

André Schatz Pellicciotti

**DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE
Eucalyptus urophylla S.T. BLAKE: PROPOSTA DE DESENVOLVIMENTO DO
PRIMEIRO CLONE PARA A REGIÃO SUDESTE DO ESTADO DO ACRE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Acre, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de Mestre em Ciência Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Ary Vieira de Paiva

Rio Branco, AC
2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

P391d Pellicciotti, André Schatz, 1982-
Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake: proposta de desenvolvimento do primeiro clone para a região sudeste do Estado do Acre / André Schatz Pellicciotti ; orientador: Prof. Dr. Ary Vieira de Paiva. – 2018.
64 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal. Rio Branco, 2018.
Inclui referências bibliográficas e apêndices.

1. Ciência Florestal – Mestrado. 2. Eucalipto – Propagação. 3. Tecidos vegetais – Cultura e meios e cultura. I. Paiva, Ary Vieira (orientador). II. Título.


CDD: 634




UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Centro de Ciências Biológicas e da Natureza
Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal

ATA DE SESSÃO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO
MESTRANDO ANDRÉ SCHATZ PELLICCIOTTI, DISCENTE
DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
FLORESTAL, REALIZADA NO DIA 23 DE MAIO DE 2018.

Às quinze horas do dia 23 de maio de 2018, na Sala Ambiente da Engenharia Agrônômica, realizou-se a Defesa de Dissertação intitulada: **“DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE: PROPOSTA DE DESENVOLVIMENTO DO PRIMEIRO CLONE PARA A REGIÃO SUDESTE DO ESTADO DO ACRE”**, de autoria do mestrando ANDRÉ SCHATZ PELLICCIOTTI, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de Mestrado. A Comissão Examinadora esteve constituída pelos membros: Prof. Dr. Ary Vieira de Paiva (Presidente/Orientador – UFAC), Dra. Anelena Lima de Carvalho (Membro Externo – SEMA/AC) e o Pesquisador Dr. Rivaldalve Coelho Gonçalves (Membro Externo – EMBRAPA/AC). Após a exposição oral, o discente foi arguido pelos examinadores. Ao final da arguição a sessão foi suspensa e, em sessão secreta, os examinadores atribuíram o resultado. Reaberta a sessão pública para anunciar o resultado, o discente foi considerado **APROVADO** pela Comissão Examinadora. E para constar, foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos membros da Comissão.


Prof. Dr. Ary Vieira de Paiva (Presidente/Orientador – UFAC)


Dra. Anelena Lima de Carvalho (Membro Externo – SEMA/AC)


Dr. Rivaldalve Coelho Gonçalves (Membro Externo – EMBRAPA/AC)

Aos meus pais Sandra e Danilo, a minha irmã Patrícia, a minha avó Vilma.

A minha companheira Samia e meu enteado Nathan.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ary Vieira de Paiva pela orientação, disponibilidade e amizade.

Ao Secretário de Meio Ambiente do Estado do Acre, Prof. Carlos Edegard de Deus, pela oportunidade concedida e a liberação do trabalho para o acompanhamento das aulas do curso de mestrado e pela disponibilidade de utilização de espaço físico e insumos do Viveiro da Floresta e Biofábrica (SEMA).

Aos amigos e colegas de trabalho, Eng^a Agrônoma, Me. Simone de Alencar Maciel e Eng. Florestal Roberto de Jesus Fabbrocini Gonçalves por todo apoio intelectual, técnico e operacional para o desenvolvimento deste trabalho. Ao amigo Prof. Dr. Thiago Augusto da Cunha por todo o apoio com a análise estatística desta pesquisa. Sem estas pessoas não seria possível a realização deste trabalho.

Aos colegas de trabalho da Secretaria de Estado de Meio Ambiente – SEMA, João Paulo S. Mastrangelo, Marky Lowell R. de Brito, Sara Maria V. Melo, Ricardo Brasil C. da Cunha, Kleto Eduardo de A. Castelo, Juscélia Aparecida B. de Almeida, Mônica A. da Costa e a equipe de colaboradores do Viveiro da Floresta e Biofábrica, por todo o apoio para a realização deste trabalho.

A Prof^a. Dra. Christina Lynn Staudhammer da Universidade do Alabama (EUA) pelo suporte com a análise estatística.

Ao Técnico da Unidade de Tecnologia de Alimentos (UTAL/UFAC), Rui Sant'Ana de Menezes, pelo apoio na análise química de insumos utilizados nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Amaro, aos pesquisadores da EMBRAPA Acre, Dr. Rivaldalve Coelho Gonçalves e Eng. Florestal, Me. Luís Cláudio de Oliveira, ao pesquisador da EMBRAPA Rondônia, Eng. Florestal, Me. Henrique Nery Cipriani e ao amigo de graduação Eng. Florestal, Me. Lucas Soares Amaral, pelas reuniões técnicas, disponibilidade de material bibliográfico e apoio com a pesquisa.

Ao Prof. Me. Hudson Franklin Pessoa Veras e Engenheiro Florestal José Jaércio do Nascimento Lima pela amizade e disponibilidade de espaço físico para a escrita da dissertação.

Aos Professores da Engenharia Florestal pelo pioneirismo em construir e contribuir com o curso de mestrado em Ciência Florestal da Universidade Federal do Acre.

A Adriana da Coordenação do curso de mestrado em Ciência Florestal.

Aos colegas de pós-graduação, Cristiane, Edivan, Harley, José Jaércio, Juliana, Naele, Renato, Sabrina, Simony e Quelyson.

Em especial a minha companheira Samia e meu enteado Nathan pela amizade, amor, companheirismo e paciência.

Aos meus pais Sandra e Danilo, minha irmã Patrícia e minha avó Vilma, pelo amor, ensinamentos, incentivo e o apoio sempre presente para minha formação.

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

RESUMO

DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE: PROPOSTA DE DESENVOLVIMENTO DO PRIMEIRO CLONE PARA A REGIÃO SUDESTE DO ESTADO DO ACRE

O *Eucalyptus urophylla* apresenta grande potencial para o cultivo na região Sudeste do Estado do Acre, Brasil, devido à sua origem na região de Flores, Indonésia, com diagrama climático semelhante. Considerando-se o desempenho silvicultural, as plantas selecionadas poderão compor fenologias para futuras plantações na região. A clonagem de plantas superiores pode ser realizada por meio da micropropagação de material juvenil proveniente de árvores adultas, com de técnicas especiais e métodos de desinfestação de explantes na cultura de tecidos, para promover condições favoráveis de estabelecimento, crescimento e enraizamento. Atualmente, a micropropagação do *Eucalyptus* é utilizada principalmente para o rejuvenescimento de materiais clonais para a produção massal de mudas em minijardins clonais e, para a formação de bancos de germoplasma de árvores selecionadas. Na micropropagação do *Eucalyptus*, um dos métodos mais utilizados no controle da contaminação de explantes por fungos e bactérias, é por meio de hipoclorito de sódio (NaClO) e etanol (CH₃CH₂OH). Além disso, o estabelecimento de explantes para a multiplicação na cultura de tecidos é realizado em diferentes meios de cultura. Com o objetivo de testar a utilização de etanol e diferentes concentrações de hipoclorito de sódio na desinfestação de explantes de segmento nodal de brotações epicórmicas de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake, avaliou-se a probabilidade de contaminação de explantes com fungos, com bactérias ou oxidados, sem a presença de algum destes microrganismos em diferentes meios de cultura, bem como, daqueles explantes estabelecidos *in vitro* e considerados saudáveis. Os melhores resultados no controle da contaminação por bactérias e no estabelecimento dos explantes, foram observados nos tratamentos com o meio de cultura WPM. O controle de contaminação por fungos e a menor probabilidade de ocorrência de oxidação, foram observados nos tratamentos com o meio de cultura ½ MS e nos tratamentos com a utilização de etanol a 70% (v/v).

