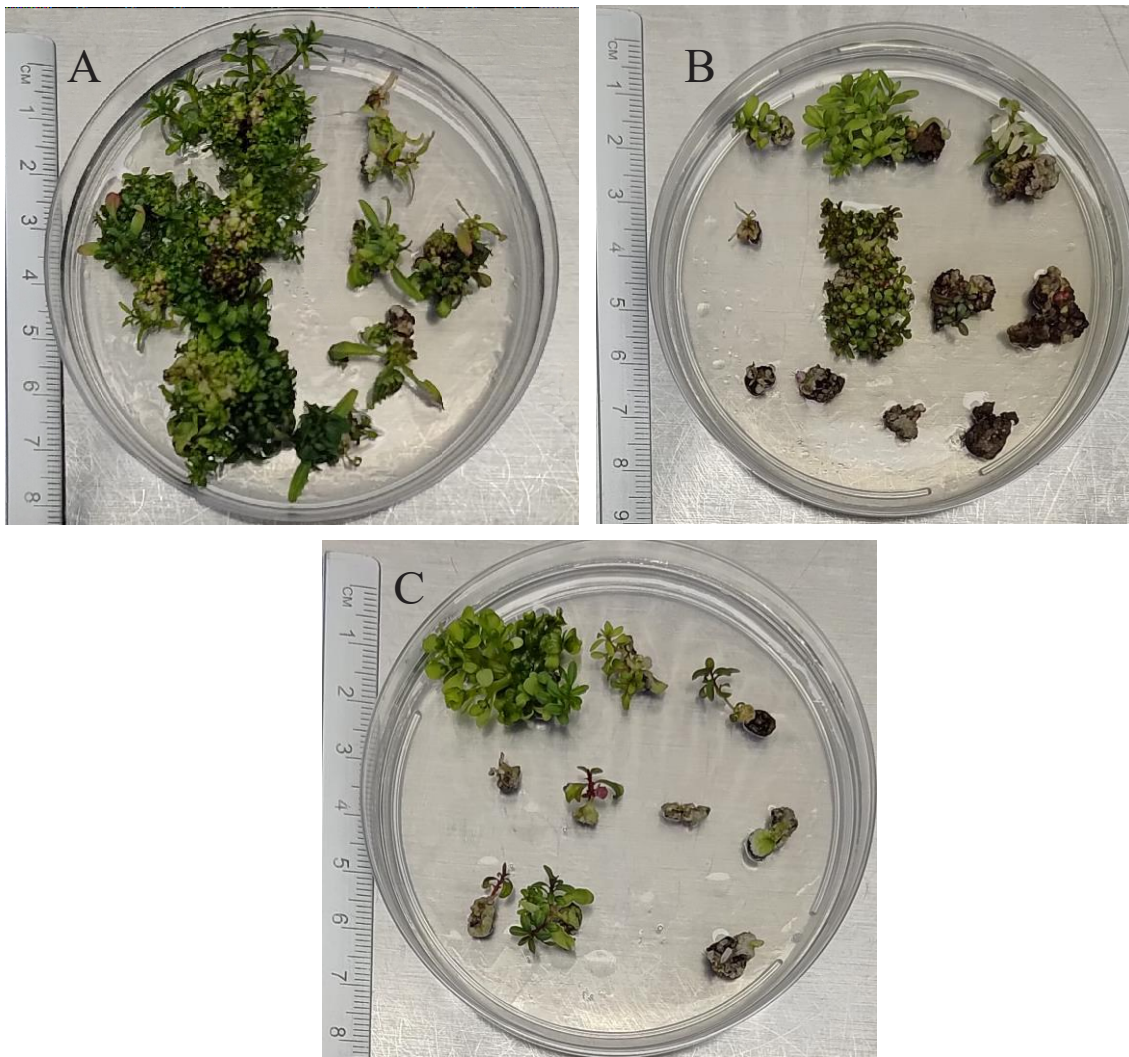
Essas diferenças são de grande relevância, pois refletem a forma como cada genótipo responde ao protocolo experimental ao qual é submetido. Tal variabilidade dificulta a aplicação de um protocolo único e universal para um mesmo gênero, uma vez que respostas distintas podem ocorrer mesmo entre espécies filogeneticamente próximas. Consequentemente,

procedimentos de micropropagação, transformação genética ou calogênese que se mostraram eficientes para uma espécie podem não apresentar o mesmo sucesso em outra (EL-ESAWI, 2016; NALAPALLI et al., 2021; NATHAN et al., 2022).

5.2 Regeneração

Após 15 dias em regeneração, foi observado que as placas de ápices caulinares de *E. grandis* que tinham sido submetidas ao tratamento T1 (0,025 mg·L⁻¹ de TDZ) apresentaram os primeiros sinais de brotação. Passados 23 dias em regeneração, todos os explantes de ápices caulinares tanto de *E. grandis* quanto de *E. urophylla* começaram a formar brotos. Entre os dois genótipos em estudo o *E. grandis* foi o mais responsivo, pois seus calos oriundos de ápices caulinares formaram uma maior quantidade de brotações, com uma média de 67% dos explantes com brotos para o tratamento T1 (0,025 mg·L⁻¹ TDZ), 43,34% para o tratamento T2 (0,050 mg·L⁻¹ TDZ), 48% para o tratamento T3 (0,075 mg·L⁻¹ TDZ) e 37,5% para o tratamento T4 (0,1 mg·L⁻¹ TDZ). Já para *E. urophylla* as médias de formação de brotações por explante foram 36% para o tratamento T1 (0,025 mg·L⁻¹ TDZ), 32% para o tratamento T2 (0,050 mg·L⁻¹ TDZ), 31% para o tratamento T3 (0,075 mg·L⁻¹ TDZ) e 25% para o tratamento T4 (0,1 mg·L⁻¹ TDZ). No que se refere aos calos oriundo de cotilédones de *E. grandis* e *E. urophylla*, nenhum deles foi capaz de dar origem a brotos mesmo após 60 dias em meio de regeneração. No caso dos calos oriundos de folhas, somente três placas de *E. grandis* formaram brotações, sendo elas uma placa do tratamento T1 com 20% de brotos, uma do tratamento T2 com 6,66% de brotos e uma do tratamento T3 com 33,33% de brotos formados. Quanto a concentração de TDZ mais eficiente, o tratamento T1 (0,025 mg·L⁻¹ TDZ) foi o melhor na regeneração de brotos em *E. grandis* com uma média de 67% de brotações, já em *E. urophylla* os tratamentos T1 e T2 (0,025 mg·L⁻¹ TDZ e 0,050 mg·L⁻¹ de TDZ respectivamente) foram os mais responsivos na formação de brotos com as médias de 36% e 32% de brotações respectivamente. (Figura 9).

Figura 9 – Ápices ao final do processo regenerativo.

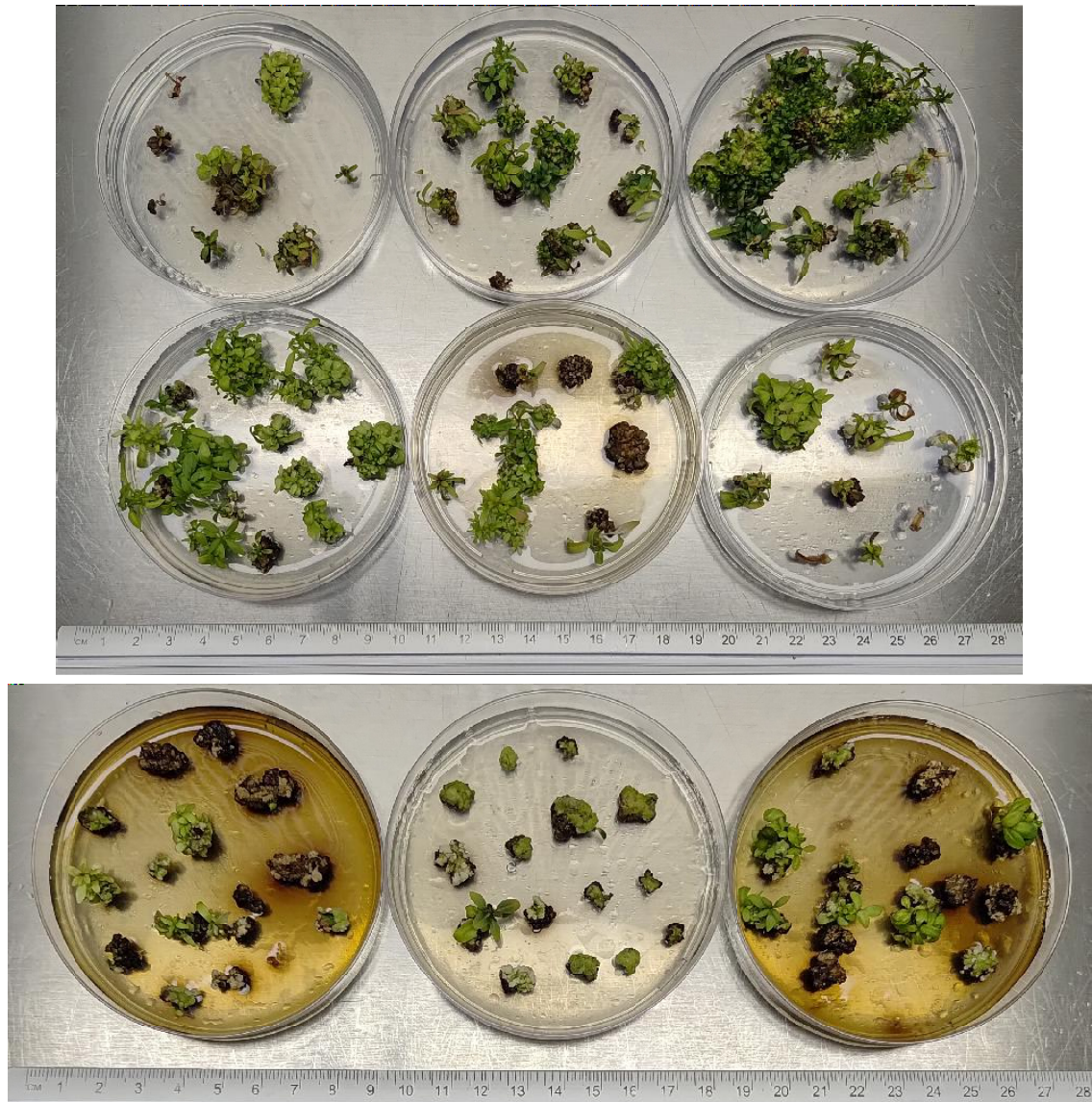


Legenda: A- A imagem apresenta calos de ápices caulinares de *Eucalyptus grandis* em meio de regeneração (MS com BAP e ANA) com $0,025 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de TDZ (tratamento T1). B- A imagem apresenta calos de ápices caulinares de *Eucalyptus urophylla* em meio de regeneração (MS com BAP e ANA) com $0,025 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de TDZ (tratamento T1). C- A imagem apresenta calos de ápices caulinares de *Eucalyptus urophylla* em meio de regeneração (MS com BAP e ANA) com $0,050 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de TDZ (tratamento T2). Ao serem observadas as três imagens, é possível notar uma maior quantidade de brotações nos calos da imagem A em relação aos calos presentes nas imagens B e C.

