

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
MINAS GERAIS - CAMPUS SÃO JOÃO EVANGELISTA-MG
CURSO DE BACHARELADO EM AGRONOMIA
ARI MEDEIROS BRAGA NETO**

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE DOIS HÍBRIDOS DE *Eucalyptus* SOB
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁGAR**

SÃO JOÃO EVANGELISTA

2015

ARI MEDEIROS BRAGA NETO

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE DOIS HÍBRIDOS DE *Eucalyptus* SOB
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁGAR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto Federal de Minas Gerais - Campus São
João Evangelista como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Dr. Márcio Takeshi Sugawara
Coorientador: Me. Bruno Oliveira Lafetá

SÃO JOÃO EVANGELISTA

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

B813e Braga Neto, Ari Medeiros
2015 Estabelecimento in vitro de dois híbridos de eucalyptus sob diferentes concentrações de ágar / Ari Medeiros Braga Neto. – 2015.
31 f.
Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista, 2015.
Orientador: Dr. Márcio Takeshi Sugawara.
Coorientador: Me. Bruno Oliveira Lafetá
1. Ágar. 2. Eucalipto. 3. Explante. 4. Micropropagação. I. Braga Neto, Ari Medeiros. II. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista. III. Título.

CDD 631

Elaborada pela Biblioteca Professor Pedro Valério – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista
Bibliotecário Responsável: Veríssimo Amaral Matias – CRB-6/3266

ARI MEDEIROS BRAGA NETO

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE DOIS HÍBRIDOS DE *EUCALYPTUS* SOB
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁGAR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto Federal de Minas Gerais - Campus
São João Evangelista como exigência parcial
para obtenção do título de Bacharel em
Agronomia.

Aprovada em: 09 /11/ 2015

BANCA EXAMINADORA



Orientador Prof. Dr. Márcio Takeshi Sugawara

Instituição: Instituto Federal de Minas Gerais - Campus São João Evangelista



Prof. Me. Bruno Oliveira Lafetá

Instituição: Instituto Federal de Minas Gerais - Campus São João Evangelista



Prof. Me. Alisson José Eufrásio de Carvalho

Instituição: Instituto Federal de Minas Gerais - Campus São João Evangelista

Dedicatória

A DEUS, por ter me concedido a graça de concluir mais uma etapa de minha caminhada com sucesso e ter me proporcionado saúde e sabedoria para suportar esta jornada e saber lidar com todas as situações vivenciadas durante este período.

Aos meus pais “Juninho e Pretta”, que com grande esforço e amor, juntos formam o alicerce de minha formação.

Às minhas irmãs Renata e Karla pelo incentivo.
À minha namorada Ramony, pelo apoio e compreensão.

E a todos que acreditaram em mim, com carinho.

DEDICO.

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida e pela graça alcançada.

Aos meus pais “Juninho e Pretta”, pelo apoio, carinho, compreensão e amor.

Às minhas irmãs Renata e Karla, pelo constante incentivo.

À minha namorada Ramony pela ajuda na execução deste projeto.

Aos orientadores, professor Dr. Márcio Takeshi Sugawa, e professor Me. Bruno de Oliveira Lafetá. Obrigado pelos inúmeros ensinamentos transmitidos, por todas as vezes que precisei, e me ajudaram.

Ao Instituto Federal de Minas Gerais campus São João Evangelista, pela oportunidade de realização desta graduação.

Ao CNPq, FAPEMIG e IFMG pelas bolsas concedidas ao longo do curso.

A Empresa CENIBRA pela disponibilidade de material para a pesquisa.

A todos os professores do curso de Bacharelado em Agronomia do IFMG-SE. Em especial ao professor Alisson; fonte de sabedoria constante e conselhos que levo para a vida toda, aos professores Aderlan e Carlos Henrique; orientadores de projetos de extensão e iniciação científica, respectivamente.

Aos funcionários do setor de horticultura do IFMG e do laboratório de cultura de tecidos, em especial ao Paulo Modesto.

A todos que de forma direta ou indireta me ajudaram na execução deste trabalho.

RESUMO

A micropropagação é uma técnica que consiste no cultivo *in vitro* de órgãos, tecidos ou células vegetais em ambiente asséptico. A fase de estabelecimento *in vitro* é a mais crítica da micropropagação, verificando maiores taxas de contaminação por fitopatógenos, oxidação fenólica e recalcitrância por explantes. O estabelecimento *in vitro* foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições, no esquema fatorial 4 x 2, sendo estudado o efeito de quatro concentrações de ágar bacteriológico (0; 3; 6 e 12 g.L⁻¹) e de dois híbridos de eucalipto. O meio de cultura utilizado foi o MS. Aos 30 dias após instalação do experimento, registraram-se a presença de folhas, pecíolo, broto, calo, oxidação do meio, oxidação do explante e as incidências de *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e bactérias. Os dados foram submetidos às análises de variância e de regressão linear quadrática, ambos a 5,0% de significância. O híbrido 1 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus*) apresentou melhor desempenho sobre o híbrido 2 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) em relação a porcentagem de folhas e pecíolos. Para as concentrações de ágar as variáveis de ocorrência de folhas, pecíolo, broto, calo e a presença do fungo *Fusarium* sp. foram significativas. A melhor concentração empregando um método direto de regeneração se encontra no intervalo entre 7,25 e 7,94 g. L⁻¹ de ágar.

Palavras-chave: Ágar, Eucalipto, Explante, Micropropagação.

ABSTRACT

The micropropagation is a technique that consists in vitro culture of organs, tissues or plant cells in an aseptic environment. The establishment phase in vitro is the most critical of micropropagation, checking higher contamination rates by plant pathogens, phenolic oxidation and recalcitrance by explants. The in vitro establishment was conducted in a completely randomized design with four replications, in a factorial 4 x 2. The culture medium used was the MS. The effect four bacteriological agar concentrations (0, 3, 6:12 g L⁻¹) for two eucalyptus hybrid, registering the behavior of the leaves of occurrence of variables, petiole, bud, callus, medium oxidation, oxidation of explant, the presence of *Fusarium* sp., presence of *Aspergillus* sp., and the presence of bacteria. Data were obtained from daily assessments to the thirty-first day. They were carried out analyzes of variance and quadratic regression, both at 5.0% of statistical significance. The first hybrid (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus*) performed better on the second hybrid (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) regarding the percentage of leaves and petioles. For agar concentrations sheets instance variables, petioles, shoots, callus and the presence of *Fusarium* sp. It was significant. The optimal concentration employing a direct method of regeneration is in the range between 7.25 and 7.94 g. L⁻¹ agar.