Palavras-chave: Banco de germoplasma; Resgate de matrizes; Cultura de tecidos; Micropropagação; Meios de cultura; Desinfestação de explantes.

ABSTRACT

DISINFESTATION AND ESTABLISHMENT *IN VITRO* OF *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE: DEVELOPMENT PROPOSAL OF THE FIRST CLONE FOR THE SOUTHEAST REGION OF THE STATE OF ACRE

Eucalyptus urophylla shows great potential for the cultivation in Southeast region of the State of Acre, Brazil, as a result of its origins in Flores region, Indonesia, with similar climate system. Considering the forestry performance, the selected plants can be an excelente alternative to future plantation in the region. The cloning of plants could be performed through micropropagation of juvenile shoots from adult trees, by special techniques and disinfestation methods of explants in tissue culture, to promote favorable establish, growth and rooting condition. Currently, the *Eucalyptus* micropropagation is mainly used for the rejuvenation of clonal mass production in clonal minigarden seedlings and for the formation of germoplasm bank from selected trees. In *Eucalyptus* micropropagation, one of the most used methods in fungi and bacteria's contamination explants control, it is by the use of the concentration of sodium hypochlorite solution (NaOCl) and ethanol (CH₃CH₂OH). Moreover, the explants establishment for the tissue culture multiplication is carried in different culture medium. With the aim to test the use etanol and different concentration of NaOCl in explants disinfestations of the nodal segmento of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake epicormic sprouting, it was evaluated the explants contamination probability with fungus, with bacteria or oxidized, without the presence of some of those microorganism in different tissue culture, as well as those *in vitro* established explants and considered healthy. The best results in bacteria's contamination control and in the expants establishment, were observed in the treatments with the woody plant medium (WPM). The fungi contamination control and the lesser probability of occurrence of oxidation, were observed with the half-strength MS medium and in the treatments with the use of ethanol 70% (v/v).

Keywords: Germoplasm bank; Redemption of trees matrices; Tissue culture; Micropropagation; Culture médium; Disinfestation of explants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização da área de plantio da matriz de <i>Eucalyptus urophylla</i>	25
Figura 2 – Mapa de classificação dos solos encontrados na região, segundo Acre (2010), da área de plantio da matriz de <i>Eucalyptus urophylla</i>	26
Figura 3 – Procedimento de anelamento parcial do caule de <i>Eucalyptus</i> (A); Altura do painel para a indução de brotações epicórmicas do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> (B); Brotações epicórmicas do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> (C); Coleta de brotações epicórmicas de <i>Eucalyptus urophylla</i> para a produção de estacas e mudas (D).....	30
Figura 4 – Cepa do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> podada para a obtenção de brotações laterais (A); Brotações laterais de cepa do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> uma semana após o procedimento de poda (B); Brotações laterais de cepa do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> três semanas após o procedimento de poda (C); Brotações laterais de cepa do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> com padrão utilizado para obtenção de explantes para a micropropagação (D); Detalhe do segmento nodal extraído de brotações do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> para a micropropagação (E).....	31
Figura 5 – Explante do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> inoculado individualizado em meio de cultura no tubo de ensaio (A); Disposição dos tratamentos com explantes do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> inoculados em diferentes meios de cultura utilizados nos tratamentos (B).....	33
Figura 6 – Probabilidade de ocorrer contaminação de explantes do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> por fungos, quando avaliados em diferentes meios de cultura. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer.....	39
Figura 7 – Probabilidade de ocorrer contaminação de explantes do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> por fungos, quando avaliados com o fator etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer	40
Figura 8 – Probabilidade de ocorrer contaminação de explantes do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> por fungos, quando avaliados em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO) para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer.....	40
Figura 9 – Probabilidade de ocorrer contaminação por fungos nos explantes do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> , quando tratados com diferentes concentrações de NaClO , combinado com a utilização de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer	42
Figura 10 – Probabilidade de ocorrer contaminação de explantes do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> por bactérias, quando avaliados em diferentes meios de cultura. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer.....	44
Figura 11 – Probabilidade de ocorrer contaminação de explantes do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> por bactérias, quando tratados com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer.....	45

Figura 12 – Probabilidade de ocorrer contaminação de explantes do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> por bactérias, quando tratados com o fator etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer	45
Figura 13 – Probabilidade de ocorrer contaminação por bactérias nos explantes do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> , quando tratados com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO), combinado com a utilização de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer.....	46
Figura 14 – Probabilidade de ocorrer oxidação de explantes do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> , quando tratados em diferentes meios de cultura. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer.....	48
Figura 16 – Probabilidade de ocorrer oxidação de explantes do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> , quando tratados com o fator etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer	49
Figura 15 – Probabilidade de ocorrer oxidação nos explantes do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> , quando tratados com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer.....	49
Figura 17 – Probabilidade de ocorrer oxidação nos explantes do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> , quando tratados com etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e cultivados em diferentes meios de cultura. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer.....	50
Figura 18 – Probabilidade de explantes saudáveis do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> , estabelecidos in vitro com diferentes meios de cultura. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer.....	51
Figura 19 – Probabilidade de estabelecimento de explantes do clone de <i>Eucalyptus urophylla</i> , quando tratados com a utilização de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis dendrométricas das árvores dominantes no plantio de <i>Eucalyptus urophylla</i>	36
Tabela 2 – Teste para os efeitos fixos avaliados no experimento para a ocorrência de fungos nos explantes de <i>Eucalyptus urophylla</i>	38
Tabela 3 – Teste para os efeitos fixos avaliados no experimento para avaliação da ocorrência de bactérias nos explantes de <i>Eucalyptus urophylla</i>	43
Tabela 4 – Teste para os efeitos fixos avaliados no experimento para avaliação da ocorrência de oxidação nos explantes de <i>Eucalyptus urophylla</i>	47
Tabela 5 – Teste para os efeitos fixos avaliados no experimento para a avaliação da ocorrência de brotação para o estabelecimento dos explantes de <i>Eucalyptus urophylla</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS

atm – atmosfera

μm – micrômetro

mm – milímetro

cm – centímetro

m – metro

m^2 – metro quadrado

m^3 – metro cúbico

cm – centímetro

cm^3 – centímetro cúbico

ppm – partes por milhão

N-P-K – Nitrogênio - Fósforo - Potássio

N – normal

v/v – fração de volume

LISTA DE SÍMBOLOS

® – marca registrada

F2 – segunda geração de melhoramento derivado de autofecundação

°C – graus celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 A IMPORTÂNCIA DO GÊNERO <i>Eucalyptus</i> e o <i>Eucalyptus urophylla</i>	16
2.2 RESGATE DE ÁRVORES MATRIZES DE <i>Eucalyptus</i>	19
2.3 MICROPROPAGAÇÃO DO EUCALIPTO	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE COLETA	25
3.2 SELEÇÃO E RESGATE DA MATRIZ DE <i>Eucalyptus urophylla</i>	27
3.2.1 Seleção da matriz, cálculo do volume total e incremento médio anual.....	27
3.2.2 Resgate da matriz e produção de mudas para o jardim clonal.....	29
3.3 DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE EXPLANTES	30
3.3.1 Estratégia para análise estatística do experimento	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 CRESCIMENTO E PRODUÇÃO.....	35
4.2 DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES	37
4.2.1 Ocorrência de contaminação por fungos	37
4.2.2 Ocorrência de contaminação por bactérias.....	42
4.2.3 Ocorrência de oxidação dos explantes	47
4.3 ESTABELECIMENTO DE EXPLANTES	50
5 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
APÊNDICES	61