Fonte: elaboração própria.

No que se refere ao tipo de explante utilizado, os ápices foram os mais responsivos em ambos os genótipos (Figura 10), com um percentual total de brotações, unindo as médias dos quatro tratamentos, de 48,96% para *E. grandis* e 31% para *E. urophylla*. No que se refere aos outros tipos de explante, com dito anteriormente não houve formação de brotos em calos de cotilédones, tanto para *E. grandis* quanto para *E. urophylla*. E para os calos foliares, somente *E. grandis* teve placas com formação muito baixa de brotações, o que não pode ser usado para comparações de dados, visto que os calos foliares de *E. urophylla* não formaram brotos.

Figura 10 – Resultados entre dois tipos de explantes ao fim da regeneração.



Legenda: A imagem acima mostra calos de ápices caulinares de *Eucalyptus grandis* com 35 dias em meio de regeneração (MS com BAP e ANA). A imagem abaixo mostra calos foliares de *E. grandis* com 35 dias em meio de regeneração (MS com BAP e ANA). Ao serem comparadas as duas imagens, nota-se que os calos de ápices caulinares regeneraram uma maior quantidade de brotações quando comparados aos calos foliares, que além de menor número de brotos possui calos oxidados.

Fonte: elaboração própria.

Os explantes oriundos dos ápices caulinares de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* apresentaram desempenho superior em relação aos explantes originados de folhas e cotilédones, o que se deve à alta concentração de células meristemáticas nessa região do corpo vegetal (JAFARI et al., 2017). As células meristemáticas possuem totipotência, ou seja, a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de célula vegetal, o que facilita os processos de

desdiferenciação e diferenciação celular aos quais os explantes são submetidos durante a indução e formação de calos, bem como durante a regeneração de brotos.

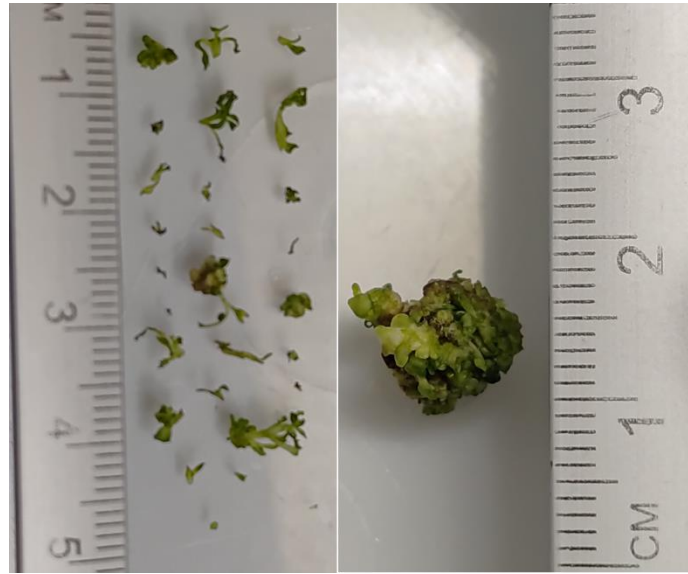
Além disso, os ápices caulinares apresentam níveis elevados de auxinas, hormônios responsáveis por promover o alongamento celular e a dominância apical (KADOKURA et al., 2018). Quanto às citocininas, os ápices possuem concentrações mais equilibradas, o que contribui para uma indução mais eficiente dos calos e regeneração dos brotos, dependendo apenas dos reguladores adicionados ao meio de cultura. O tecido apical também se caracteriza por uma alta taxa metabólica, garantindo a síntese eficiente de metabólitos essenciais à sobrevivência celular, o que resulta em maior resiliência aos estresses comumente observados durante o cultivo *in vitro* (DE OLIVEIRA COSTA et al., 2020).

Portanto, compreender as características e vantagens dos diferentes tipos de explantes é fundamental para o estabelecimento de protocolos experimentais. A escolha adequada do explante pode determinar o sucesso do estudo, sendo que, para experimentos de organogênese indireta, calos oriundos de ápices caulinares se mostram particularmente vantajosos, pois as regiões meristemáticas presentes nesses tecidos respondem de forma mais eficiente aos reguladores de crescimento aplicados no meio de cultura (KENDURKAR et al., 2018).

5.3 Histologia

O calo de *E. grandis* escolhido para os cortes histológicos era formado por 27 brotações que foram cortadas da superfície do calo e contadas (Figura 11). O calo foi então seccionado ao meio e suas duas partes foram denominadas amostra 1 e amostra 2, que seguiram para o emblocamento. O que pode ser observado nas primeiras lâminas provenientes da amostra 1, pertencente ao calo de *E. grandis*, foram estruturas teciduais semelhantes aos tecidos vegetais que compõe uma folha, ou seja, a presença de epiderme, parênquima paliçádico, parênquima esponjoso, feixes vasculares e estômatos (Figura 12A). A presença dessas folhas possivelmente é um resquício das brotações que foram cortadas da superfície do calo.

Figura 11 – Imagem do calo e brotações retiradas de *Eucalyptus grandis*.



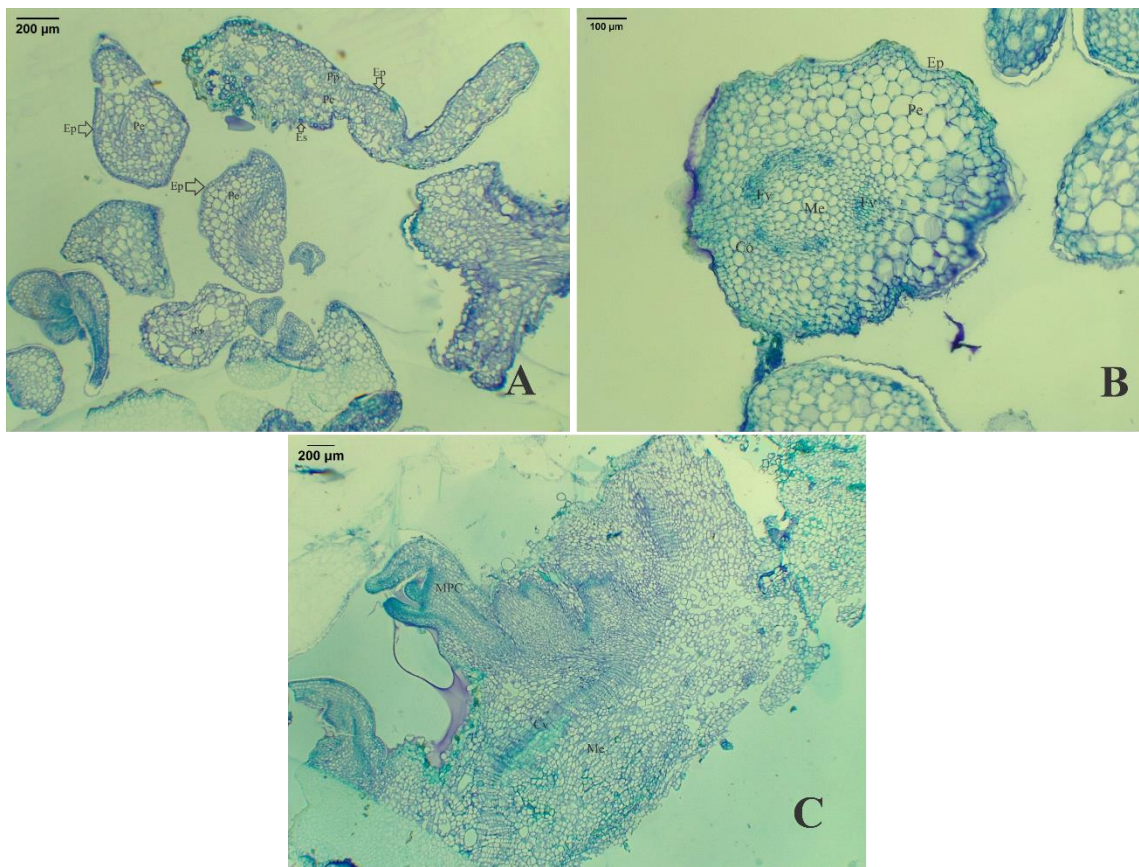
Legenda: A figura mostra a aparência do calo de ápice caulinar de *Eucalyptus grandis* escolhido para a etapa de histologia antes de ser embocado. À esquerda estão as brotações que foram seccionadas da superfície do calo. Foram contadas ao todo 27 brotações retiradas do calo de *E. grandis*.

Fonte: elaboração própria.

Depois, as lâminas mais internas começaram a apresentar tecido com organização semelhante ao caule vegetal, com presença de protoderme, região cortical, câmbio vascular e região medular (Figura 12 B). À medida que se aprofunda o corte, observa-se que a presença de sistemas condutores era cada vez mais evidente nos tecidos.