Keywords: Agar, *Eucalyptus*, Explant, micropropagation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Mudanças de eucalipto isoladas do ambiente externo em casa de vegetação. Esquerda: <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i> . Direita: <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus globulus</i>	16
Figura 02: (A) retirada do material propagativo da planta mãe. (B) desinfestação do material propagativo em câmara de fluxo de laminar.....	17
Figura 03: Cortes de seguimentos caulinares de híbridos de <i>Eucalyptus</i> para inoculação <i>in vitro</i>	17
Figura 04: Variáveis avaliadas durante o experimento, indicados por um seta vermelha, sendo: Oxidação do explante (A), oxidação do meio (B), presença do fungo <i>Fusarium</i> sp. (C), presença do fungo <i>Aspergillus</i> sp. (D), ocorrência de broto (E), pecíolo (F), ocorrência de folhas (G), formação de calo (H), presença de bactéria (I) e uma muda já pré-formada, com excelente taxa de multiplicação (J).....	22
Figura 05: Mudanças com um bom desempenho durante a fase de estabelecimento <i>in vitro</i> . <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i> (A) e <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus globulus</i> (B).....	23
Figura 06: Porcentagem da presença de pecíolo e folhas no híbrido 1 (<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus globulus</i>), estabelecido <i>in vitro</i> sob as diferentes concentrações de ágar.....	25
Figura 07: Porcentagem da presença de broto e calo no estabelecimento <i>in vitro</i> dos híbridos de (<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus globulus</i> e <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i>), sob diferentes concentrações de ágar.....	26
Figura 08: Porcentagem da presença de <i>Fusarium</i> sp. no estabelecimento <i>in vitro</i> dos híbridos de Híbrido 1 (<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus globulus</i> e <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>Eucalyptus grandis</i>), sob diferentes concentrações de ágar.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Composição do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962 <i>apud</i> Oliveira, 2005).....	18
Tabela 02: Concentrações das soluções estoque no meio de cultivo.....	20
Tabela 03: Tratamentos empregados no projeto de pesquisa.....	21
Tabela 04: Resumo da análise de variância (ANOVA) ($p>0,05$) para os dois híbridos (H) avaliados, as concentrações de ágar (A) utilizadas e concentrações de ágar x híbridos (H x A).....	23
Tabela 05: Médias de folhas e pecíolos (%) em relação as concentraç, submetidas ao teste F a 5 % de significância estatística.....	24
Tabela 06: Médias de ox. do meio, ox. do explante, broto e calo (%), submetidos ao teste F a 5 % de significância estatística.....	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 O cultivo <i>in vitro</i> do eucalipto.....	12
2.2 O estabelecimento <i>in vitro</i>	13
3 METODOLOGIA/ MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Fontes de Explantes	15
3.2 Coleta e Preparo dos material propagativo.....	16
3.3 Preparo do meio de cultivo.....	17
3.4 Instalação do experimento	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
5 CONCLUSÕES.....	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

O aumento do potencial produtivo de muitas espécies vem ocorrendo de forma considerável desde o século XX, isso se deve ao aumento recente da diversidade de procedimentos científicos utilizados no melhoramento de plantas, tais como o desenvolvimento de técnicas de cultura de tecidos, biologia molecular e celular e da citogenética (BORÉM & MIRANDA, 2009).

A micropropagação é uma técnica que consiste no cultivo *in vitro* de órgãos, tecidos ou células vegetais em ambiente asséptico (OLIVEIRA et al., 2011; PIATI et al., 2011).

A propagação *in vitro* de plantas chamada também de micropropagação/microestaquia, é uma técnica para propagar plantas dentro de tubos de ensaio ou similares de vidro (por isso o termo *in vitro*), sob adequadas condições de assepsia, nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O₂ e CO₂ (CID, 2001).

Para Xavier (2013), a micropropagação pode ser enquadrada como uma técnica de propagação vegetativa *in vitro*, esta comparada a outras técnicas tem sido considerada aquela que mais se difundiu nos últimos anos, com aplicações comprovadas em diversas espécies de plantas. Ainda de acordo com o autor, é importante relatar que essa técnica encontra-se embutida nos programas de pesquisa, onde tem sido utilizada na preservação de germoplasma, produção de plantas livres de doenças, multiplicação rápida de plantas em períodos de tempo e espaço físico reduzido, rejuvenescimento clonal e produção de mudas de clones selecionados.

De modo geral pode-se dizer que o cultivo *in vitro* é uma forma propagativa de produção vegetal que vem auxiliando, principalmente, o melhoramento genético que busca o desenvolvimento e seleção de indivíduos com melhores genótipos e fenótipos. Este desenvolvimento e seleção são possíveis devido a rígidos processos como o isolamento e a assepsia ao qual são submetidos aos propágulos vegetais responsáveis pela origem de novas estruturas. Fachinello (2005), afirma que a adoção destes processos torna-se necessária devido ao rompimento das correlações existentes entre os diversos mecanismos de sobrevivência de uma planta intacta, certo de que neste meio propagativo são utilizadas células isoladas ou partes da planta em questão.

Esta é uma técnica que requer um conhecimento multidisciplinar, advindo principalmente da fisiologia, nutrição, genética e bioquímica, bem como de outras áreas,

de acordo com a técnica e os objetivos a serem alcançados. De forma alguma pode ser visualizada como uma técnica isolada, mas sim em conjunto com as técnicas convencionais de cultivo *ex vitro* (BORÉM, 2007).

Um dos principais objetivos da cultura de tecidos é prover uma alternativa de manipular plantas em nível celular. Portanto, o conhecimento dos mecanismos de regeneração de plantas é fundamental, pois é a maior limitação na aplicação biotecnológica para melhoramento vegetal. A aplicação no melhoramento é, principalmente, para aquelas espécies cujos problemas não podem ser solucionados através de métodos de melhoramento convencionais (LAMEIRA et al. 2000).

Nos esquemas-padrão da micropropagação, os estádios de desenvolvimento da propagação *in vitro* são constituídos de fases que incluem desde a seleção do explante e obtenção de uma cultura livre de contaminantes, até a multiplicação de propágulos vegetativos, enraizamento e aclimação das mudas obtidas na condição *ex vitro* (XAVIER 2013). Podendo-se dividir as fases como:

- Fase I – Seleção do explantes, desinfestação e estabelecimento da cultura nas condições *in vitro*.
- Fase II – Multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio de cultura adequado à propagação.
- Fase III – Enraizamento dos propágulos vegetativos obtidos no estádio anterior (multiplicação).
- Fase IV – aclimação das plantas obtidas na condição “*in vitro*” para a condição “*ex vitro*”.

Algumas destas fases podem ser mais prolongadas em razão da espécie e dos objetivos, a experiência e estrutura disponível também são determinantes na definição estratégica do sucesso desejado.

Em função do explante utilizado e de sua subsequente manipulação, a micropropagação pode ser conduzida de três formas, sendo elas: a multiplicação por meio da proliferação de gemas axilares; a multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese e a multiplicação via embriogênese somática. A escolha de algum destes três processos vai variar de acordo com a espécie a ser trabalhada e em função dos objetivos a serem alcançados, além do domínio da técnica e as disponibilidades estruturais e orçamentárias.

A indução do crescimento e proliferação de gemas vegetativas axilares pré-formadas através de segmentos nodais é um método direto de regeneração (PIATI et al., 2011). Baseia-se no aproveitamento da totipotência de células vegetais, capacidade meristemática e regeneração celular. Os fragmentos de tecido vegetal vivo, designados explantes, podem ser originados de porções de caules, folhas ou raízes, a escolha do melhor se dá pela disponibilidade de material vegetativo e da facilidade de sua obtenção. Estimulados a crescer mediante a adição de reguladores de crescimento no meio de cultura, o material da origem a uma nova parte aérea que são divididos em seguimentos menores, dando origem a novos explantes.