1 INTRODUÇÃO

O eucalipto (*Eucalyptus* spp., *Corymbia* spp.) compreende mais de 820 espécies de plantas utilizadas pela humanidade para a produção de óleos essenciais, madeira para celulose, madeira para energia elétrica, lenha, carvão, papel, construções rurais, construção civil urbana e móveis e painéis, a exemplo do MDF.

As primeiras plantas foram introduzidas no Brasil no início do século XX para a produção de dormentes de estrada de ferro e, desde então o país desenvolveu grandioso parque industrial nas diferentes cadeias de valor da madeira do eucalipto.

O Brasil possui 5,6 milhões de hectares de florestas de eucalipto e ocupa posição de destaque no ranking global de produtividade devido as tecnologias adotadas no cultivo de suas florestas plantadas.

Na região Norte do Brasil, os estudos de florestas plantadas com espécies de elevado potencial de crescimento que torne possível a viabilidade da atividade de reflorestamento, são escassos. Neste sentido, a pesquisa do eucalipto no Acre é fundamental para iniciar o desenvolvimento científico e fenológico em silvicultura.

O novo Código Florestal, Lei Federal Nº 12.651, de 25 de maio de 2012, tem o propósito de regular a proteção da vegetação nativa e, dentro outros, o suprimento de matéria prima florestal. O Art. 59, estabelece que a União, os estados e o Distrito Federal deverão implantar Programas de Regularização Ambiental – PRA´s de posses e propriedades rurais, com o objetivo de adequá-las nos termos da lei.

Na construção do marco legal do Programa de Regularização Ambiental - PRA no estado do Acre, publicado por meio da Lei Nº 3.349, de 18 de dezembro de 2017, adotou-se como uma das principais diretrizes, que a recomposição florestal em imóveis e posses rurais, deve conciliar objetivos ecológicos e econômicos na área objeto da regularização, conforme promulgado no novo Código Florestal.

Ainda, o Art. 66, § 3º da Lei Federal 12.651 de 2012 prevê, observado alguns parâmetros, que a recomposição de passivos florestais em áreas de Reserva Legal poderá ser realizada mediante o plantio intercalado de espécies nativas com exóticas ou frutíferas, em sistema agroflorestal (Brasil, 2012).

O plantio de eucalipto dentro de um processo de recomposição florestal para a produção de madeira para lenha, geração de energia elétrica, a produção de estacas de cerca e mourões e para o setor de construção civil, deverá diminuir a pressão sobre as florestas nativas.

A mais de meio século, a silvicultura de eucalipto no Brasil tem expandido a possibilidade da implantação de reflorestamentos em áreas até então não indicadas, principalmente pelas limitações anteriores de materiais genéticos disponíveis, tornando-se de grande importância para sua evolução, o desenvolvimento de novos clones.

O desenvolvimento de clones de eucalipto por melhoramento genético para a formação de povoamentos florestais com elevada produtividade e homogeneidade promove a racionalização da utilização dos recursos e a planificação da produção florestal possibilitando a ampliação dos plantios em todo o território nacional, para as mais diversas finalidades.

Um dos métodos de melhoramento genético de plantas adotado na silvicultura de eucalipto é a seleção de genótipos superiores em população de espécie pura, após a avaliação fenotípica. Os genótipos superiores podem ser utilizados como genitores para cruzamentos ou como plantas matrizes para a obtenção de clones que, após os testes clonais para verificação de produtividade e estabilidade, os clones adaptados e estáveis são indicados para plantio comercial.

Para o resgate de plantas matrizes, a clonagem por macroestaquia e/ou por micropropagação *in vitro* são as técnicas mais utilizadas.

Uma vez obtidos os clones, o desenvolvimento de tecnologia para a multiplicação das plantas é fundamental, de modo a se ter mudas em quantidade suficiente para os plantios comerciais, que demanda mais de 900 mudas por hectare.

As atividades de pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação da cadeia produtiva de *Eucalyptus* spp. no Acre, poderão contribuir para a geração de conhecimento científico e oferta de tecnologia de propagação massiva de mudas clonais para a formação de plantios comerciais.

A produção de mudas via micropropagação do *Eucalyptus* é utilizada principalmente para o rejuvenescimento de materiais clonais para a produção massal de mudas em minijardins clonais e para a formação de bancos de germoplasma de árvores selecionadas, estratégias da clonagem para o setor florestal.

O objetivo do presente estudo foi avaliar métodos de desinfestação para o estabelecimento *in vitro* de explantes provenientes de brotações epicórmicas de um indivíduo adulto de *Eucalyptus urophylla*, após a seleção fenotípica de plantas com características silviculturais superiores, para a formação de um banco de germoplasma.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A IMPORTÂNCIA DO GÊNERO *Eucalyptus* e o *Eucalyptus urophylla*

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae, tem sua origem na Austrália e em ilhas na Oceania, como as espécies *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake e *Eucalyptus deglupta* Blume (EUCALIPTO, 2018). Atualmente, há registros de 822 espécies identificadas e aceitas (EUCALYPTUS, 2018), que apresentam diferentes exigências quanto à fertilidade de solo, tolerância a geadas e à seca, o que torna possível seu plantio em diversas regiões no mundo.

Os primeiros registros da introdução do gênero no Brasil, datam de meados do século XIX e pela ausência de notações históricas mais precisas, não se sabe ao certo o ano em que foi trazido ao país. Edmundo Navarro de Andrade, foi um dos pioneiros na cultura do eucalipto no Brasil e por meio da Companhia Paulista de Estradas de Ferro, implementou seu cultivo como potencial recurso madeireiro para fabricação de dormentes, lenha e carvão, no início do século XX (FOELKEL, 2005).

Eucalyptus urophylla, sempre despertou bastante atenção na silvicultura clonal desde as primeiras introduções e é atualmente uma das espécies mais plantadas no Brasil, pois apresenta tolerância ao cancro do eucalipto causado por *Chrysoporthe cubensis* e possui boa adaptação em diversas condições edafoclimáticas, principalmente em regiões de clima tropical, além de boa capacidade de brotação de cepas (MORI et al., 1988; FERREIRA et al., 2004; SCANAVACA JUNIOR et al., 2004; FONSECA et al., 2010; SOUZA et al., 2011).