Em algumas lâminas, além da presença de várias das estruturas que lembram xilema e floema, como Elementos de vaso e Elementos de Tubo Crivado, respectivamente, ainda foi visualizada a estrutura de um ápice caulinar se formando na protoderme do tecido do calo (Figura 12 C).

Figura 12 – Cortes histológicos da amostra 1 de *Eucalyptus grandis*.

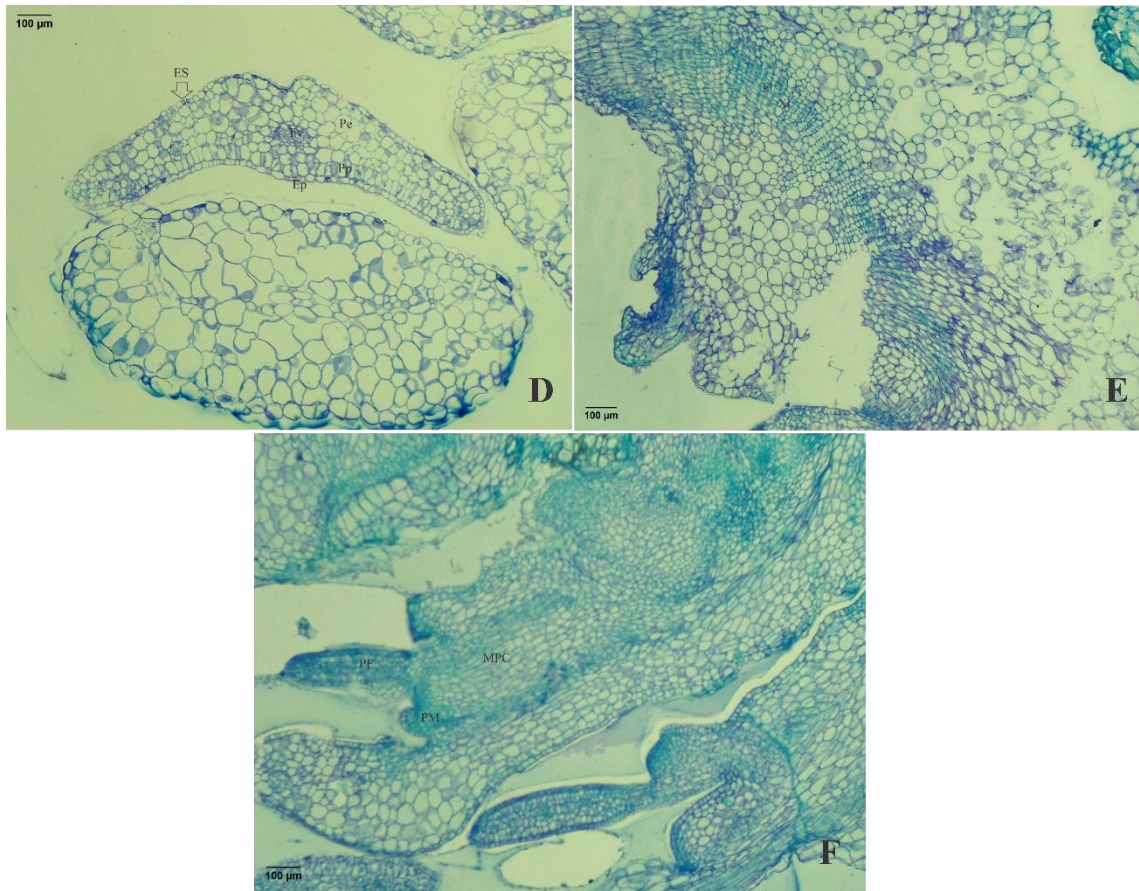


Legenda: A- A imagem apresenta o corte histológico feito na amostra 1 pertencente ao calo de ápice caulinar de *E. grandis*. No tecido foi possível identificar a Epiderme (Ep), o Parênquima paliçádico (Pp), o Parênquima esponjoso (Pe), o Estômato (Es) e um Feixe vascular (Fv). Tais componentes são comumente visualizados em tecidos foliares. B- A imagem mostra o corte histológico feito na amostra 1, que pertence ao calo de ápice caulinar de *E. grandis*. Nesse corte foi identificada a Protoderme (Pd), o Sistema condutor (Sc), a Região cortical (Co) e a Região medular (Me). A organização e os tipos teciduais identificados nesse corte lembram os mesmos vistos em corte de caules vegetais. C- Nesta imagem da amostra 1 de *E. grandis*, foi feito o registro de um meristema apical caulinar (MPC) crescendo na extremidade do tecido vegetal. Além do meristema, também estão presentes no tecido o Sistema condutor (Sc) e a Região medular (Me).

Fonte: elaboração própria.

O mesmo pode ser encontrado nas fotos das lâminas da amostra 2, que também eram provenientes do calo de *E. grandis*. As primeiras lâminas mostravam as estruturas de uma folha, as lâminas seguintes mostravam a estruturas de um caule e, por fim, algumas lâminas continham muitos sistemas condutores e também foi possível detectar a formação de ápice caulinar (Figura 13 A-C).

Figura 13 – Cortes histológicos da amostra 2 de *Eucalyptus grandis*.



Legenda: D – A imagem apresenta a vista do corte histológico feito na amostra 2 pertencente a *Eucalyptus grandis*. Na imagem foi identificada a Epiderme (Ep), o Parênquima paliádico (Pp), o Parênquima esponjoso (Pe) e um Feixe vascular (Fv). Tal conformação histológica é normalmente observada ao se visualizar tecidos foliares. E- Na imagem pertencente a amostra 2 de *E grandis*, foi feita a identificação dos sistemas condutores Xilema (Xi) e Floema (Fl). F – Na terceira foto, também proveniente da amostra 2 de *E. grandis*, visualiza-se a presença de um Meristema Apical Caulinar (MPC), com a identificação da região do Promeristema (PM) e do Primórdio Foliar (PF).

Fonte: elaboração própria.

O calo de ápice caulinar escolhido de *E. urophylla*, teve 10 brotações cortadas de sua superfície (Figura 14), e assim como o que foi feito para *E. grandis*, após a remoção dos brotos o calo foi cortado ao meio e suas duas partes foram emblocadas separadamente sendo denominadas amostra 3 e amostra 4. Nas primeiras lâminas da amostra 3 de *E. urophylla*, aquelas mais superficiais, somente observou-se um aglomerado de células com características de uma massa calogênica. À medida que se seguiram os cortes no material emblocado, a única coisa a ser visualizada nessa amostra eram as células de calos (Figura 15 A). Tal fato era esperado, pois ao se observar o calo em placa de Petri era possível visualizar regiões sem a

presença de brotos, principalmente aquelas que ficavam em contato com o meio de cultura ou invés de estarem voltadas para a fonte luminosa.

Figura 14 - Imagem do calo e brotações retiradas de *Eucalyptus urophylla*.

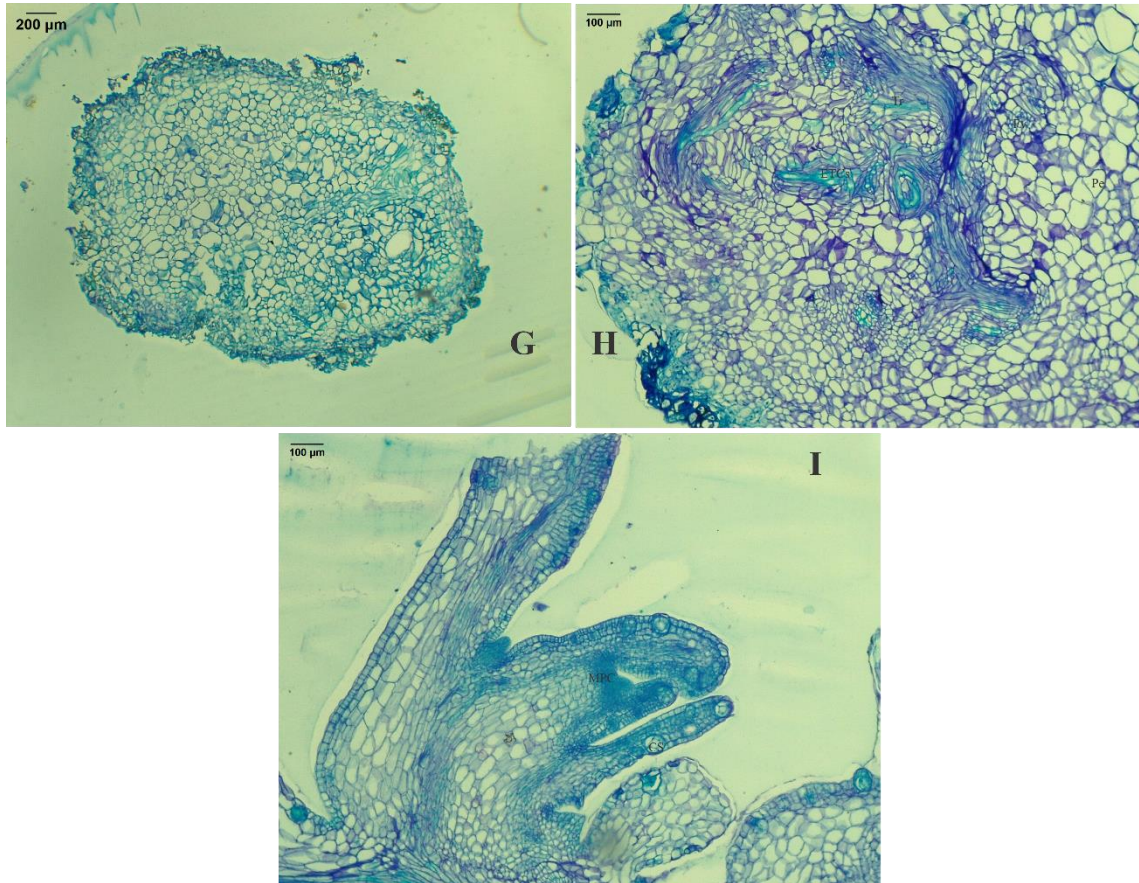


Legenda: A figura mostra a aparência do calo de ápice caulinar de *Eucalyptus urophylla* escolhido para a etapa de histologia antes de ser embocado. À esquerda estão as brotações que foram seccionadas da superfície do calo. Foram contadas ao todo 10 brotações retiradas do calo de *E. urophylla*.