Em vista das potencialidades de aplicação das técnicas de cultura de células e tecidos em espécies florestais, inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos no intuito de tornar essa tecnologia acessível e economicamente viável (XAVIER, 2013).

A eficiência deste sistema está no número de plantas obtidas determinada pelo número de gemas axilares pré-existentes no inoculo, por outro lado, sistema apresenta a vantagem de que os indivíduos regenerados mostram grande estabilidade genética (LAMEIRA et al. 2000).

O objetivo deste trabalho foi a avaliação de dois híbridos de eucalipto (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) durante a fase de estabelecimento *in vitro*, sob diferentes concentrações de ágar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O cultivo *in vitro* do eucalipto

A cultura do eucalipto, que é uma opção para atender a demanda de madeira, teve um grande impulso nesses últimos 50 anos, graças à vasta rede experimental instalada pelos órgãos públicos e empresas particulares. Através desses estudos, tem-se conseguido a cada ano, melhoria de técnicas silviculturais e melhoria do material genético, proporcionando ganhos significativos de produtividade, que contribuiram para a projeção mundial do Brasil no setor florestal (PAIVA, et al. 2011).

O eucalipto é o gênero florestal que mais possui estudos de micropropagação. Os primeiros trabalhos relatados com o cultivo *in vitro* de eucalipto datam da década de 60 (DUTRA 2009).

A biotecnologia florestal tem como principais objetivos apoiar programas de melhoramento genético, de modo a garantir o suprimento de produtos madeireiros de acordo com o crescente uso, além de buscar explorar a grande diversidade existente entre as espécies do gênero, de modo a decifrar a evolução e distribuição de caracteres adaptativos em um contexto ecológico (CANÇADO 2012).

Dentre as aplicações da propagação *in vitro* na área florestal, destacam-se aquelas relacionadas com:

- Conservação de germoplasma *in vitro*;
- A aceleração de programas de melhoramento pela multiplicação de clones superiores, visando à produção de mudas, ao rejuvenescimento de clones selecionados e ao potencial de obtenção de sementes sintéticas (embriões somáticos);
- A limpeza clonal, na obtenção de culturas livres de microrganismos patogênicos, com o objetivo de atender à demanda por um processo de propagação clonal sustentável;
- A possibilidade de patenteamento de processos/materiais obtidos por meio da biotecnologia;
- Outras técnicas biotecnológicas, como a transformação genética.

Embora enumeradas algumas dificuldades deste processo, como alto investimento em instalações e treinamento de pessoal, necessidade de desenvolvimento de protocolos diferenciados de acordo com cada espécie, a recalcitrância das culturas à propagação e riscos de contaminação acidental (BORÉM, 2007), a micropropagação de eucalipto é estratégia para produção massal de genótipos-elite e conservação de germoplasma (DUTRA, 2009).

2.2 O estabelecimento *in vitro*

Enquadrado dentro da primeira fase nos esquemas-padrão da micropropagação pela proliferação de gemas axilares, o estabelecimento *in vitro* inicia-se com o manejo das plantas matrizes e a seleção dos explantes mais adequados para a micropropagação. Antecede os procedimentos de multiplicação e alongamento, enraizamento e aclimação *ex vitro* (BORÉM, 2007).

É a fase mais crítica da micropropagação para a maioria das plantas lenhosas, são encontradas dificuldades de resposta do propágulo vegetativo à propagação clonal (XAVIER, 2013). Verifica-se maiores taxas de contaminação por fitopatógenos,

oxidação fenólica e recalcitrância por explantes (BORGES et al., 2012; DUTRA et al., 2009; LONDE et al., 2007). A ocorrência de compostos fenólicos em culturas lenhosas, pode estar ligada a processos de regulação de crescimento, especialmente com as auxinas que, dependendo da concentração endógena no tecido, resulta na indução desses compostos (ANDRADE, 2000).

A primeira etapa a ser considerada nessa fase é a desinfestação dos segmentos nodais (ALMEIDA 2008), tendo como objetivo a obtenção de uma cultura livre de contaminantes e suficientemente adaptada às condições *in vitro*.

Tanto bactericidas quanto fungicidas podem ser utilizados no preparo dos ramos para o estabelecimento em laboratório, melhorando assim, as condições de assepsia dos mesmos (ALFENAS et al. 2009).

O sucesso de um protocolo de micropropagação depende claramente desta etapa. Isso, porque as etapas seguintes e posterior transferência para condições *ex vitro* só podem ser executadas após o estabelecimento de culturas assépticas e com bom vigor vegetativo (GEORGE e DEBERGH, 2008 apud BORGES, 2012).

Estudos mostram que os fatores mais importantes a serem considerados nos procedimentos de seleção dos explantes, são aqueles relacionados com o grau de juvenildade do propágulo vegetativo, o nível de controle da contaminação e o vigor vegetativo da planta mãe.

Dentre os meios básicos mais utilizados estão o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), e JADS (GONÇALVES, 1982). Adicionalmente, tem-se acrescentado reguladores de crescimento, a fim de suportar um balanço hormonal que proporcione reatividade das gemas. Entre os mais utilizados estão a citocinina BAP (benzilaminopurina) e as auxinas AIA (ácido indolacético) e ANA (ácido naftalenoacético) (XAVIER, 2013). Componente essencial na fabricação de meios de cultura sólidos, o ágar é um composto muito utilizado, sendo especialmente útil por manter-se sólido em temperaturas comumente empregadas no cultivo *in vitro*.

3 METODOLOGIA/ MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Instituto Federal de Minas Gerais campus São João Evangelista, localizado na Avenida Primeiro de Junho, 1043 – Centro – São João

Evangelista/MG. CEP: 39705-000. Coordenadas geográficas UTM: 736308 m E, 7947136 m S. Zona: 23 K. Datum SIRGAS 2000. O período de realização do trabalho foi de maio a dezembro de 2014, estando nele compreendidos as fases de plantio, condução das mudas e estabelecimento *in vitro*.

3.1 Fontes de Explantes

Para obtenção dos explantes foram obtidas mudas de dois híbridos de eucalipto, sendo 10 mudas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e 10 mudas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, produzidas via miniestaquia junto à empresa Celulose Nipo-Brasileira – CENIBRA. Foram transferidas para vasos de polietileno (capacidade de 25,0 L) preenchidos com substrato comercial a base de casca de pinus e serragem, bioestabilizados. Tendo também em sua composição aditivos como corretivos de acidez (5,5%), Vermiculina (4,5%) e Fertilizante mineral 4-14-8 (5%). Condutividade elétrica 0,65 +/- 0,30 mS/cm, pH 6,50 +/- 0,5, umidade máxima 48,5%, capacidade de retenção de água 90% e densidade 350kg/m³.

Transplantadas para os vasos, as mudas foram mantidas por 60 dias em casa de vegetação sob irrigação do tipo gotejo, de 2 em 2 horas por 10 minutos, com tela de malha para 50,0 % de sombra, e 105 dias ao céu aberto no viveiro de mudas da Instituição, sob irrigação por aspersão (6 vezes ao dia de 2 em 2 horas por 10 minutos, vazão por aspersor de 0,66 litros por minuto).