Santos et al. (1990) e Ferreira (1992) relatam que em 1976 a 1978, foram realizadas pelas companhias Vale do Rio Doce, Aracruz Florestal, Siderúrgica Belgo Mineira, Suzano Papel e Celulose, Duratex Florestal, Klabin, Riocell e Embrapa, as primeiras missões à região de origem de ocorrência do *E. urophylla*, para a coleta de sementes obtidas individualmente em árvores selecionadas fenotipicamente e em diversas populações selvagens destas regiões e sua importação ao Brasil, para obtenção de novos materiais genéticos e para o estabelecimento de populações base mais representativas.

Eucalyptus urophylla é uma espécie de árvore geralmente de grande porte, com fuste reto e forte dominância apical, com casca rugosa e folhas longas e estreitas, que ocorre naturalmente em ilhas do arquipélago Sonda, região da Indonésia e Timor

(Flores, Lomblem, Alor, Adonara, Pantar e Wetar), de características tropicais e ocorrência natural, em locais de latitudes entre 7°30' S e 10°00' S e longitudes de 122°00' L e 127°00' L, (MARTIN & COSSALTER, 1976) em altitudes que variam entre 350 metros até cerca de 3.000 metros, nas ilhas ao Norte da Austrália (MOURA; FERREIRA et al., 2004).

Segundo Ferreira (1982), o *E. urophylla* foi introduzido em São Paulo, com a nomenclatura de *Eucalyptus alba*. Em 1919, Navarro de Andrade, introduziu a espécie em Rio Claro - SP, oriundas de coletas de sementes da ilha de Java, do Instituto de Bogor, provavelmente de uma ou duas árvores isoladas.

O desenvolvimento de plantios de *Eucalyptus* está crescendo rapidamente no Brasil (XAVIER et al., 2010) e em muitas partes do mundo (GONZALES et al., 2011a; MIRANDA et al., 2017).

Segundo dados da Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas - ABRAF (2013), no ano de 2012 no Brasil, a área de plantios de *Eucalyptus* totalizou aproximadamente de 5,1 milhões de hectares, com crescimento de 4,5% comparado à 2011 e as maiores áreas de cultivo, em ordem decrescente, estão localizadas nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Mato Grosso do Sul, respectivamente.

Considerando o período de 2011 a 2016, a evolução da área plantada no Brasil e principalmente no estado de Mato Grosso do Sul obteve ganhos significativos, fazendo com que saltasse da quarta para terceira posição, no ranking dos estados com a maior área plantada com *Eucalyptus* (IBÁ, 2017).

Para IBGE (2016), publicado por meio do periódico da Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura - PEVS 2016, a silvicultura segue ganhando espaço em relação à extração vegetal na produção madeireira nacional e a produção de *Eucalyptus* representou 54,7% da produção nacional de madeira em tora para diversas finalidades. Como principal responsável deste crescimento, a área plantada com *Eucalyptus* corresponde a mais de 7,55 milhões de hectares, representando 75,3% do total de maciços florestais plantados no Brasil.

Vieira et al. (2007), citam que a metade da produção de madeira em toras é proveniente da Região Amazônica e classifica a atividade florestal na Região Norte fundamental para o país.

Como estratégia para a região amazônica, Bentes-Gama (2005), argumenta que a utilização de matéria-prima proveniente de florestas plantadas é importante no sentido da ampliação de possibilidades econômicas, para melhoria das condições

sociais e para que haja a promoção da recuperação ambiental em áreas alteradas pela agricultura e pecuária.

Araújo et al. (2012), demonstram que a utilização da madeira de florestas plantadas de *Eucalyptus* para produção de estacas de cerca, apresenta-se como uma excelente alternativa frente à exploração irresponsável de madeira de espécies nativas amazônicas, pois a utilização econômica destas árvores, onde, em alguns casos, de espécies sob ameaça de extinção, aliada às ações antrópicas, tem promovido forte pressão exploratória sobre algumas espécies de árvores nativas, ocasionando a diminuição do estoque original destes recursos florestais.

O Brasil vem aumentando a sua produção de lenha e o segmento industrial que mais a utiliza é o setor de cerâmica e considerando também o carvão vegetal, suas respectivas cadeias produtivas muitas vezes são incompletas, pois a oferta de madeira como matéria prima, oriunda de florestas nativas, aliado aos baixos preços praticados, desestimulam o desenvolvimento de florestas plantadas na Amazônia (SIMIONI et al., 2017). Ainda segundo esse autor, estudando o mercado entre 2001 e 2013, a participação percentual da lenha produzida no país proveniente de florestas plantadas saltou de 38% para mais de 64%.

Ainda são poucos os estudos que foram desenvolvidos com *Eucalyptus* na região Norte do Brasil e no estado do Acre, em específico, FERREIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009; ARAÚJO et al., 2012; SANTOS et al. 2014; SILVEIRO et al., 2015; SILVEIRO et al., 2016; SANTOS et al., 2016; QUEIROZ et al., 2016.

Assim como verificado por Queiroz et al. (2016), em pesquisa realizada sobre alguns aspectos econômicos de plantios de *Eucalyptus* no Acre, os estudos são mais amplamente realizados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil sendo insipiente na região Norte.

Em Rondônia, a produção de *Eucalyptus* ainda é pouco expressiva e devido à expansão das áreas de cultivo de grãos no Sul do estado, seu cultivo vem sendo expandido para produção de lenha para os secadores e mesmo faltando estudos para aprimorar a seleção de espécies e progênies de acordo com a região, é possível indicar materiais de forma geral, com os quais poderão ser obtidas produtividades elevadas, se conduzidos adequadamente (CIPRIANI, 2015a, b).

Golfari (1978a), elaborou um zoneamento ecológico para *Eucalyptus* no Brasil, principalmente por meio da comparação de variáveis climáticas e definições de zonas bioclimáticas entre Brasil e Austrália, e o estado do Acre é classificado em uma única

zona climática (19) com indicações das espécies *E. deglupta*, *E. terenticornis*, *E. torelliana*, *E. robusta* e *E. urophylla*.

Avaliando a produtividade de plantios de eucalipto por meio da interação entre genótipo, temperatura e precipitação, em 36 localidades no Brasil e Uruguai, em um gradiente de 3.500 quilômetros, Binkley et al. (2017) observaram que a produtividade variou em cinco vezes em todos os sítios avaliados e aproximadamente duas vezes entre os genótipos dentro de cada sítio, ressaltando a importância de combinar genótipos com as condições locais.

2.2 RESGATE DE ÁRVORES MATRIZES DE *Eucalyptus*

As estratégias para o melhoramento genético de espécies florestais, geralmente podem ser substanciadas na seleção de espécies ou procedências e a seleção individual dentro de populações base, obtida pela variabilidade genética natural existente entre populações e entre indivíduos (FERREIRA, 1992).

A seleção de matrizes de árvores de *Eucalyptus* é essencial para a obtenção de plantios clonais resistentes a doenças e de alta produtividade e os critérios de seleção, baseados em características fenotípicas de interesse, variam de acordo com a finalidade de uso da madeira (ALFENAS et al., 2009).