Fonte: elaboração própria.

No que se refere a amostra 4 de *E. urophylla*, nas lâminas com os cortes superficiais, o que se visualizava era a presença de estruturas que lembravam sistemas vasculares, porém sem uma forma muito organizada (Fig 15 B). Conforme se avança nas lâminas dos cortes, as estruturas dos sistemas condutores começam a ficar um pouco mais claras, porém essas estruturas ainda se apresentavam de maneira desorganizada dentro do tecido vegetal. Por fim, algumas lâminas da amostra 4 mostraram, além dos sistemas condutores desorganizados, a presença de uma estrutura semelhante a um ápice caulinar se formando na região superficial do tecido do calo (Figura 15 C).

Figura 15 - Cortes histológicos da amostra 3 de *Eucalyptus urophylla*.

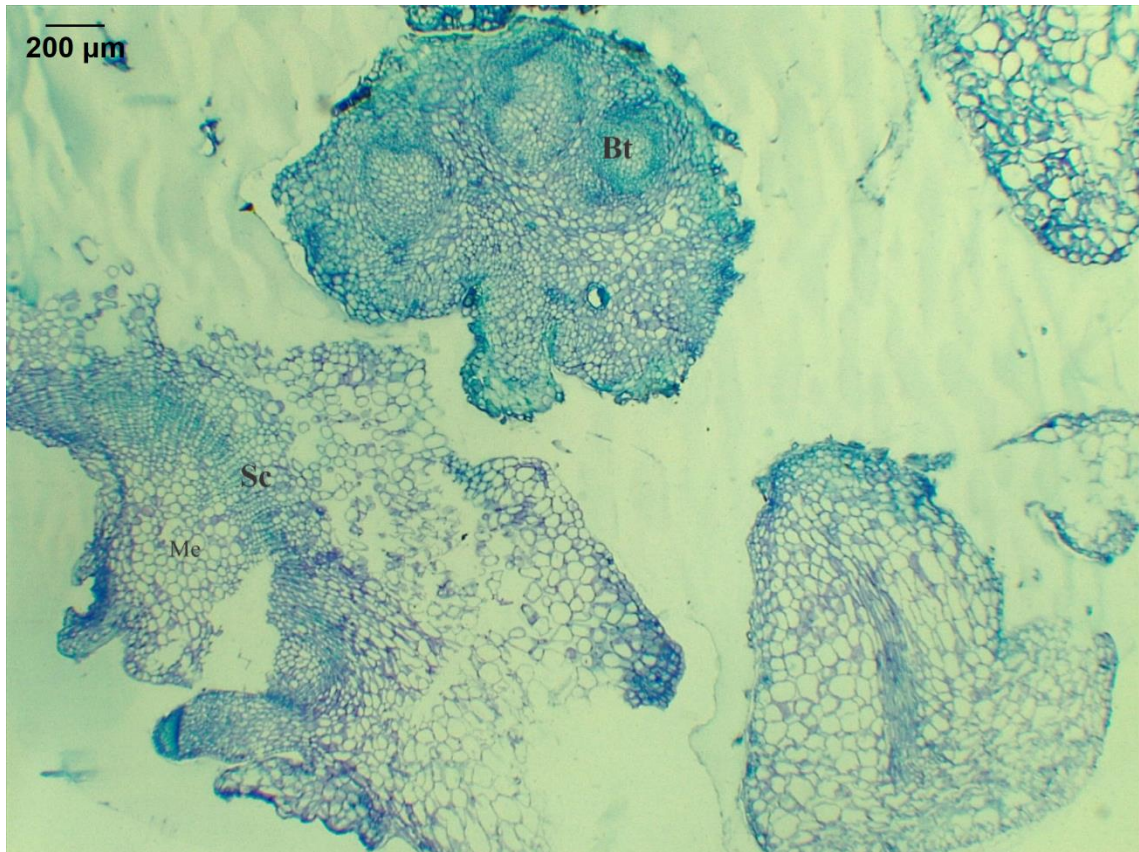


Legenda: G – A imagem mostra o corte histológico feito na amostra 3 pertencente ao calo de *Eucalyptus urophylla*. Nesse corte tudo que pode ser visualizado é tecido caloso. H- Essa imagem pertence ao corte feito na amostra 4 do calo de *Eucalyptus urophylla*, nela foi identificada a presença de Sistemas condutores desorganizados (Sc). I - A última imagem, também da amostra 4 de *Eucalyptus urophylla*, mostra o crescimento de um Meristema Apical Caulinar na extremidade do tecido vegetal, juntamente com a formação de Cavidades Secretoras (CS).

Fonte: elaboração própria.

Imagens das lâminas tanto de *E. grandis* quanto de *E. urophylla*, mostraram a presença de formação de brotos em partes do tecido caloso que estava próximo a sistemas condutores (Figura 16). Tais sistemas condutores eram formados tanto por células mais jovens quanto por células mais maduras (Figura 17).

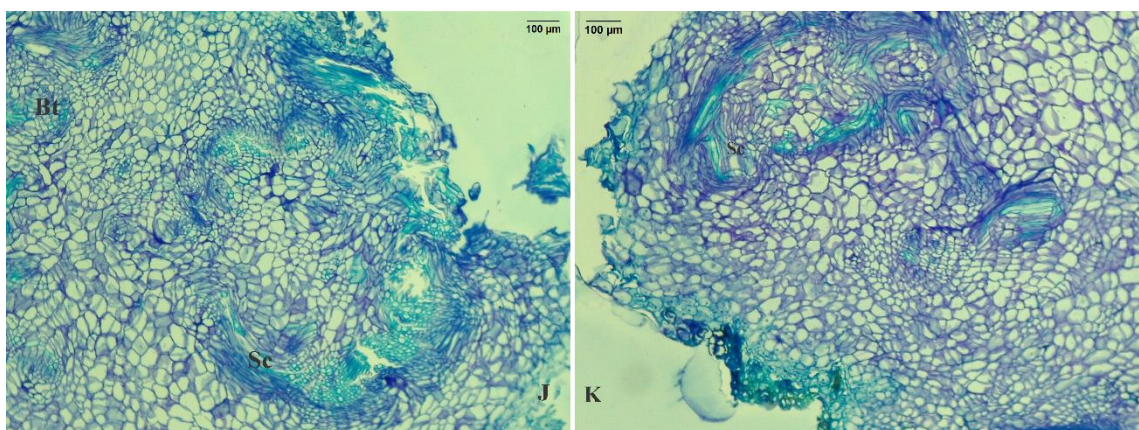
Figura 16 – Regiões de formação de brotações presentes nos cortes histológicos.



Legenda: Na imagem, referente a amostra 1 do calo de *E. grandis*, pode-se visualizar a presença de regiões de formação de Brotações (Bt) próximas aos Sistemas condutores.

Fonte: elaboração própria.

Figura 17 – Sistemas condutores jovens e maduros encontrados nos tecidos.



Legenda: J- Na imagem, referente a amostra 4 de *Eucalyptus urophylla*, mostra uma visão de sistemas condutores (Sc) maduros localizados próximos as regiões de formação de brotações (Bt). K- A imagem, também relativa a amostra 4 de *E. urophylla*, apresenta a identificação de Sistemas condutores (Sc) mais jovens se formando no tecido do calo.

Fonte: elaboração própria.

A formação de brotos em calos não é um processo simples, podendo envolver diferentes fatores, tais como o estímulo mediante a ação dos reguladores de crescimento vegetal das células indiferenciadas que compõe os calos, que podem ser induzidas a diferenciação e dar origem a vários tipos de células vegetais, incluindo aquelas que formam brotações (YANG et. al,2023; KEAN-GALENO et. al,2024). Além das células indiferenciadas, a ativação de células meristemáticas que se encontravam dormentes nos tecidos dos calos pode ser outro fator a contribuir para a formação de brotos. Tais células meristemáticas podem advir de células do parênquima, que tem a capacidade de se desdiferenciar e dar origem aos meristemas (NICOLAS et. al,2022). Já em plantas lenhosas o procâmbio, tecido meristemático que dá origem ao câmbio vascular em tecidos maduros, pode ser estimulado a originar sistemas vasculares que contribuem para a formação de brotações (WANG et. al,2018; ZHU et. al, 2020; MCKIM et. al, 2019; NAKAMASU et. al, 2019).

Estudos sobre organogênese indireta em espécies de eucalipto descreveram que o desenvolvimento de calos e o surgimento de brotações estariam intimamente relacionados com o aparecimento de regiões com atividade meristemática próximas aos feixes vasculares (ZICHNER ZORZ et. al,2020). Tais regiões teriam a chamada competência organogênica, que seria a capacidade de formação das células desdiferenciadas que originam os calos, assim como a capacidade promover a diferenciação necessária, mediante o estímulo correto dos reguladores de crescimento vegetal, para a formação dos brotos adventícios (MYCOCK et. al, 2012; AGGARWA et. al, 2010).