Antecedendo 21 dias a coleta de brotos, as mudas foram levadas para casa de vegetação no setor de olericultura, onde permaneceram isoladas do ambiente externo como mostra a Figura 01. A irrigação neste ambiente foi localizada, via regador manual (2 litros/planta 2 vezes ao dia). Visando a desinfecção inicial do material aplicou-se uma mistura com 2,4 g.L⁻¹ de fungicida Orthocide 500® (Captan, 50,0 % de princípio ativo) e 10 mL.L⁻¹ de óleo mineral Assist® assim como descrito por Borges et al. (2012).



Figura 01: Mudanças de eucalipto isoladas do ambiente externo em casa de vegetação. Esquerda: *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*. Direita: *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus*.
Fonte: Autor.

3.2 Coleta e Preparo dos material propagativo

A coleta dos brotos foi feita nas mudas que se encontravam saudáveis, livres de fitopatógenos, altura entre 1,10 a 1,40 m e diâmetro do colo entre 2 a 3 cm.

Com o auxílio de tesouras esterilizadas os brotos foram sendo retirados das plantas mães (Figura 02 - A) e colocados em caixas plásticas devidamente higienizadas e separadas de acordo com cada híbrido. Cada caixa continha cerca de 20 gotas de água sanitária (2,5 % de cloro ativo) diluídas em 2 litros de água para auxiliar no processo de desinfecção do material, uma vez que a água sanitária mesmo diluída tem um bom efeito germicida, e impedir a desidratação das estruturas vegetativas.

Após a coleta de brotos, o material experimental foi conduzido ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IFMG/SJE para desinfestação que seguiu procedimentos fora e dentro da câmara de fluxo de laminar (figura 02 - B), sendo eles:

- Procedimentos de desinfecção realizados fora da Câmara de Fluxo:
 - Transferência do material coletado para um copo Becker e proceder a lavagem por cinco vezes em água destilada/deionizada;
 - Aplicação de solução fungicida (Cercobim 700 WP a base de tiofanato – 1g/L) por 15 minutos;
 - Enxágue com água destilada/deionizada cinco vezes;

- Imersão do explante em álcool 70% por 30 segundos.
- Procedimentos de desinfecção realizados dentro da Câmara de Fluxo:
 - Desinfecção em solução de hipoclorito de sódio a 1% + detergente Tween 20 (2 gotas/100mL de água);
 - Enxaguar o material em água destilada/deionizada e autoclavada cinco vezes;
 - Deixar o material em água destilada/deionizada e autoclavada até o início dos procedimentos de inoculação.



Figura 02: A – retirada do material propagativo da planta mãe. B – desinfecção do material propagativo em câmara de fluxo de laminar.

Fonte: Autor.

No mesmo ambiente (câmara de fluxo), obtiveram-se segmentos caulinares de 1,5 cm de comprimento contendo um nó e uma gema axilar, como mostra a Figura 03.



Figura 03: Cortes de segmentos caulinares de híbridos de *Eucalyptus* para inoculação *in vitro*.

Fonte: Autor.

3.3 Preparo do meio de cultivo

O meio de cultura utilizado foi composto pelos sais básicos de MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) força total, vitaminas MS, fitorreguladores

(Benzilaminopurina (BAP) e Ácido naftalenoacético (ANA)), sacarose, polivinilpirrolidona (PVP) e Mio-inositol, como consta na Tabela 01.

Um dia antes do preparo do meio foram feitas as soluções estoques de macronutrientes, micronutrientes e vitamina MS.

As soluções de Benzilaminopurina (BAP) e Ácido naftalenoacético (ANA) também foram preparadas previamente, as concentrações das respectivas soluções foram de 0,25 a 0,50 mg L⁻¹, de BAP e 0,25 a 0,75 mg L⁻¹ de ANA, deste modo foi levado em consideração um valor intermediário entre as concentrações.

Todas as soluções preparadas no dia anterior foram armazenadas sob condições adequadas, sendo macronutrientes e micronutrientes em geladeira com temperatura variando de 2 a 5°C. Os fitorreguladores e vitaminas MS no congelador com temperatura abaixo de 0°C.

Tabela 01. Composição do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962 apud Oliveira, 2005).

Componente	Fórmula	Concentração (mg L⁻¹)
Macronutrientes		
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	1650
Nitrato de potássio	KNO ₃	1900
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	441
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	170
Sódio EDTA	Na ₂ EDTA	37,25
Iodeto de potássio	KI	0,83
Micronutrientes		
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,85
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6,2
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Vitaminas		

Ácido nicotínico	$C_6H_5NO_2$	0,5
Cloridrato de piridoxina	$C_6H_{12}ClNO_2$	0,5
Cloridrato de tiamina	$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$	0,5
Glicina	$C_2H_5NO_2$	2,0
Fitorreguladores⁽¹⁾		
Benzilaminopurina (BAP)	$C_{12}H_{11}N_5$	0,5
Ácido naftalenoacético (ANA)	$C_{12}H_{10}O_2$	0,3
Outros		
Ágar ⁽²⁾	$(C_{12}H_{18}O_9)_n$	-
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	30000
Polivinilpirrolidona	$(C_6H_9NO)_n$	1000
Mio-inositol	$C_6H_{12}O_6$	100,0

Para macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e fitorreguladores foi preparado uma solução previamente (solução estoque) na concentração de $mg.L^{-1}$, levando em consideração cada solução separadamente do meio de cultivo final.

⁽¹⁾ Brondani, et al. (2009).

⁽²⁾ Concentrações variando de acordo com cada tratamento ($g.L^{-1}$)

Para cada tratamento (Tabela 02) foi preparado um meio de cultivo em recipientes diferentes. Todas as vidrarias e outros materiais a serem utilizadas (béquer, proveta, pipeta, balão volumétrico, placas de petri, bastão de vidro, espátulas, dentre outras) foram lavadas com água e sabão neutro e enxaguadas com água autoclavada.

Trinta minutos antes do preparo do meio as soluções estoque foram retiradas da geladeira e do congelador (período de descongelamento). Os outros componentes como ágar, sacarose, polivinilpirrolidona e Mio-inositol foram pesados em balança analítica de 7 dígitos.

O preparo do meio seguiu os seguintes procedimentos:

- 1º passo:
 - Utilizar um balão volumétrico com capacidade para 1L;
 - Adicionar água autoclavada até mais ou menos a metade do balão;
 - Medir as soluções estoque (Tabela 02) com auxílio de pipeta e adicionar uma por uma no balão volumétrico;
 - Completar o balão volumétrico até a altura de 1L;
 - Regular o nível da balança analítica e fazer a pesagem dos outros componentes (Tabela 01 - Outros).
- 2º passo:

- Virar a água do balão volumétrico em um copo béquer com capacidade para 2L;
- Adicionar os produtos que foram pesados no ultimo item do 1º passo;
- Colocar o copo béquer sobre o agitador magnético e deixar agitando por 10 minutos.
- 3º passo:
 - Realizar a aferição do pHmetro;
 - Fazer a medição do pH do meio;
 - Ajustar o pH do meio para $5,75 \pm 0,05$, caso esteja baixo, adicionar algumas gotas de hidróxido de sódio (NaOH) e caso esteja alto adicionar algumas gotas de ácido clorídrico (HCl).
- 4º passo:
 - Levar o meio para o micro-ondas por um período de 12 minutos;
 - Programar o microondas para três tempo de 4 minutos;
 - Em cada intervalo de tempo agitar o meio com o auxílio de um bastão.