O resgate destas árvores superiores pode ser realizado em plantios seminais heterogêneos, obrigatoriamente requerendo a obtenção de material juvenil e o resgate do rejuvenescimento (reversão da fase adulta à fase juvenil) de matrizes adultas é normalmente realizado a partir de brotações epicórmicas, com maior aptidão ao enraizamento adventício (ALMEIDA et al., 2007; ALFENAS et al., 2009).

O método de resgate vegetativo mais comum utilizado pelas empresas florestais para obtenção de propágulos (brotações) de *Eucalyptus* é a talhadia ou condução da brotação de árvores adultas abatidas, uma técnica que fornece brotos juvenis excelentes, geralmente localizados em regiões inferiores ou centrais da planta matriz, pois possuem características mais juvenis (BONGA, 1982; HIGASHI et al., 2000; WENDLING, 2014), favorecendo o enraizamento nas estacas (BACCARIN et al., 2015).

Muitas vezes, entretanto, faz-se necessário a utilização de outros métodos para o resgate da juvenilidade sem a necessidade do abate da árvore matriz, como o anelamento da base do caule, o uso do fogo na base da árvore, o uso de galhos

podados para a indução de sua brotação em casa de enraizamento, por meio de injúrias mecânicas nas raízes e aplicação de substâncias reguladoras de crescimento (ASSIS et al., 1998; ALFENAS et al., 2009). São técnicas que podem promover a brotação para produção de estacas e obtenção de mudas clonais.

Almeida et al. (2007), avaliaram o resgate de árvores selecionadas de *Eucalyptus* por anelamento de caule e verificaram que essa técnica apresenta potencial para a indução de brotações.

2.3 MICROPROPAGAÇÃO DO EUCALIPTO

O desenvolvimento de tecnologias na propagação clonal de *Eucalyptus*, oferece vantagens pelo processo, pois maximiza os ganhos em homogeneidade e produtividade, em uma única geração (BRONDANI et al., 2009).

A cultura de tecidos vegetais, uma técnica empregada na biotecnologia para a propagação e manutenção de plantas, consiste no cultivo asséptico *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais, sob condições físicas e químicas definidas. É uma ferramenta importante em estudos básicos e aplicados, bem como para uso comercial. Sua história teve início com as ideias do cientista alemão, Haberlandt, nas primeiras décadas do século XX e a década de 1990 viu a expansão contínua das tecnologias *in vitro* e um aumento do número de espécies de plantas propagadas (THORPE, 2007; NETO et al., 2011).

Existem inúmeras pesquisas e aplicações comerciais da cultura de tecidos *in vitro*, incluindo a propagação e conservação de valiosos recursos genéticos de elite (JAIN et al., 2017) e a propagação clonal de espécies arbóreas, geralmente de difícil crescimento e diferenciação (HIGASHI et al., 2000).

Os estádios de desenvolvimento da propagação *in vitro* são compostos de etapas que compreendem a seleção do explante para a desinfestação e obtenção de tecidos livres de agentes contaminantes, a multiplicação e alongamento dos propágulos vegetativos, o enraizamento e a aclimatização na condição *ex vitro* das plantas obtidas *in vitro* (XAVIER et al., 2009).

O *Eucalyptus* é um gênero bastante pesquisado na cultura de tecidos e ainda são poucos os resultados efetivos com sua multiplicação contínua (DUTRA al., 2009).

As aplicações e objetivos da micropropagação *in vitro* de *Eucalyptus* são: i) produção em massa de genótipos selecionados superiores de espécies ou híbridos

que possuam altas taxas de crescimento, tolerância a baixas temperaturas e salinidade do solo e resistência a pragas e doenças; ii) resgate e conservação de germoplasma, inclusive de espécies raras ou com risco de extinção; iii) como veículo de pesquisa em genética molecular; iv) como método para o rejuvenescimento e aumento do potencial de enraizamento de clones por meio de sucessivos subcultivos *in vitro* e v) limpeza clonal, na obtenção de culturas livres de microrganismos patogênicos (WATT et al., 2003; ALFENAS, et al., 2009; DUTRA et al., 2009; XAVIER et al., 2009).

A cultura de tecidos para *Eucalyptus* é um método que pode ser utilizado para micropropagar rapidamente genótipos valiosos, preservar germoplasma *in vitro* e promover a juvenilidade de plantas. (ALFENAS, et al., 2009; REZENDE et al., 2014; TRUEMAN et al., 2018).

Entre os métodos de micropropagação do *Eucalyptus*, aquele que utiliza a técnica da proliferação de gemas axilares pré-formadas nos explantes é mais simples quando comparada a técnica de indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta ou a técnica da embriogênese somática. Este método possibilita altas taxas de fidelidade genética do material produzido e bom crescimento das plantas. A técnica compreende as fases de iniciação da cultura *in vitro*, multiplicação e alongamento, enraizamento e a aclimação *ex vitro* (XAVIER et al., 2009).

De maneira geral, os melhores explantes são aqueles obtidos a partir de plantas matrizes saudáveis, vigorosas, isentas de qualquer tipo de estresse e, em pleno crescimento vegetativo os explantes podem ser selecionados de várias partes da planta, mas em geral, segundo Pasqual et al. (2001), devem ser preferidos aqueles próximos às regiões apicais nas plantas.

Na prática, os explantes mais utilizados são os que possuem maior proporção de tecido meristemático ou que apresentam maior capacidade de expressar a totipotência celular (TORRES et al., 1998). Assim, a seleção dos explantes deve ser realizada a partir de brotações fisiologicamente ativas em estágio primário de crescimento (OLIVEIRA et al., 2013).

Torres et al. (1998), categorizam os processos da micropropagação nas seguintes etapas: coleta, desinfestação, isolamento e cultivo dos explantes em meio de cultura sob condições assépticas. A desinfestação superficial dos tecidos vegetais é uma atividade operacional crítica no laboratório para o início do cultivo *in vitro*. O

insucesso total desta operação resulta no apodrecimento dos explantes e na perda do trabalho, inviabilizando por completo a execução do projeto.

Segundo Oliveira et al. (2013) a desinfestação e o estabelecimento *in vitro*, são fases críticas para iniciação da cultura *in vitro* das plantas lenhosas, principalmente quando se utiliza matrizes selecionadas em campo, em que os propágulos vegetais apresentam altas taxas de contaminação biótica. Portanto, alguns aspectos importantes devem ser considerados, entre eles, a assepsia destes propágulos.

Existem vários métodos e produtos tecnológicos que são utilizados para a desinfestação de propágulos e, os mais utilizados, segundo Dutra et al. (2009), são o etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) a 70% (v/v) e o hipoclorito de sódio (NaClO) em diversas concentrações.

Há diferentes respostas de uma planta quanto à sensibilidade em função do tipo de propágulo vegetal e o tempo de exposição do mesmo ao hipoclorito de sódio (NaClO), que normalmente é utilizado em concentrações que variam de 0,25% a 2,5% (v/v) de cloro ativo em água (GEORGE, 1993).

A eficácia da técnica de desinfestação depende da correta aplicação do método estabelecido para cada tipo de propágulo e para cada tipo de planta, sendo que, uma desinfestação eficaz é aquela que resulta em propágulos livres de agentes bióticos na superfície, porém viáveis para o início do cultivo *in vitro*.