Dito isso, a formação das brotações possivelmente se originou de células com atividade meristemática que se encontravam próximas aos sistemas vasculares, que ficavam mais evidentes no tecido a medida que se avançava nos cortes das amostras de calos, ou seja, mais internamente no calo. Quanto ao tipo de explante, o ápice caulinar se mostrou mais eficiente que os demais por possuir uma maior porcentagem de brotações em ambos os genótipos, sendo o tecido recomendável para protocolos que tenham como objetivo alcançar uma grande quantidade de brotações. Análise de cortes histológicos ajudam a ter uma visão mais aprofundada do material vegetal trabalhado, fornecendo informações visuais sobre a origem das brotações, o que é essencial para estudos subsequentes em cultura de tecidos, tais como a transformação genética, pois sabendo de qual porção do calo se originam as brotações, seria possível elaborar um protocolo focado para que a célula bacteriana competente a transformação pudesse ser colocada em contato direto com a área de tecido vegetal que dará origem ao futuro

broto, visto que transformar áreas do tecido que não se tornaram brotações significaria um insucesso da transformação genética. Ademais, a escolha referente a qual etapa do experimento seria a melhor para selecionar os explantes que passariam pela transformação genética também é um ponto chave. Nesse experimento, os calos se formaram por completo após os 30 dias em calogênese e as brotações após 30 dias em regeneração. Então, o momento indicado para a seleção dos calos para a transformação genética seria entre 10 a 15 dias da etapa de regeneração, pois no começo dessa etapa os brotos estariam começando o processo regenerativo, e ao fazer a secção desses calos poderia ser possível observar a região do início da formação dos brotos e direcionar as bactérias competentes para tal região. (DOBROWOLSKA et. al,2017).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A formação de brotos foi mais eficiente em *Eucalyptus grandis*, com $0,025 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de TDZ promovendo o maior número de brotações (uma média de 67% de calos com brotos), enquanto que em *E. urophylla* tanto $0,025 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ quanto $0,050 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ favoreceram o desenvolvimento de brotos (médias de 36% e 32% respectivamente). Os ápices caulinares destacaram-se como o explante mais adequado, possivelmente devido à presença de células meristemáticas, alta atividade metabólica e equilíbrio hormonal, que potencializam a totipotência e o desenvolvimento morfogênico. Ao passo que os calos foliares e de cotilédones não tiveram um bom desempenho durante a etapa de regeneração. As análises histológicas evidenciaram que os brotos surgem preferencialmente próximos aos sistemas condutores do explante original, onde feixes vasculares jovens se dispõem junto aos maduros, fornecendo suporte estrutural e sinalização local que favorecem a regeneração. Esses resultados geraram informações úteis sobre como as escolhas do genótipo, do tipo de explante e da concentração de reguladores de crescimento influenciam as etapas de calogênese e a regeneração de brotos em eucaliptos. As análises histológicas mostraram a localização da origem das brotações, informação bastante importante para protocolos subsequentes de transformação genética.

REFERÊNCIAS

ABIRI, R. et al. The prospect of physiological events associated with the micropropagation of *Eucalyptus* sp. **Forests**, v. 11, n. 11, p. 1211, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/f11111211>.

AGGARWAL, D.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Shoot organogenesis in elite clones of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 102, n. 1, p. 45–52, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9703-y>.

AL-AHMAD, H. In vitro decoated seed germination and seedling development for propagation of wild mandrake (*Mandragora autumnalis* Bertol.). **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1339, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9101339>.

AL-AIZARI, A. A.; AL-OBEED, R. S.; MOHAMED, M. A. H. Improving micropropagation of some grape cultivars via boron, calcium and phosphate. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 48, p. 95–100, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.10.002>.

ALI, H. M.; KHAN, T.; KHAN, M. A.; ULLAH, N. The multipotent thidiazuron: a mechanistic overview of its roles in callogenesis and other plant cultures in vitro. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 6, p. 2624–2640, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/bab.2311>.

AL-MAYAHI, A. M. W. Effect of calcium and boron on growth and development of callus and shoot regeneration of date palm ‘Barhee’. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 100, n. 4, p. 357–364, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjps-2019-0178>.

ALVARENGA, I. C. A.; SILVA, S. T.; VILELA BERTOLUCCI, S. K.; PINTO, J. E. B. P.; PACHECO, F. V. Application of thidiazuron (TDZ) for in vitro multiplication of yarrow (*Achillea millefolium* L.) and profile of volatile compounds. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 10, p. 948–953, 2015. Disponível em: <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.659890807524884>. Acesso em: 28 out. 2025.

ANTHONYDHASON, V.; GOPAL, J.; CHUN, S.; MUTHU, M. Nanocarbon effect of smoking biofilms for effective control. **Journal of Cluster Science**, v. 29, p. 541–548, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10876-017-1291-2>.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF). Anuário estatístico da ABRAF 2012: ano base 2011. Brasília, DF: ABRAF, 2012. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas.asp>. Acesso em: 10 abr. 2013.

ASSIS, A. L. Avaliação de modelos polinomiais segmentados e não segmentados na estimativa de diâmetros e volumes comerciais de *Pinus taeda*. 2000. 198 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL (BRACELPA). Panorama do setor. 2012. Disponível em: <http://www.bracelpa.org.br>. Acesso em: 15 abr. 2013.

- BAG, N.; CHANDRA, S.; PALNI, L. M. S.; NANDI, S. K. Micropropagation of Dev-ringal [*Thamnocalamus spathiflorus* (Trin.) Munro] — a temperate bamboo, and comparison between in vitro propagated plants and seedlings. **Plant Science**, v. 156, p. 125–135, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00235-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00235-6).
- BANDARA, K. M. A.; ARNOLD, R. J. Genetic variation of growth and log end-splitting in second-generation *Eucalyptus grandis* in Sri Lanka. **Australian Forestry**, v. 80, n. 4, p. 264–271, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/00049158.2017.1347982>.
- BATISTA, D. S. et al. Light quality in plant tissue culture: does it matter? In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 54, p. 195–215, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9902-5>.
- BOHLENIUS, H. et al. CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. **Science**, v. 312, n. 5776, p. 1040–1043, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1126038>.
- BRONDANI, G. E. et al. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* × *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 4, p. 627–635, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i4.9891>.
- BRONDANI, G. E. et al. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 48, p. 478–487, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9443-z>.
- BRUNONI, F. et al. Adventitious rooting adjuvant activity of 1,3-di(benzo[d]oxazol-5-yl)urea and 1,3-di(benzo[d]oxazol-6-yl)urea: new insights and perspectives. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, p. 111–124, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0466-0>.
- BUNN, E. Development of in vitro methods for ex situ conservation of *Eucalyptus impensa*, an endangered mallee from southwest Western Australia. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 83, p. 97–102, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-005-2382-0>.
- BURRIS, J. N.; MANN, D. G. J.; JOYCE, B. L.; STEWART JR., C. N. An improved tissue culture system for embryogenic callus production and plant regeneration in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **BioEnergy Research**, v. 2, n. 4, p. 267–274, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12155-009-9057-8>.
- BYRNE, M. Phylogeny, diversity and evolution of eucalypts. In: **SHARMA, A. (ed.)**. *Plant genome: biodiversity and evolution*. Enfield: Science Publishers, 2008. p. 303–346.
- CASSELLS, A. C. Pathogen and biological contamination management in plant tissue culture: phytopathogens, vitro pathogens, and vitro pests. In: **LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (eds.)**. *Plant cell culture protocols*. Totowa: Humana Press, 2012. v. 877, p. 57–80.
- ÇELIKEL, F. G.; ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; REID, M. S.; JIANG, C.-Z. A cytokinin analog thidiazuron suppresses shoot growth in potted rose plants via the gibberellic acid pathway.

Frontiers in Plant Science, v. 12, p. 639717, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.639717>.

CHAVEZ, V. M.; LITZ, R. E.; MONROY, M.; MOON, P. A.; VOVIDES, A. M. Regeneration of *Ceratozamia euryphyllidia* (Cycadales, Gymnospermae) plants from embryogenic leaf cultures derived from mature-phase trees. **Plant Cell Reports**, v. 17, n. 8, p. 612–616, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002990050444>.

CHEN, J.; ZIV, M. The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-cultured *Narcissus*. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 22–27, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002990000276>.

CHEN, Y. C.; CHANG, C.; CHANG, W. C. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 36, n. 5, p. 420–423, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0075-5>.

CORREIA, D.; ARAÚJO, J. D. M.; NASCIMENTO, E. H. S.; SILVA JÚNIOR, J. M. T.; BESSA, M. C. Otimização da produção de mudas de *Cattleya labiata*: efeito da sacarose no crescimento in vitro e na aclimatização. **Embrapa Agroindústria Tropical – Circular Técnica**, Fortaleza, n. 206, 2012. Disponível em: <https://www.embrapa.br>. Acesso em: 28 out. 2025.

CORREIA, D.; BERNADO, J. C. Propagação in vitro de *Echinocactus grusonii*. **Embrapa Agroindústria Tropical – Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 206, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br>. Acesso em: 28 out. 2025.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (eds.). *Micropropagation: technology and application*. Dordrecht: **Springer**, 1991. p. 1–13.

DE FOSSARD, R.; BENNETT, M.; GORST, J.; BOURNE, R. Tissue culture propagation of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. **International Plant Propagators' Society Combined Proceedings**, v. 28, p. 427–435, 1978.

DE OLIVEIRA COSTA, A. et al. Shoot proliferation and in vitro organogenesis from shoot apex and cotyledonary explants of royal poinciana (*Delonix regia*), an ornamental leguminous tree. **Trees**, v. 34, p. 189–197, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01910-w>.

DE OLIVEIRA, L. S. et al. Optimal cytokinin/auxin balance for indirect shoot organogenesis of *Eucalyptus cloeziana* and production of ex vitro rooted micro-cuttings. **Journal of Forestry Research**, v. 33, p. 1573–1584, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11676-021-01369-5>.

DE OLIVEIRA, L. S. et al. Micropropagation and in vitro rejuvenation of *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. **Biotech**, v. 14, p. 292, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-024-04131-2>.

DLAMINI, L. N.; PIPATWATTANAKUL, D.; MAELIM, S. Growth variation and heritability in a second-generation *Eucalyptus urophylla* progeny test at Lad Krating Plantation, Chachoengsao province, Thailand. **Agriculture and Natural Resources**, v. 51, n. 3, p. 158–162, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anres.2016.12.005>.

DOBROWOLSKA, I.; ANDRADE, G. M.; CLAPHAM, D. et al. Histological analysis reveals the formation of shoots rather than embryos in regenerating cultures of *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, p. 319–326, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1111-5>.

DURAND-CRESSWELL, R.; BOULAY, M.; FRANCKET, A. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.). *Tissue Culture in Forestry*. Dordrecht: **Springer Netherlands**, 1982. p. 150–181.

DURÁN-MEDINA, Y.; DÍAZ-RAMÍREZ, D.; MARSCH-MARTÍNEZ, N. Cytokinins on the move. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 146, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00146>.