Tabela 02: Concentrações das soluções estoque no meio de cultivo.

Soluções Estoque	Concentração - ml.L ⁻¹
Macronutrientes	100
Micronutrientes	1
Vitamina MS	2
ANA	0,53
BAP	2,21

MS - Murashige & Skoog, 1962.

BAP – Benzilaminopurina.

ANA - Ácido naftalenoacético.

O pH metro utilizado foi do modelo mPA-210P Voltagem: 9 VDC consumo: 5W. Foi feita aferição e calibragem com soluções padrões de pH 4 (ácido) e pH 7 (neutro). O meio de cultura foi ajustado para $pH 5,75 \pm 0,05$.

Depois de pronto o meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio (15 ml em cada tubo) de maneira uniforme. Os tubos juntamente com o meio foram autoclavado por 20 minutos à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm.

3.4 Instalação do experimento

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, no esquema fatorial 4 x 2, sendo estudado o efeito das quatro concentrações de ágar (Tabela 03) no estabelecimento *in vitro* de dois híbridos de eucalipto (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*). Cada unidade experimental foi constituída por 8 tubos de ensaio (20 x 150 mm), contendo cerca de 15 ml de meio por tubo.

Também em câmara de fluxo laminar, foi inoculado um segmento caulinar por tubo de ensaio, depois vedado com papel alumínio e filme plástico. Após a inoculação, os segmentos foram mantidos em sala de cultura por 7 dias no escuro a 25 ± 2 °C e depois, sob fotoperíodo de 16 horas luz na mesma temperatura.

Tabela 03: Tratamentos empregados no projeto de pesquisa.

Tratamento	Descrição dos tratamentos
1	Meio de cultura MS com concentração de ágar de 0 g L ⁻¹
2	Meio de cultura MS com concentração de ágar de 3 g L ⁻¹
3	Meio de cultura MS com concentração de ágar de 6 g L ⁻¹
4	Meio de cultura MS com concentração de ágar de 12 g L ⁻¹

MS - Murashige & Skoog, 1962.

As avaliações foram realizadas diariamente até a contagem final (trigésimo primeiro dia), registrando-se nove variáveis, sendo elas: ocorrência de folhas, pecíolo, broto, calo, oxidação do meio, oxidação do explante, presença do fungo *Fusarium* sp., presença do fungo *Aspergillus* sp., e a presença de bactéria (Figura 04).

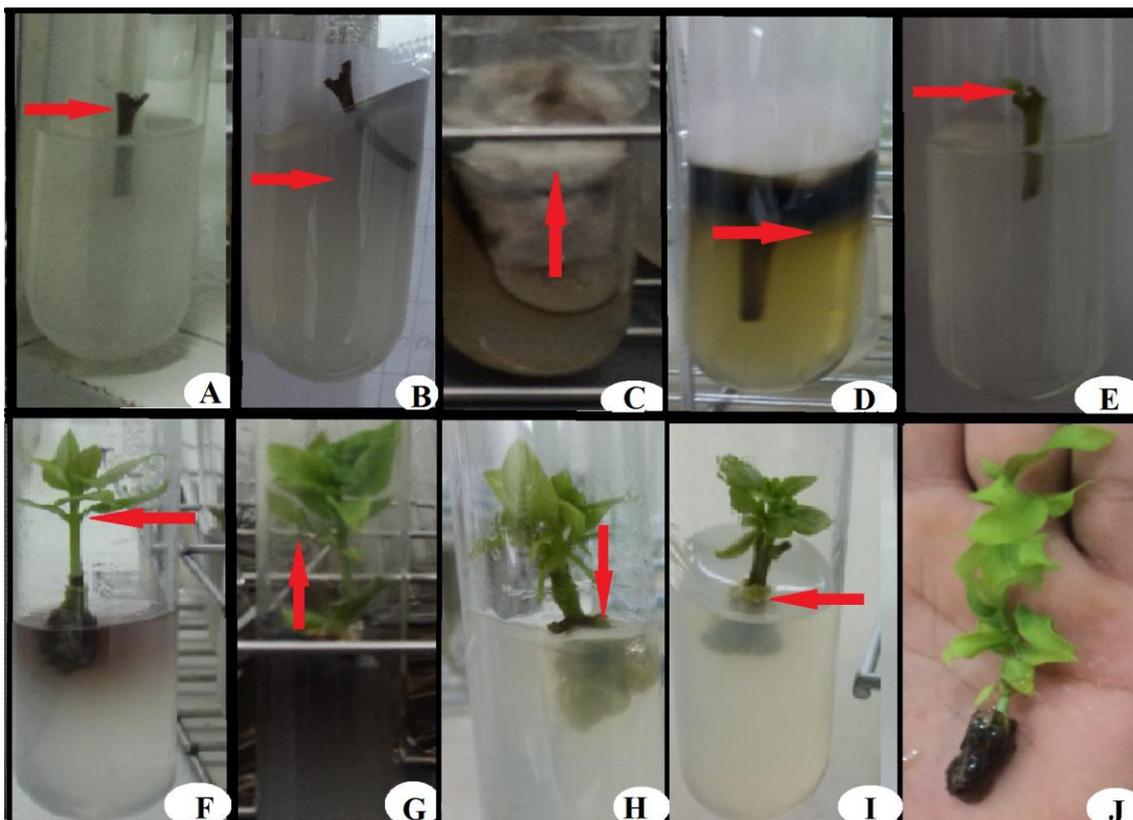


Figura 04: Variáveis avaliadas durante o experimento, indicados por um seta vermelha, sendo: Oxidação do explante (A), oxidação do meio (B), presença do fungo *Fusarium* sp. (C), presença do fungo *Aspergillus* sp. (D), ocorrência de broto (E), pecíolo (F), ocorrência de folhas (G), formação de calo (H), presença de bactéria (I) e uma muda já pré-formada, com excelente taxa de multiplicação (J).

Fonte: Autor.

Os dados expressos em porcentagem foram transformados em “ $\arcseno(\sqrt{x/100})$ ” para atender às premissas de normalidade e homogeneidade de variâncias segundo os testes de Lilliefors e Cochran, respectivamente. Realizaram-se análises de variância e de regressão linear quadrática, ambos a 5,0% de significância estatística. Na regressão, empregou-se o método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MQO). A análise estatística foi realizada com auxílio dos *softwares* Excel® e SISVAR (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A figura 05 mostra mudas com 25 dias de inoculação. Com este período de tempo, estas já se apresentavam com um bom desempenho, cerca de 4 a 5 pares de folhas definitivos e de 3 a 4 centímetros de altura.



Figura 05: Mudas com um bom desempenho durante a fase de estabelecimento *in vitro*. *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (A) e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* (B).

Fonte: Autor.

O efeito estatístico pelo teste F ($p < 0,05$) foi verificado em nível de interação (híbridos de eucalipto x concentrações de ágar) para os atributos relacionados à presença de folhas e de pecíolo. Diferenças significativas entre os tipos de híbridos foram observadas para as oxidações do meio e do explante, além dos brotos e calos. Estes dois últimos e a proliferação de *Fusarium* sp. foram influenciadas pelas concentrações de ágar. Os tratamentos em estudo não interferiram nas proliferações de *Aspergillus* sp. e bacteriana.