Algumas plantas, principalmente espécies de ocorrência em regiões de clima tropical, contém elevadas concentrações de compostos fenólicos, que oxidam as células quando estão feridas ou senescentes. Esta reação química pode ocorrer na cultura de tecidos e o explante oxidado escurece e não se desenvolve, tornando-se um problema grave na micropropagação (GEORGE, 2008).

Segundo Ribeiro et al. (2012) a oxidação de explantes pode ser ocasionada pela utilização de reguladores de crescimento no meio de cultura.

Para redução da oxidação, deve-se lavar os explantes em água corrente e lixiviar os compostos fenólicos previamente à desinfestação. Além disso, deve-se adicionar aos meios de cultura substâncias antioxidantes, como o ácido ascórbico, o polivinilpirrolidone (PVP) e o carvão ativado (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; GEORGE, 1996) e iniciar o cultivo na ausência de luz ou baixa intensidade luminosa (CARVALHO et al., 2012) por sete a quatorze dias (DUTRA et al., 2009).

Após o processo de desinfestação, o explante então é isolado e inoculado em meio de cultura, para o início da fase de estabelecimento. Durante esta fase, o meio

de cultura deve conter em sua composição, a presença de reguladores de crescimento e carboidratos, sais minerais e poliaminas, necessários ao desenvolvimento da planta (SOUZA e PEREIRA, 2007).

Para George (2008), a manutenção da micropropagação é promovida pela incorporação de reguladores de crescimento no meio de cultura. Na maioria das vezes, esse tratamento efetivamente remove a dominância dos meristemas apicais, de forma que os brotos axilares são utilizados para multiplicação de plantas.

Xavier et al. (2009) citam diversos meios de cultura que podem ser utilizados no cultivo de espécies lenhosas. Os meios de cultivo mais utilizados na micropropagação de plantas são os meios de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG 1962), o JADS (CORREIA et al. 1995), o WHITE (WHITE 1943), o B5 (GAMBORG et al. 1968), o QLP (QUOIRIN e LEPOIVRE 1977) e o WPM (LLOYD e MCCOWN 1980).

O meio de cultura MS e suas modificações têm apresentado bons resultados para micropropagação de *Eucalyptus* (OLIVEIRA et al., 2016) e segundo Dutra et al. (2009), além do MS, os meios de cultura mais utilizados para o cultivo *in vitro* desse gênero são o JADS e WPM. Estes autores recomendam para plantas lenhosas meios de cultura com baixas concentrações de nutrientes, como por exemplo o MS com metade ($\frac{1}{2}$ MS) da concentração de seus sais componentes.

O sucesso de um protocolo de micropropagação depende diretamente da fase de estabelecimento *in vitro*. As etapas seguintes de multiplicação e posterior transferência de plântulas para condições *ex vitro*, são possíveis se executadas após o estabelecimento de culturas assépticas e com bom vigor vegetativo (GEORGE e DEBERGH, 2008).

Para Borges et al. (2012), o sucesso da micropropagação e obtenção de plantas livres de contaminantes e aptas às condições *ex vitro*, se dá por meio do manejo adequado de matrizes e do estabelecimento *in vitro*, onde a oxidação fenólica e a contaminação por fungos e bactérias, são os principais fatores negativos para a cultura de tecidos.

Na etapa inicial, os resultados obtidos na micropropagação são diretamente influenciados pelo genótipo, estado fisiológico da planta matriz, seleção, coleta e tipo de explante, a assepsia utilizada, meio de cultura, entre outros, fatores limitantes para a propagação *in vitro*. Desta forma, é fundamental avaliar as respostas destes novos materiais ao cultivo *in vitro* e, posteriormente, realizar os ajustes necessários para

otimizar o processo de micropropagação (BORGES et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

Xavier et al. (2009) demonstram que ocorre variabilidade nas etapas da micropropagação entre diferentes clones da mesma espécie de *Eucalyptus* e, entre as espécies, pois não existe um protocolo único, e, portanto, é necessário ser ajustado um método para cada clone em questão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE COLETA

A área de plantio seminal de *Eucalyptus urophylla*, está localizada no Município de Plácido de Castro, Acre, na Fazenda Chalana, no Km 62 da Rodovia Federal BR 364 (Figura 1) e coordenadas geográficas de latitude 10°03'43,9"S e longitude 67°19'54,8"O. O talhão de *E. urophylla* compreende 1.415 m² e foi estabelecido em 12 de dezembro de 2012, em espaçamento de plantio de 3 x 3 metros, em uma densidade de 1.111 plantas x ha⁻¹.

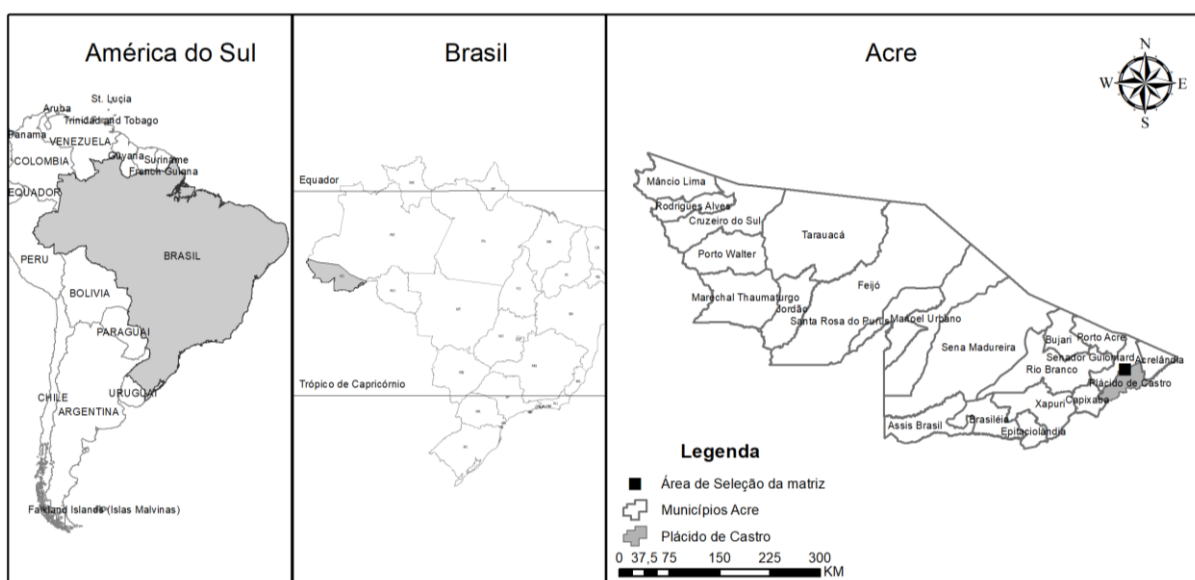


Figura 1 – Localização da área de plantio da matriz de *Eucalyptus urophylla*

As mudas utilizadas no plantio do talhão de *E. urophylla*, foram produzidas com sementes F2 da Área de Produção de Sementes (APS-F2), da Estação Experimental de Ciências Florestais de Anhembi - EECFA, localizada no Município de Anhembi, São Paulo, pertencente ao Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP. As árvores matrizes da EECFA foram plantadas de propágulos de *E. urophylla* coletados na ilha de Flores, Indonésia, de regiões com altitudes que variam de 600 a 1000 metros.