EFFERTH, T. Biotechnology applications of plant callus cultures. **Engineering**, v. 5, n. 1, p. 50–59, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>.

EL-ESAWI, M. A. Micropropagation technology and its applications for crop improvement. In: ANIS, M.; AHMAD, N. (Ed.). *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. Singapore: **Springer**, 2016. p. 523–545.

ERLAND, L. A. E. et al. The morphoregulatory role of Thidiazuron: Metabolomics-guided hypothesis generation for mechanisms of activity. **Biomolecules**, v. 10, n. 9, p. 1253, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10091253>.

FAGUNDES, E. et al. Effect of thidiazuron concentration and application period on ‘Royal Gala’ apple fruiting and production. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 4, p. e-097, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-29452017097>.

FAO. **FAOSTAT** statistical database. 2021. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/>. Acesso em: 30 out. 2023.

FENG, Q. et al. Highly efficient, genotype-independent transformation and gene editing in watermelon (*Citrullus lanatus*) using a chimeric ClGRF4-GIF1 gene. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 63, n. 12, p. 2038–2042, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/jipb.13199>.

FERRANTE, A. et al. Treatment with thidiazuron for preventing leaf yellowing in cut tulips and chrysanthemum. **Acta Horticulturae**, v. 624, p. 357–363, 2003. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.624.49>.

FERREIRA, M.; SANTOS, P. E. T. Melhoramento genético florestal dos *Eucalyptus* no Brasil: breve histórico e perspectivas. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Anais... Colombo: Embrapa-CNPq**, 1997. p. 14–34.

FINER, J. J.; KRIEBEL, H. B.; BECWAR, M. R. Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). **Plant Cell Reports**, v. 8, n. 4, p. 203–206, 1989.

FRICK, E. M.; STRADER, L. C. Roles for IBA-derived auxin in plant development. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, p. 169–177, 2018.

GAGO, D. et al. Effect of sucrose on growth and stress status of *Castanea sativa* × *C. crenata* shoots cultured in liquid medium. **Plants**, v. 11, p. 965, 2022.

GAGO, D. et al. The effect of sucrose supplementation on the micropropagation of *Salix viminalis* L. shoots in semi-solid medium and temporary immersion bioreactors. **Forests**, v. 12, p. 1408, 2021.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. D. The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G.-J. D. (Ed.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Dordrecht: **Springer**, 2007. p. 65–113.

GHOSH, A.; IGAMBERDIEV, A. U.; DEBNATH, S. C. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis and changes of antioxidant properties in tissue cultures of half-high blueberry plants. **Scientific Reports**, v. 8, p. 16978, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35233-6>.

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

GORDON-KAMM, B. et al. Using morphogenic genes to improve recovery and regeneration of transgenic plants. **Plants**, v. 8, p. 38, 2019.

GRANATEK, C. H.; COCKERLINE, A. W. Callus formation versus differentiation of cultured barley embryos: hormonal and osmotic interactions. **In Vitro**, v. 14, n. 2, p. 212–217, 1978.

GUAN, C. M. et al. Hormone-regulated inflorescence induction and TFL1 expression in *Arabidopsis* callus in vitro. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 1133–1137, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0165-y>.

GUO, B. et al. Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 45, p. 8984–9000, 2013. DOI: <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i45>.

GUO, B.; STILES, A. R.; LIU, C. Z. Thidiazuron enhances shoot organogenesis from leaf explants of *Saussurea involucreata* Kar. et Kir. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 48, p. 609–612, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9468-6>.

HESAMI, M. et al. Effect of plant growth regulators on indirect shoot organogenesis of *Ficus religiosa* through seedling-derived petiole segments. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 175–180, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.11.001>.

HINCHEE, M. et al. Short-rotation woody crops for bioenergy and biofuels applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 45, n. 6, p. 619–629, 2009.

HUANG, Z.; LI, H. Control of oxidative stress by a combination of PBU, BAP and DMTU enhances adventitious shoot formation in *Eucalyptus urophylla*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 141, p. 533–541, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01812-7>.

HURMEKOSKI, E. et al. Diversification of the forest industries: role of new wood-based products. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 48, n. 12, p. 1417–1432, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjfr-2018-0116>.

HWANG, I.-T. et al. Production of Baicalin, Baicalein, and Wogonin on plant tissue culture of *Scutellaria baicalensis*. **Korean Journal of Plant Resources**, v. 28, p. 526–532, 2015.

IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório anual 2024**. Brasília, DF, 2024. Disponível em: <https://iba.org/publicacoes>. Acesso em: 10 mar. 2025.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Tabela 291: quantidade produzida e valor da produção na silvicultura, por tipo de produto da silvicultura. **Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA**, 2021. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/291>. Acesso em: 10 mar. 2025.

IKEDA, M.; OHME-TAKAGI, M. TCPs, WUSs, and WINDs: families of transcription factors that regulate shoot meristem formation, stem cell maintenance, and somatic cell differentiation. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 427, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00427>. Acesso em: 10 mar. 2025.

IKEUCHI, M. et al. Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes. *Plant Physiology*, v. 175, n. 3, p. 1158–1174, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.17.01035>. Acesso em: 10 mar. 2025.

IPEF – INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS. Levantamento do nível de mecanização na silvicultura: edição 2024/2025 = **Silviculture mechanization index survey**: 2024/2025 edition. Saulo Philipe Sebastião Guerra et al. Piracicaba: IPEF, 2025. 90 p.

ISAH, T. De novo in vitro shoot morphogenesis from shoot tip-induced callus cultures of *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. ex Sm. **Biological Research**, v. 52, n. 3, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0211-1>. Acesso em: 10 mar. 2025.

JAFARI, M.; DANESHVAR, M. H.; LOTFI, A. In vitro shoot proliferation of *Passiflora caerulea* L. via cotyledonary node and shoot tip explants. **BioTechnology**, v. 98, n. 2, p. 113–119, 2017. DOI: 10.5114/bta.2017.68310.

JIANG, F. et al. Involvement of plant stem cells or stem cell-like cells in dedifferentiation. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1028, 2015.

JONES, M. P. A. et al. The mode of action of thidiazuron: auxins, indoleamines, and ion channels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 1481–1490, 2007. DOI: 10.1007/s00299-007-0357-0.

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

JUI, Z. S. et al. In vitro seed germination and seedling development of *Mimusops laurifolia* (Forssk.) Friis: An endangered plant species. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 143-153, 2023. DOI: 10.3329/ptcb.v33i2.70439.

KADOKURA, S. et al. Characterization of somatic embryogenesis initiated from the *Arabidopsis* shoot apex. **Developmental Biology**, v. 442, n. 1, p. 13-27, 2018. DOI: 10.1016/j.ydbio.2018.04.023.

KAPCHINA-TOTEVA, V.; VAN TELGEN, H. J.; YAKIMOVA, E. Role of phenylurea cytokinin CPPU in apical dominance release in in vitro cultured *Rosa hybrida* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 19, p. 232-237, 2000. DOI: 10.1007/s003440000013.

KAUR, S. In vitro regeneration of shoots from nodal explants of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. **Journal of Horticultural Research**, v. 25, p. 27-34, 2017.

KEAN-GALENO, T.; LOPEZ-ARREDONDO, D.; HERRERA-ESTRELLA, L. The shoot apical meristem: An evolutionary molding of higher plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, p. 1519, 2024. DOI: 10.3390/ijms25031519.

KENDURKAR, S. V.; RANGASWAMY, M. Genetic transformation in *Eucalyptus*. In: GOSAL, S. S.; WANI, S. H. (eds.). **Biotechnologies of crop improvement**. Cham: Springer, 2018. v. 2, p. 335-366.

KHAN, T. et al. Differential effects of thidiazuron on production of anticancer phenolic compounds in callus cultures of *Fagonia indica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, p. 46-58, 2016. DOI: 10.1007/s12010-016-1978-y.

KIM, D. H.; GOPAL, J.; SIVANESAN, I. Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. **RSC Advances**, v. 7, p. 36492-36505, 2017.

KIMURA, R.; SILVA, B. K.; SUN, C. A needle in a haystack: projecting the climate impacts on Brazil's pulp and paper industry. **Forest Policy and Economics**, v. 170, p. 103393, 2025. DOI: 10.1016/j.forpol.2024.103393.

KLIMEK-CHODACKA, M. et al. Effective callus induction and plant regeneration in callus and protoplast cultures of *Nigella damascena* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 143, p. 693-707, 2020. DOI: 10.1007/s11240-020-01953-9.

KOU, Y. P. et al. Thidiazuron triggers morphogenesis in *Rosa canina* L. protocorm-like bodies by changing incipient cell fate. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 557, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.00557.

KRUGLOVA, N. N.; SELDIMIROVA, O. A.; ZINATULLINA, A. E. In vitro callus as a model system for the study of plant stress-resistance to abiotic factors (on the example of cereals). **Biology Bulletin Reviews**, v. 8, p. 518-526, 2018. DOI: 10.1134/S2079086418060063.

KRUGLOVA, N.; ZINATULLINA, A.; YEGOROVA, N. Histological approach to the study of morphogenesis in callus cultures in vitro: a review. **International Journal of Plant Biology**, v. 14, n. 2, p. 533-545, 2023. DOI: 10.3390/ijpb14020042.

KUMARI, A. et al. Plant growth regulator interactions in physiological processes for controlling plant regeneration and in vitro development of *Tulbaghia simmleri*. **Journal of Plant Physiology**, v. 223, p. 65-71, 2018. DOI: 10.1016/j.jplph.2018.01.005.

KUPPUSAMY, S. et al. Optimizing the sterilization methods for initiation of five different clones of *Eucalyptus* hybrid species. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101361, 2019.

LE ROUX, J. J.; VAN STADEN, J. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus*: a review. **Tree Physiology**, v. 9, n. 4, p. 435-477, 1991. DOI: 10.1093/treephys/9.4.435.