Tabela 04: Resumo da análise de variância dos atributos avaliados, com os dados transformados, durante o estabelecimento *in vitro* de dois híbridos de eucalipto sob diferentes concentrações de ágar.

F.V.	G.L.	Q.M.				
		Folha	Pecíolo	Ox. Meio	Ox. Explante	<i>Fusarium</i>
Híbridos (H)	1	3866,50*	3866,50*	888,21*	971,87*	423,05 ^{ns}
Ágar (A)	3	1013,38*	1013,38*	57,33 ^{ns}	461,84 ^{ns}	556,29*
H x A	3	467,93*	467,93*	70,92 ^{ns}	233,60 ^{ns}	56,55 ^{ns}
Resíduo	24	112,71	112,71	173,46	169,42	118,81
CV _{exp} (%)		66,20	66,20	30,91	70,56	123,69
		<i>Aspergillus</i>	Bactéria	Broto	Calo	
Híbridos (H)	1	120,57 ^{ns}	13,40 ^{ns}	2859,97*	4131,19*	
Ágar (A)	3	49,12 ^{ns}	13,40 ^{ns}	2267,78*	1015,75*	
H x A	3	49,12 ^{ns}	13,40 ^{ns}	337,88 ^{ns}	111,01 ^{ns}	
Resíduo	24	31,26	13,40	129,79	151,56	
CV _{exp} (%)		288,03	565,69	45,68	54,36	

CV_{exp} = coeficiente de variação experimental.

* significativo a 5,0% de probabilidade. ^{ns} não significativo.

H – Híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

A – Concentrações de ágar (0; 3; 6 e 12 g. L⁻¹).
Ox – Oxidação.

O melhor desempenho do híbrido 1 em relação ao híbrido 2 pode estar relacionado ao fato de que as características herdadas da espécie de *Eucalyptus globulus* apresentam menor teor de lignina em sua composição, tendo aspecto mais tenro o que facilita o processo de estabelecimento *in vitro*.

Na tabela 05 pode-se observar que as médias da presença de folhas e pecíolos no híbrido 1 foram muito superiores em relação ao híbrido 2, o que reafirma sua melhor capacidade de estabelecimento *in vitro*.

Tabela 05: Médias de folhas e pecíolos (%) em relação as concentraç, submetidas ao teste F a 5 % de significância estatística.

Híbrido	Ágar (g. L ⁻¹)			
	0	3	6	12
Folhas				
1	0,00 a	31,25 A	40,63 a	34,38 a
2	0,00 a	0,00 B	6,25 b	9,38 b
Pecíolo				
1	0,00 a	31,25 A	40,63 a	34,38 a
2	0,00 a	0,00 B	6,25 b	9,38 b

Híbrido 1 - *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus*.

Híbrido 2 - *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

Tabela 06: Médias de ox. do meio, ox. do explante, broto e calo (%), submetidos ao teste F a 5 % de significância estatística.

Híbrido	Ox. do meio	Ox. do explante	Broto	Calo
1	53,13 a	20,31 A	38,28 a	35,16 a
2	37,50 b	10,16 B	12,50 b	8,59 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5 % de significância estatística.

Híbrido 1 - *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus*.

Híbrido 2 - *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

Ox – Oxidação.

Na comparação entre os dois híbridos o excesso de oxidação fenólica no híbrido 1 não veio a interferir no seu desempenho na emissão de brotos e calo (Tabela 06), o que pode vim a ser uma exceção nos diversos estudos com espécies lenhosas, que de acordo com Andrade et al. (2000), acumulam, principalmente polifenóis e produtos de oxidação, como melanina, suberina, lignina, cutina e calose em torno da superfície

excisada, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos.

Tanto para folhas como para pecíolos os resultados foram os mesmos. A análise de regressão linear mostra respostas ascendentes destas variáveis em relação ao aumento nas concentrações de ágar, atingindo o máximo de desempenho na concentração de $7,94 \text{ g.L}^{-1}$ e um declínio à medida que ocorre o aumento da mesma (Figura 06). Para o híbrido 2 não foi observada regressão significativa para a presença relativa de folhas e pecíolo em função das concentrações de ágar.

Avaliando também uma espécie lenhosa que pode atingir até 35 metros de (grápia - *Apuleia leiocarpa*) Lencina et al. (2014) chegou à conclusão de que a concentração de $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ foi melhor em relação a concentração de 6 g.L^{-1} no estabelecimento *in vitro*.

Chagas et al. (2010), observou que para a germinação de grãos de pólen de porta enxertos de pêra a melhor concentração de ágar foi de 10 g.L^{-1} , já Almeida et al. (2011), em seu trabalho concluiu que para a germinação *in vitro* de pólen de milho o meio de cultivo com melhor desempenho foi de 0,7 % de ágar, considerando um tubo de ensaio com 15 ml de meio.

Com resultados similares ao deste trabalho, porém no estudo da cultura do Crisântemo Paiva (1999), afirma que os meios líquidos e semi-sólidos apresentam como limitação a sustentação do explante. No seu experimento os explantes ficaram inclinados ou sobrenadantes ocasionando a formação de brotos invertidos. Já nas concentrações mais elevadas (1,05% em 15 ml de meio por tubo de ensaio), o meio apresentou bastante rígido, dificultando a penetração do explante, embora não tenha afetado o desenvolvimento dos brotos. Para o número de folhas a melhor concentração foi de 0,7 % de ágar (tubos de ensaio com 15 ml de meio por tubo).

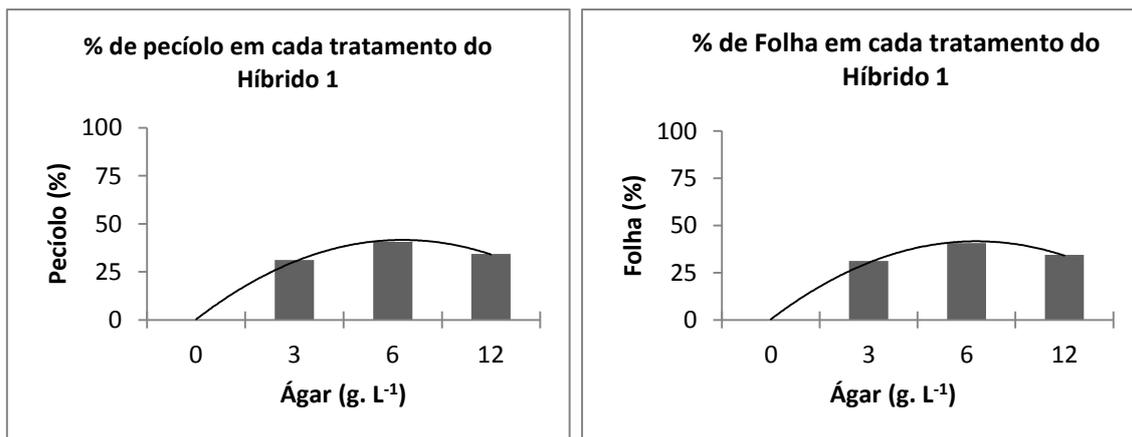


Figura 06: Porcentagem da presença de pecíolo e folhas no híbrido 1 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus*), estabelecido *in vitro* sob as diferentes concentrações de ágar.