O clima da região da área de resgate da matriz de *E. urophylla*, segundo a classificação pelo método de Köppen-Geiger é do tipo Am - Clima tropical úmido ou subúmido. É uma transição entre o tipo climático Af e Aw e caracteriza-se por apresentar temperatura média do mês mais frio sempre superior a 18°C, apresentando

uma estação seca de pequena duração que é compensada pelos totais elevados de precipitação (GOLFARI et al., 1978b).

A temperatura média anual é de 24,5°C, aproximadamente uniforme para todo o estado do Acre (ACRE, 2010). Segundo os números do Banco de Dados Climáticos do Brasil (INMET), a Precipitação Média Anual da região do plantio é de 1.941 mm. Existe um período de seca curto (de junho a agosto), um mês de transição entre seca e chuvas (setembro), um período chuvoso mais prolongado (de outubro a abril), sendo de dezembro a março o período mais chuvoso e uma transição (mês de maio) na passagem da época de chuvas para a seca.

Os solos encontrados na região do plantio (Figura 2), são predominantemente Argissolos e Latossolos e em termos de classe dos níveis de subordem, Argissolos Amarelo Distrófico e Vermelho Amarelo Alumínico, assim como Latossolos Vermelho Amarelo Distrófico e Vermelho Distrófico (ACRE, 2010).

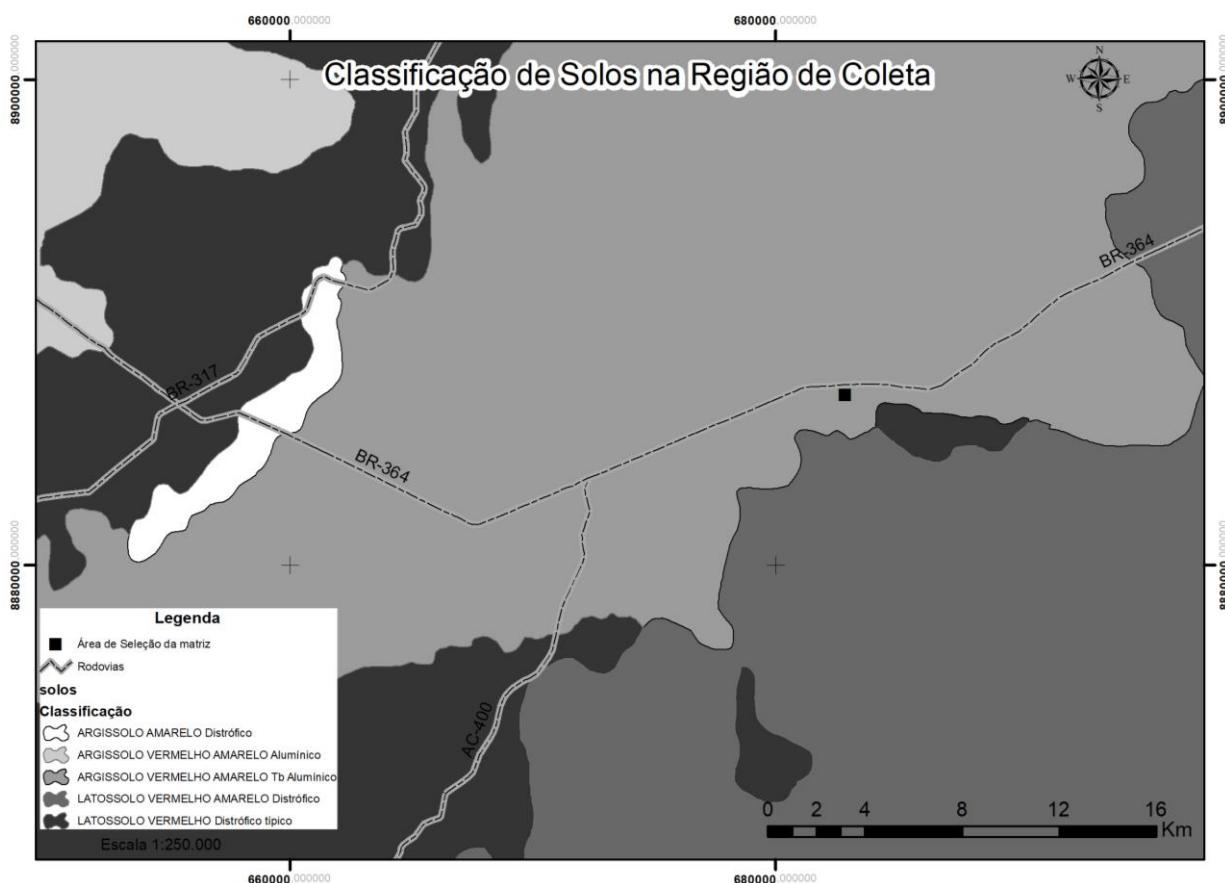


Figura 2 – Mapa de classificação dos solos encontrados na região, segundo Acre (2010), da área de plantio da matriz de *Eucalyptus urophylla*

A cobertura vegetal da região de entorno da área do plantio, apresenta-se bastante descaracterizada de sua condição original, pelas ações antrópicas, ocorridas ao longo do tempo.

Os remanescentes de vegetação nativa no entorno apresentam cobertura vegetal constituída de pequenos e esparsos fragmentos, em diversos estágios sucessionais e predominantemente em uma matriz de paisagem composta por áreas de pastagem com capim e maciços de vegetação classificada, segundo Acre (2010), como Floresta Ombrófila Aberta Terras Baixas com Bambu + Floresta Ombrófila Aberta Terras Baixas com Palmeiras.

3.2 SELEÇÃO E RESGATE DA MATRIZ DE *Eucalyptus urophylla*

3.2.1 Seleção da matriz, cálculo do volume total e incremento médio anual

Foi realizado o inventário florestal diagnóstico em uma única ocasião, para quantificar e identificar os maiores indivíduos plantados no talhão e com características de interesse para sua seleção, verificado os parâmetros e variáveis descritas por Shimizu et al. (1982).

Foram observadas, características fenotípicas superiores em relação ao diâmetro, a altura, o vigor, a forma do tronco, o padrão de ramificação, conicidade do fuste e arquitetura de copa.

Na realização das medições para o cálculo do volume total, foram aferidas de todos os indivíduos do talhão, a Circunferência com casca à Altura do Peito (CAP) à altura de 1,3 m das árvores com o auxílio de fita métrica e a Altura Total (Ht), mensurada com o auxílio de equipamento hipsômetro modelo Vertex IV®.