LESHEM, B.; RONEN, R.; LURIE, S. Thidiazuron and paclobutrazol appear to mimic cytokinin and auxin influences on organ regeneration and protein profiles in cultured melon cotyledons. **Journal of Plant Physiology**, v. 143, n. 3, p. 344-348, 1994. DOI: 10.1016/S0176-1617(11)81642-1.

LEVA, A. (Ed.). Recent advances in plant in vitro culture. London: **InTech**, 2012.

LIEBER, M. M. New practical and theoretical approaches to the induction of morphogenesis from plant tumors in vitro using new types of plant growth regulators: towards constructive paradigms in agriculture and medicine. **Theoretical Biology Forum**, v. 106, n. 1-2, p. 73-87, 2013.

LONGUE JÚNIOR, D.; COLODETTE, J. L. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, 2013. DOI: 10.4336/2013.pfb.33.76.528.

LOPES DA SILVA, A. L. et al. Micropropagation of *Eucalyptus saligna* Sm. from cotyledonary nodes. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, p. 311-318, 2015.

LU, C. Y. The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 29, p. 92-96, 1993. DOI: 10.1007/BF02632259.

MA, J. et al. The long road to bloom in conifers. **Forest Research**, v. 2, n. 1, p. 16, 2022. DOI: 10.48130/fr-2022-0016.

MARTINI, A. J. O plantador de eucaliptos: a questão da preservação florestal no Brasil e o resgate documental do legado de Edmundo Navarro de Andrade. 2004. **Dissertação (Mestrado em História Social) – Universidade de São Paulo, São Paulo**, 2004. DOI: 10.11606/D.8.2004.tde-04062004-231644. Acesso em: 1 out. 2025.

MARTIN, C. Celulose de fibra curta conquista novos mercados. **O Papel**, n. 2, p. 34-36, 2012.

MCKIM, S. M. How plants grow up. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 61, n. 3, p. 257-277, 2019. DOI: 10.1111/jipb.12786.

- MEKONEN, G.; EGIGU, M. C.; MUTHUSWAMY, M. In vitro propagation of banana (*Musa paradisiaca* L.) plant using shoot tip explant. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, v. 9, n. 12, p. 2339-2346, 2021. DOI: 10.24925/turjaf.v9i12.2339-2346.2883.
- MOHAMED, R. et al. Populus CEN/TFL1 regulates first onset of flowering, axillary meristem identity and dormancy release in Populus. **The Plant Journal**, v. 62, n. 4, p. 674-688, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04185.x.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- MYCOCK, D. J.; WATT, M. P. Shoot and root morphogenesis from *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* callus. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 101, p. 16669-16676, 2012. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/130019>. Acesso em: 28 out. 2025.
- NAGLE, M.; DEJARDIN, A.; PILATE, G.; STRAUSS, S. H. Opportunities for innovation in genetic transformation of forest trees. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1443, 2018. DOI: 10.3389/fpls.2018.01443.
- NAKAMASU, A.; HIGAKI, T. Theoretical models for branch formation in plants. **Journal of Plant Research**, v. 132, p. 325-333, 2019. DOI: 10.1007/s10265-019-01107-9.
- NALAPALLI, S. et al. Morphogenic regulators and their application in improving plant transformation. In: BANDYOPADHYAY, A.; THILMONY, R. (ed.). **Rice genome engineering and gene editing**. New York: Humana, 2021. v. 2238, p. 37-60. (Methods in Molecular Biology).
- NATHAN, A. M. et al. Genotype-independent plant transformation. **Horticulture Research**, v. 9, p. uhac047, 2022. DOI: 10.1093/hr/uhac047.
- NAZIRAH, A. et al. Development of an efficient micropropagation protocol for *Eucalyptus* hybrid (*E. urophylla* × *E. grandis*) through axillary shoot proliferation. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 33, p. 391-397, 2021.
- NGOMUO, M.; MNENEY, E.; NDAKIDEMI, P. A. The in vitro propagation techniques for producing banana using shoot tip cultures. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 1614-1622, 2014.
- NGUYEN, Q. T.; XIAO, Y.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. In: KOZAI, T.; NIU, G.; TAKAGAKI, M. (ed.). **Plant factory: an indoor vertical farming system for efficient quality food production**. 2. ed. New York: Academic Press, 2020. p. 333-346.
- NICOLAS, A.; LAUFS, P. Meristem initiation and de novo stem cell formation. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 891228, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.891228.

NISLER, J. et al. Diphenylurea-derived cytokinin oxidase/dehydrogenase inhibitors for biotechnology and agriculture. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 2, p. 355-370, 2021. DOI: 10.1093/jxb/eraa437.

NISLER, J. TDZ: mode of action, use and potential in agriculture. In: AHMAD, N.; FAISAL, M. (ed.). Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator. Singapore: **Springer**, 2018. DOI: 10.1007/978-981-10-8004-3_2.

OBERSCHELP, G. P. J. et al. Eucalyptus dunnii Maiden plant regeneration via shoot organogenesis on a new basal medium based on the mineral composition of young stump shoots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 51, n. 6, p. 626-636, 2015. DOI: 10.1007/s11627-015-9715-8.

OKOROAFOR, U. E. Microbial contamination in plant tissue culture and elimination strategies. **Nigerian Agricultural Journal**, v. 53, n. 2, p. 348-355, 2022. Disponível em: <http://www.ajol.info/index.php/naj>. Acesso em: 28 out. 2025.

PAI, S. R.; DESAI, N. S. Effect of TDZ on Various Plant Cultures. In: AHMAD, N.; FAISAL, M. (eds.). Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator. **Springer**, Singapore, 2018.

PARK, H. Y.; KIM, D. H.; SIVANESAN, I. Micropropagation of *Ajuga* species: A mini review. **Biotechnology Letters**, v. 39, p. 1291–1298, 2017.

PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different Media Requirements for Micropropagation of Apricot Cultivars. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 133–141, 2000.

PERIANEZ-RODRIGUEZ, J.; MANZANO, C.; MORENO-RISUENO, M. A. Post-embryonic organogenesis and plant regeneration from tissues: two sides of the same coin? **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 219, 2014.

PERROT-RECHENMANN, C. Cellular Responses to Auxin: Division versus Expansion. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2010.

PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 55, p. 242–257, 2019.

POOVAIAH, C.; PHILLIPS, L.; GEDDES, B.; REEVES, C.; SORIEUL, M.; THORLBY, G. Genome editing with CRISPR/Cas9 in *Pinus radiata* (D. Don). **BMC Plant Biology**, v. 21, p. 363, 2021.

POTTS, B. M. et al. Exploration of the *Eucalyptus globulus* Gene Pool. In: *Eucalyptus in a Changing World*. Proceedings of IUFRO Conference, **Aveiro**, 11–15 October 2004.

POUREBAD, N.; MOTAFAKKERAZAD, R.; KOSARI-NASAB, M. et al. The influence of TDZ concentrations on in vitro growth and production of secondary metabolites by the shoot and callus culture of *Lallemantia iberica*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 122, p. 331–339, 2015.

PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Effects of Type of Explant and Age, Plant Growth Regulators and Medium Strength on Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 13–20, 2010.

RAM, A.; THOMAS, T. D. Advances in Direct and Indirect Organogenesis in Forest Trees: A Review. In: THOMAS, T. D.; RAZDAN, M. K.; KUMAR, A. (eds.). *Biotechnological Approaches for Sustaining Forest Trees and Their Products*. **Springer**, Singapore, 2024.

RASOULI, O.; AHMADI, N.; BEHMANESH, M.; DANESHI NERGI, M. A. Effects of BA and TDZ on postharvest quality and expression of laccase and aquaporin genes in cut rose ‘Sparkle’. **South African Journal of Botany**, v. 99, p. 75–79, 2015.

ROLIM, S. G. et al. Prioridades e lacunas de pesquisa e desenvolvimento em silvicultura de espécies nativas no Brasil. Working Paper. **WRI Brasil**, São Paulo, 2020.

SAEED, A. K. A. M.; HASSAN, G. A. S. Impact of thidiazuron, malic and citric acids on growth and flowering of *Rosa hybrida* L. cv. Arthur Bell. **International Journal of Health Sciences**, v. 6, n. S1, p. 11125–11142, 2022.

SALEHI, B. et al. Insights into *Eucalyptus* genus chemical constituents, biological activities and health-promoting effects. **Trends in Food Science and Technology**, v. 91, p. 609–624, 2019.

SALVO, S. A.; HIRSCH, C. N.; BUELL, C. R.; KAEPLER, S. M.; KAEPLER, H. F. Whole transcriptome profiling of maize during early somatic embryogenesis reveals altered expression of stress factors and embryogenesis-related genes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, e111407, 2014.

SCHELL, J.; KONCZ, C.; SPENA, A.; PALME, K.; WALDEN, R. Genes involved in the control of growth and differentiation in plants. **Gene**, v. 135, n. 1–2, p. 245–249, 1993.

SESSOU, A. F.; KAHIA, J. W.; HOUNGUE, J. A.; ATEKA, E. M.; DADJO, C.; AHANHANZO, C. In vitro propagation of three mosaic disease resistant cassava cultivars. **BMC Biotechnology**, v. 20, n. 1, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00645-8>.

SHARMA, A.; KAUR, R.; SHARMA, N. In vitro morphogenic response of different explants of *Gentiana kurroo* Royle from Western Himalayas—an endangered medicinal plant. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 20, p. 249–256, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0220-4>.

SHARMA, V.; ANKITA; KARNWAL, A.; SHARMA, S.; KAMAL, B.; JADON, V. S.; GUPTA, S.; SIVANASEN, I. A comprehensive review uncovering the challenges and advancements in the in vitro propagation of *Eucalyptus* plantations. **Plants**, v. 12, p. 3018, 2023. <https://doi.org/10.3390/plants12173018>.

SIJACIC, P.; LIU, Z. Novel insights from live-imaging in shoot meristem development. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 4, p. 393–399, 2010.

SILVA, L. D. da; GOMES, F. P.; ARAUJO, R. P.; PEREIRA, L. S.; DALMOLIN, A. C.; AMARAL, J. F. T. do. Antioxidative and osmoregulatory responses of *Jatropha curcas* to water stress are genotype dependent. **Australian Journal of Crop Science**, v. 16, n. 2, p. 192–200, 2022. <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.644676504998779>.