Para as porcentagens de broto e calo as melhores concentrações para a fase de estabelecimento foram de 7,94 e 8,53 g.L⁻¹ respectivamente (figura 07). Rodrigues et al. (2003) afirma que já para a fase da multiplicação, o meio MS, contendo 5,5 g.L⁻¹ de ágar, proporciona os melhores resultados para o número de brotações na cultura do *Prunus* sp.

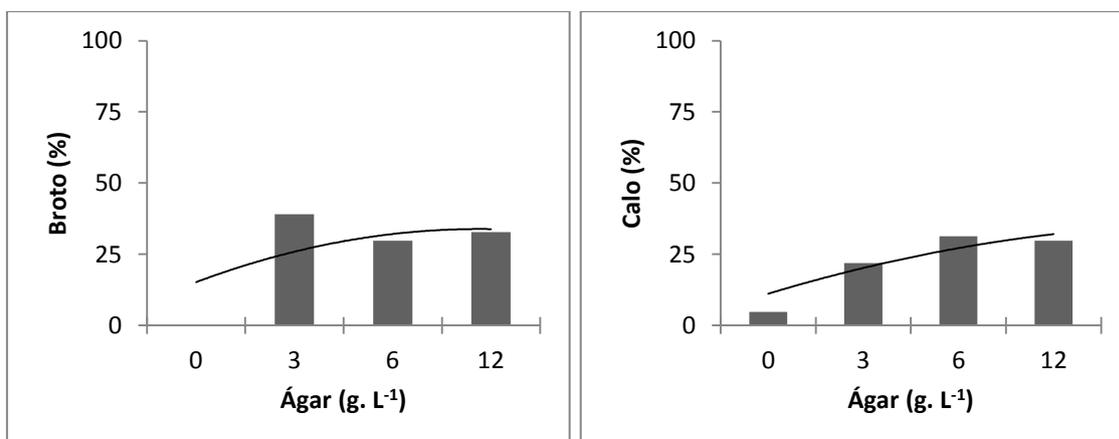


Figura 07: Porcentagem da presença de broto e calo no estabelecimento *in vitro* dos híbridos de (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*), sob diferentes concentrações de ágar.

Na figura 8 a curva de regressão mostrou, que não houve infestação de *Fusarium* sp. próximo as concentrações de 6 e 8 g.L⁻¹ de ágar. Submetidos ao cálculo de derivada pode-se observar que o valor mínimo estimado ocorreu na concentração de 7,25g.L⁻¹ de ágar.

Nas menores concentrações o excesso de umidade pode ter contribuído para uma maior taxa de proliferação do fungo. Com melhor vigor no seu desenvolvimento os explantes estabelecidos entre as concentrações de 6 e 8g.L⁻¹ impediram o germinação do fungo que se caracteriza por apresentar um hábito saprófita. Em concentrações mais

elevadas o meio de cultura já endurecido não proporcionou condições para um bom estabelecimento dos híbridos o que pode ter resultado em morte e início de decomposição dos explantes, sendo esta uma condição ideal para a frutificação e estabelecimento de fungos do gênero *Fusarium* sp.

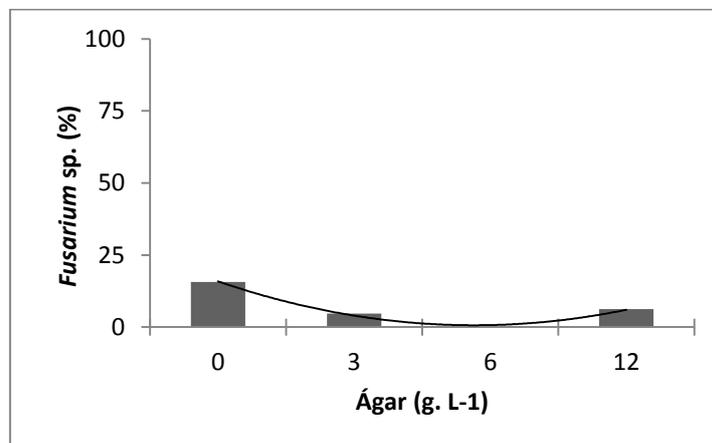


Figura 08: Porcentagem da presença de *Fusarium* sp. no estabelecimento *in vitro* dos híbridos de Híbrido 1 (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*), sob diferentes concentrações de ágar.

Interações positivas puderam ser observadas em concentrações de ágar mais próximas de 7 g.L⁻¹ o que refuta os resultados de alguns autores, que defendem a utilização de meios líquidos.

A obtenção de melhores resultados em meio líquido pode ser explicada pelo fato de que altas concentrações de ágar, ou meios muito consistentes acabam limitando a difusão de nutrientes até o explante (ROMBERGER & TABOR, 1971). Além disso, o meio de cultura sem adição de ágar possui consistência líquida ou um pouco mais consistente em baixas concentrações desse solidificante, permitindo maior absorção de água pelos tecidos dos explantes quando cultivados em meio mais aquoso (WILLIANS & LEOPOLD, 1989). Pasqual et al. (2008) confirma, o uso de meios líquidos viabilizam a absorção de nutrientes e minerais presentes no meio de cultura, favorecendo o acúmulo de matéria fresca e seca no explante, no seu caso em abacaxizeiro ornamental.

Aumentos nas concentrações de solidificantes induziriam maiores resistências a difusão dos reguladores de crescimento e nutrientes no meio, enquanto baixas concentrações incrementariam o crescimento de ramos de pêra pela maior disponibilidade de nutrientes. (LEITE, 1993).

Andrade et al. (2011) afirma que não há necessidade de uso de ágar na composição do meio de cultura para o enraizamento de mudas de bananeira das

cultivares Grande Naine e de Prata-Anã, quando micropropagadas em laboratório. Utilizando-se também da bananeira Prata-anã, Couceiro (2001) atesta que as concentrações de ágar que proporcionaram melhor crescimento das mudas variam de 2,3 a 4,0 g.L⁻¹.

O fato da maioria dos resultados terem sido observados na ausência ou em baixas concentrações de ágar está relacionado ao potencial osmótico. Desta forma, o aumento das concentrações de ágar promove a elevação do potencial osmótico do meio de cultura, dificultando a difusão dos nutrientes para os embriões e, conseqüentemente, reduzindo seu desenvolvimento (PASQUAL et al. 2002).

Por se tratar de eventos biológicos, a ocorrência de variações nas respostas de cada cultura em relação ao cultivo *in vitro* é normal acontecer. Lima et al. (2007) assegura que o desenvolvimento *in vitro* de eixos embrionários de urucu é melhor em meio MS com concentração de 10g.L⁻¹. Em plântulas oriundas de sementes sem tegumento, a massa seca foi crescente com o aumento da concentração de ágar no meio de cultura. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de que maiores concentrações de ágar no meio de cultivo favorecem a absorção de minerais e, conseqüentemente, maior acúmulo de biomassa, culminando com maior massa seca. O contrário foi observado em sementes intactas e eixos embrionários, onde ocorreu uma queda na massa seca das plântulas, com o aumento da concentração de ágar no meio de cultivo.

Essas variações tão diversificadas das concentrações de ágar podem ter sua causa associada ao fato de que a utilização do ágar pode estar associada a outros componentes do meio de cultivo, como o experimento estabelecido por Pasqual et al. (2008) que notou que o aumento das dosagens de ágar (0; 2,5; 5,0; e 7,5 g.L⁻¹) proporcionou queda linear da massa seca do abacaxizeiro ornamental, estando as dosagens de ágar associada concentrações de BAP e ANA.

5 CONCLUSÕES

O híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* obteve melhor desempenho no estabelecimento *in vitro* em relação ao híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.

A melhor concentração de ágar no estabelecimento *in vitro* dos híbridos de eucalipto empregando um método direto de regeneração se encontra no intervalo entre 7,25 e 7,94 g.L⁻¹ de ágar .

Estudos mais aprofundados devem ser feitos de modo a combinar as concentrações de ágar com outros elementos da micropropagação como, por exemplo, a sacarose, pH, luminosidade, hormônios de crescimento, etc.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G. & ASSIS, T. F.. **Clonagem e doenças de eucalipto**. 2ª edição – Viçosa/MG, Ed. UFV, 2009. 500p.
- ALMEIDA, C.; AMARAL, A. L.; BARBOSA NETO, J. F. & SERENO, M. J. C. M. Conservação de germinação *in vitro* de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). In: **Revista Brasileira Botânica**, v.34, n.4, p. 493 – 497, out – dez. 2011.
- ALMEIDA, J. R.; MARTINS, C. R. & DUTRA, L. F.. Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* visando estabelecimento *in vitro*. In: **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.15, n.1, p. 54-60. 2008.
- ANDRADE, M.W.; LUZ, J.M.Q.; LACERDA, A.S. *et al.* Micropropagação de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Allemao). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n.1, p.174-180, 2000.
- ANDRADE, R. A.; MARQUES, T. F.; JASPER, S. P.; DAMATTO JUNIOR, E.I R.; FUZITANI, E. J. & NOMURA, E. S. Micropropagação de mudas de bananeira em meio líquido. **Comunicata Scientia**156-159, 2011.
- BORÉM, A.. **Biotecnologia florestal**. 22ª. Edição, Viçosa, MG. Ed. UFV. 387p. 2007.
- BORÉM, A. & MIRANDA, G. V.. In: **Melhoramento de plantas**. 5ª edição. revisada e ampliada – Viçosa, MG. Ed. UFV. 529p. 2009.
- BORGES, S. R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; LOPES, A. P.; OTONI, W. C.; TAKAHASHI, E. K. & MELO, L. A.. Estabelecimento *in vitro* de Clones Híbridos de *Eucalyptus globulus*. In: **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 605-616, jul.-set., 2012
- CANÇADO, G. M. A.; LONDE, L. N.. **Biotecnologia Aplicada a agropecuária**. Caldas: EPAMIG Sul de minas- Laboratório de biotecnologia vegetal. 2012.
- CHAGAS, E. A.; PIO, R.; CHAGAS, P. C.; PASQUAL, M. & NETO, J. E. B.. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta –enxertos de pereira. In: **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.2, p.261 – 266, fev, 2010.
- CID, P. B.. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? In: **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Ano 3, numero 19, Mar/Abr – 2001.
- COUCEIRO, M. A.; SIQUEIRA, D. L. & PEREIRA, W. E.. Crescimento *in vitro* de explantes da bananeira prata anã em função de marca e concentrações de ágar. In: **Revista Ceres**. 48(280): 671 – 680, 2001.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I. & BRONDANI, G.. A micropropagação do eucalipto. *In: Pesquisa florestal Brasileira*, Colombo, n.58. p. 49-59, jan/jun. 2009.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A. & NACHTIGAL, J. C.. **Propagação de Plantas Frutíferas**. Brasília/DF Ed. EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. 221p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G.-J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1, p. 29-64.

GONÇALVES, A. N. **Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla*. S.T. *in vitro***. 1982. 97 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 1982.

LAMEIRA, O.A.; LEMOS, O.F.; MENEZES, I.C. de; PINTO, J.E.B.P. **Cultura de tecidos (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 66).

LEITE, D. L.; PETERS, J. A. & NAKASU, B. H.. Efeito de solidificantes sobre a multiplicação e crescimento de gemas de pereira. *In: Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 5(1): 47 – 49, 1993.

LENCINA, K. H.; BISOGNIM, D. A.; KIELSE, P. PIMENTEL, N. & FLEIG, F. D. Estabelecimento e crescimento *in vitro* de plantas de grábia. *In: Ciência Rural*, Santa Maria, v.44, n.6, p. 1025 – 1030, jun, 2014.

LIMA, R. V.; LOPES, J. C.; SCHMILDT, E. R. & MAIA, A. R.. Germinação *in vitro* de urucu. *In: Revista Brasileira de Sementes*, v. 29, n. 1, p. 171 – 177, 2007.

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

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; SILVA, F. O. X. & BRAHM, R. U.. **Produção de matrizes por cultura de tecidos**. EMBRAPA. Sistemas de Produção 7, ISSN 1806-9207 Versão Eletrônica. Nov./2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MatrizesMorangueiro/cap06.htm>>. Acesso em: 26/05/14.

OLIVEIRA, M. L.; PENCHEL FILHO, R. M.; OTONI, W. C.; TEIXEIRA, J. B. Efeitos do meio de cultura e da relação BAP/ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em biorreator de imersão temporária. *Revista Árvore*, v. 35, n. 6, p. 1207-1217, 2011.

PAIVA, H. N.; JACOVINE, L. A. G.; TRINDADE, C. & RIBEIRO, G. T. **Cultivo de eucalipto: implantação e manejo**. Viçosa, MG. Ed: Aprenda fácil, 2011.354p.

PAIVA, P. D. O; PASQUAL, M. & PAIVA, R. Efeito de concentrações de ágar e níveis de pH na propagação *in vitro* de crisântemo. *In: Revista Ceres*, 46(264): 141 – 148, 1999.

PIATI, A.; SCHNEIDER, C. F.; NOZAKI, M. H. Efeito *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento e desenvolvimento de *Penicillium* sp. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 3, p. 1033-1040, 2011.

PASQUAL, M.; FINOTTI, D. R.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A. & RIBEIRO, L.O. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina ‘poncã’ em função de pH e da concentração de ágar. *In: Revista Brasileira Agrociência*, v.8, n. 3, p. 199 – 202, set – dez, 2002.

PASQUAL, M.; SANTOS, F. C.; FIGUEREDO, M. A.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C. & FERREIRA, E. A.. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. *In: Horticultura Brasileira*. 26: 045 – 049. 2008.

CARVALHO, P. E. R. **Grápia ‘taxonomia e nomenclatura’**. Circular técnica. EMBRAPA Florestas. Colombo - PR, ISSN 7577-5278. 2003.

RODRIGES, A. C.; SILVEIRA, C. A. P.; FORTES, G. R. L.; FACHINELLO, J. C. & SILVA, J. B. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *prunus* sp. em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 1, p. 131-133, 2003.

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