SIQUEIRA, B.; PETERS, J.; BENEDICTO, M. Valor de produção da silvicultura e da extração vegetal cresce 16,7% e soma R\$ 44,3 bilhões. **Agência IBGE Notícias, Editoria: Estatísticas Econômicas**, 2025. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/44556-valor-de-producao-da-silvicultura-e-da-extracao-vegetal-cresce-16-7-e-soma-r-44-3-bilhoes>. Acesso em: 1 out. 2025.

SIVANESAN, I.; MUTHU, M.; GOPAL, J.; TASNEEM, S.; KIM, D.-H.; OH, J.-W. A fumigation-based surface sterilization approach for plant tissue culture. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, p. 2282, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052282>.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118–130, 1957.

SOARES, T. S.; VALE, A. B.; LEITE, H. G.; MACHADO, C. C. **Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 6, p. 811–820, 2003.

SONG, J.; CHEN, C.; ZHU, S.; ZHU, M.; DAI, J.; RAY, U. et al. Processing bulk natural wood into a high-performance structural material. **Nature**, v. 554, n. 7691, p. 224–228, 2018. <https://doi.org/10.1038/nature25476>.

SOUZA, D. M. S. C.; AVELAR, M. L. M.; FERNANDES, S. B.; SILVA, E. O.; DUARTE, V. P.; MOLINARI, L. V.; BRONDANI, G. E. Spectral quality and temporary immersion bioreactor for in vitro multiplication of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **3 Biotech**, v. 10, p. 457, 2020.

STAC – Sustainable Tropical Agriculture Center. Silvicultura brasileira: tecnologia e sustentabilidade para atender a demanda global. **Centro de Agricultura Tropical Sustentável**, 2025. Disponível em: <https://www.stacusp.com.br/publicacao/silvicultura-brasileira-tecnologia-e-sustentabilidade-para-atender-demanda-global>. Acesso em: 21 jul. 2025.

STRADER, L. C.; BARTEL, B. Transport and metabolism of the endogenous auxin precursor indole-3-butyric acid. **Molecular Plant**, v. 4, p. 477–486, 2011.

SUGIMOTO, K., S.P. Gordon, E.M. Meyerowitz; Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? **Trends Cell Biol**, 21 (4) (2011), pp. 212-218.

SU, Y. H.; ZHANG, X. S. Auxin gradients trigger de novo formation of stem cells during somatic embryogenesis. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 7, p. 574-576, 2009.

- TEALE, W.; PAPONOV, I.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 847–859, 2006. <https://doi.org/10.1038/nrm2020>.
- TEWELD, S.; PATHARAJAN, S.; TEKA, Z.; SBHATU, D. B. Assessing the efficacy of broad-spectrum antibiotics in controlling bacterial contamination in the in vitro micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc). **The Scientific World Journal**, v. 2020, Article ID 6431301, p. 1–8, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6431301>.
- THORPE, T. A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 169–180, 2007.
- TRIVEDI, M.; YADAV, S. K.; YADAV, G. K.; BHASKAR, R.; TIWARI, R. K. Thidiazuron induced callus induction and in-vitro regeneration of asparagus (*Asparagus racemosus* Wild.). **Indian Journal of Scientific Research**, v. 1, n. 1, p. 27–30, 2010.
- TRUEMAN, S. J. Clonal propagation and storage of subtropical pines in Queensland, Australia. **South African Forestry Journal**, n. 208, p. 49–52, 2006.
- TRUEMAN, S. J.; RICHARDSON, D. M. In vitro propagation of *Corymbia torelliana* × *C. citriodora* (Myrtaceae) via cytokinin-free node culture. **Australian Journal of Botany**, v. 55, p. 471, 2007.
- VALVERDE, A. E. L.; VALVERDE, S. R.; ALVARENGA, A. P.; MARQUES, G. M.; MENDONÇA, F. M.; OLIVEIRA, P. R. S. Cadeia produtiva de celulose. In: REZENDE, J. B. **Cadeias produtivas do complexo agroindustrial de florestas plantadas em Minas Gerais: estrutura e dinâmica**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2012. p. 71–92.
- VAN VOORTHUIZEN, M. J.; SONG, J.; NOVÁK, O.; JAMESON, P. E. Plant growth regulators INCYDE and TD-K underperform in cereal field trials. **Plants**, v. 10, n. 11, p. 2309, 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10112309>.
- WANG, W.; KHALIL-UR-REHMAN, M.; WEI, L.-L.; NIEUWENHUIZEN, N. J.; ZHENG, H.; TAO, J.-M. Effect of thidiazuron on terpene volatile constituents and terpenoid biosynthesis pathway gene expression of Shine Muscat (*Vitis labrusca* × *V. vinifera*) grape berries. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2578, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25112578>.
- WANG, X. D.; NOLAN, K. E.; IRWANTO, R. R.; SHEAHAN, M. B.; ROSE, R. J. Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells. **Annals of Botany**, v. 107, n. 4, p. 599–609, 2011.
- WANG, Y.; JIAO, Y. Axillary meristem initiation - a way to branch out. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 41, p. 61–66, 2018.
- WANG, Y.; WU, Z.; LI, X.; SHANG, X. Regeneration and genetic transformation in Eucalyptus species, current research and future perspectives. **Plants**, v. 13, p. 2843, 2024. <https://doi.org/10.3390/plants13202843>.

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

WENG, Y. H.; PARK, Y. S.; LINDGREN, D. Unequal clonal deployment improves genetic gains at constant diversity levels for clonal forestry. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, n. 1, p. 77–85, 2012.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Calcium in plants. **Annals of Botany**, v. 92, p. 487–511, 2003.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. Auxin: regulation, action, and interaction. **Annals of Botany**, v. 95, p. 707–735, 2005.

WU, H. X. Benefits and risks of using clones in forestry – a review. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v. 34, n. 5, p. 352–359, 2018.
<https://doi.org/10.1080/02827581.2018.1487579>.

YANG, T.; JIAO, Y.; WANG, Y. Stem cell basis of shoot branching. **Plant and Cell Physiology**, v. 64, n. 3, p. 291–296, 2023. doi: 10.1093/pcp/pcac165.

YÜCESAN, B. Thidiazuron (TDZ): a callus minimizer for in vitro plant production. In: AHMAD, N.; FAISAL, M. (Ed.). Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator. Singapore: **Springer**, 2018. DOI: 10.1007/978-981-10-8004-3_14.

ZHANG, C. R.; HUANG, X. L.; WU, J. Y.; FENG, B. H.; CHEN, Y. F. Identification of thidiazuron-induced ESTs expressed differentially during callus differentiation of alfalfa (*Medicago sativa*). **Physiologia Plantarum**, v. 128, p. 732–739, 2006.

ZHANG, Y.; LI, J.; LI, C. et al. Gene expression programs during callus development in tissue culture of two *Eucalyptus* species. **BMC Plant Biology**, v. 22, p. 1, 2022. Disponível em: <https://doi-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/10.1186/s12870-021-03391-x>.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis. **The Arabidopsis Book**, v. 12, e0173, 2014.

ZHIHUI, S.; TZITZIKAS, M.; RAEMAKERS, K. et al. Effect of TDZ on plant regeneration from mature seeds in pea (*Pisum sativum*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 45, p. 776–782, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9212-z>.

ZHU, Y.; WAGNER, D. Plant inflorescence architecture: the formation, activity, and fate of axillary meristems. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 12, n. 1, a034652, 2020. doi: 10.1101/cshperspect.a034652.

ZICHNER ZORZ, A. et al. Microplants production of *Eucalyptus cloeziana* from indirect organogenesis. **Bosque (Valdivia)**, v. 41, n. 2, p. 113–124, 2020. Disponível em: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-92002020000200113. Acesso em: 20 jul. 2025. doi: 10.4067/S0717-92002020000200113.

ANEXO A – CONCENTRAÇÕES DOS MEIOS DE CULTURA
Meio de Germinação MS ½ concentração

Reagentes	Concentração
NH ₄ NO ₃	0,825 g/L
KNO ₃	0,95 g/L
KH ₂ PO ₄	0,085 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,185 g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	1,69 mg/L
H ₃ BO ₃	0,62 mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,002499 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,002499 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,002499 mg/L
KI	0,083 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,06 mg/L
Tiamina	0,024978 mg/L
Ác, nicotínico	0,125 mg/L
Piridoxina	0,125 mg/L
Glicina	0,5 mg/L
Mio-Inositol	25 mg/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01392 g/L
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,01862 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,22 g/L

Meio de Calogênese MS ½ concentração de nitratos

Reagentes	Concentração
NH ₄ NO ₃	0,825 g/L
KNO ₃	0,95 g/L
KH ₂ PO ₄	0,17 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37 g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	3,38mg/L
H ₃ BO ₃	1,24 mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,004998 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,004998 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,049998 mg/L
KI	0,166 mg/L
ZnSo ₄ .7H ₂ O	2,12 mg/L
Tiamina	0,049956 mg/L
Ác. Nicotínico	0,25 mg/L
Piridoxina	0,25 mg/L
Glicina	1 mg/L
Mio-Inositol	50 mg/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02784 g/L
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,03724 g/L
TDZ	0,025 mg/L, 0,050 mg/L, 0,075 mg/L e 0,1 mg/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,44 g/L

Meio de Regeneração MS com BAP E ANA

Reagentes	Concentração
NH ₄ NO ₃	1,65 g/L
KNO ₃	1,9 g/L
KH ₂ PO ₄	0,17 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37 g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	3,38 mg/L
H ₃ BO ₃	1,24 mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,004998 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,004998 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,049998 mg/L
KI	0,166 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,12 mg/L
Tiamina	0,049956 mg/L
Ác. Nicotínico	0,25 mg/L
Piridoxina	0,25 mg/L
Glicina	1 mg/L
Mio-Inositol	50 mg/L
FeSo ₄ .7H ₂ O	0,02784 g/L
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,03724 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,44 g/L
BAP	0,338 mg/L
ANA	0,0088 mg/L