Posteriormente foi realizado o cálculo do Diâmetro com casca à Altura do Peito (DAP):

Em que,

$$DAP = \frac{CAP}{\pi}$$

Onde,

DAP = diâmetro a altura do peito (cm)

CAP = circunferência a altura do peito (cm)

π = constante matemática equivalente a 3,1416

A Área Basal (G) foi então calculada para a estimativa do Volume Individual das árvores:

Em que,

$$G = \frac{\pi \times DAP^2}{40.000}$$

Onde,

$G = \text{área basal (m}^2\text{)}$

$DAP = \text{diâmetro a altura do peito (cm)}$

O Volume Individual com casca, foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

Em que,

$$\text{Volume (cc)} = G \times Ht \times ff$$

Onde,

$\text{Volume (cc)} = \text{volume individual com casca (m}^3\text{)}$;

$G = \text{área basal (m}^2\text{)}$

$Ht = \text{altura total da árvore (m)}$

$ff = \text{fator de forma (0,5)}$

Com isso, o Volume Total foi estimado com o fator de forma comum (ff) de 0,50 (CIPRIANI, 2015a), multiplicado pela Área Basal (G) e Altura Total da árvore (Ht). O volume de madeira por hectare, foi estimado ponderado pela taxa de sobrevivência de 65% dos indivíduos verificada no talhão (721 indivíduos por ha), aos 57 meses (4,75 anos).

O Volume Total com casca por hectare, foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Volume (total)} = \bar{V}(cc) \times N$$

Onde,

$\text{Volume (total)} = \text{volume total com casca (m}^3\text{)}$;

$\bar{V}(cc) = \text{média aritmética da soma dos Volumes individuais com casca (cc)}$

$N = \text{número de árvores por hectares (721 indivíduos)}$

O cálculo do Incremento Médio Anual (IMA) de volume com casca dos indivíduos por hectare, foi realizado pela seguinte fórmula:

$$IMA_{(i)} = \frac{Volume\ (total)_{(i)}}{t_{(i)}}$$

Onde,

IMA = Incremento médio anual de volume ($m^3 \times ha^{-1} \times ano^{-1}$)

$Volume\ (total)$ = volume total com casca (m^3)

t = idade do plantio

i = 4,75 anos

Para a seleção de árvores dominantes de *E. urophylla*, foram identificados 14 indivíduos no talhão (1.415 m²) utilizando-se o conceito da altura dominante de Assmann (1970), que considera a média das alturas das 100 árvores de maior DAP por hectare e, por último, selecionado a árvore com as características de matriz.

3.2.2 Resgate da matriz e produção de mudas para o jardim clonal

Visando a obtenção de clones das matrizes selecionadas, as árvores foram injuriadas na base do tronco para a obtenção de brotações de *E. urophylla*.

O procedimento de resgate da árvore de *E. urophylla* selecionada em campo foi realizado por meio da técnica de anelamento parcial do caule (semi-anelamento), através da abertura de um painel horizontal até a metade do perímetro do tronco da árvore. Foi realizado uma incisão de cerca de 4-5 cm de largura sem danificar o lenho, a uma altura aproximada de 30 cm em relação ao solo (Figura 3).

Após 45 dias, foi verificada a ocorrência de brotações epicórmicas, abaixo da área da incisão e algumas destas foram coletadas com auxílio de tesoura de poda (Figura 3) e as estacas foram acondicionadas em sacolas com água, hermeticamente fechadas, para evitar a desidratação e posteriormente armazenadas em recipiente térmico para o transporte do material coletado até a área de viveiro.

As estacas foram beneficiadas, com 15-20 cm de comprimento e com um ou dois pares de folhas cada, seccionadas na metade da sua área e então repicadas para tubetes de polipropileno de volume de 115 cm³, preenchidos com substrato comercial a base de casca de *Pinus*, Subras Nativas/Florestal® (Subras®), fertilizado com 6 g x

L⁻¹ de fertilizante de liberação controlada (FLC) de 8 meses de duração, Osmocote Plus® (Scotts®), com proporção de 15-9-12 de N-P-K e 1,3% de magnésio (Mg), 6% de enxofre (S), 0,02% de boro (Bo), 0,05% de cobre (Cu), 0,46% de ferro (Fe), 0,06% de manganês (Mn), 0,02% de molibdênio (Mo) e 0,05% de zinco (Zn).

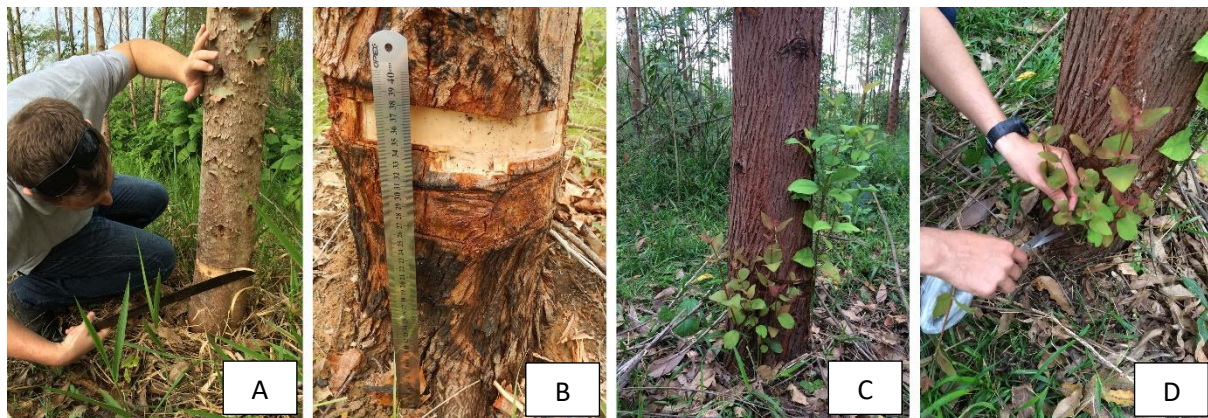


Figura 3 – Procedimento de anelamento parcial do caule de *Eucalyptus* (A); Altura do painel para a indução de brotações epicórmicas do clone de *Eucalyptus urophylla* (B); Brotações epicórmicas do clone de *Eucalyptus urophylla* (C); Coleta de brotações epicórmicas de *Eucalyptus urophylla* para a produção de estacas e mudas (D)

Na região da base de cada estaca, anteriormente a repicagem para os tubetes, foi aplicado o regulador de crescimento ácido indolbutírico (AIB) em talco, na concentração de 2.000 ppm, diluído em solução de hidróxido de sódio (0,1 N) para a indução do enraizamento.

Após o enraizamento, as mudas foram mantidas em casa de sombra a 50% de luminosidade durante três meses e, logo após, foram repicadas para vasos de 20 litros, alocados ao pleno sol, com o mesmo substrato utilizado nos tubetes, sob irrigação por micro aspersão durante oito minutos, quatro vezes ao dia e lâmina d'água de 5 mm por dia.

As mudas foram conduzidas durante 40 dias ao sol sob condição de cepas para a promoção de novas brotações laterais e obtenção de material juvenil, utilizado como fonte de explante para a micropropagação.

3.3 DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE EXPLANTES

Este estudo foi realizado na Biofábrica de Mudanças Micropropagadas, localizada no Viveiro da Floresta, unidades de produção de mudas de espécies florestais e frutíferas, da Secretaria de Estado de Meio Ambiente do Acre - SEMA.

A partir das cepas das plantas matrizes mantidas no viveiro, foram coletadas as brotações laterais e utilizado como fonte de explante, o segmento nodal, parte do ramo imediatamente anterior ao ápice caulinar das brotações, com uma ou duas gemas laterais cada um. Os explantes desinfestados foram reduzidos com o auxílio de bisturi para aproximadamente um centímetro de comprimento (Figura 4).

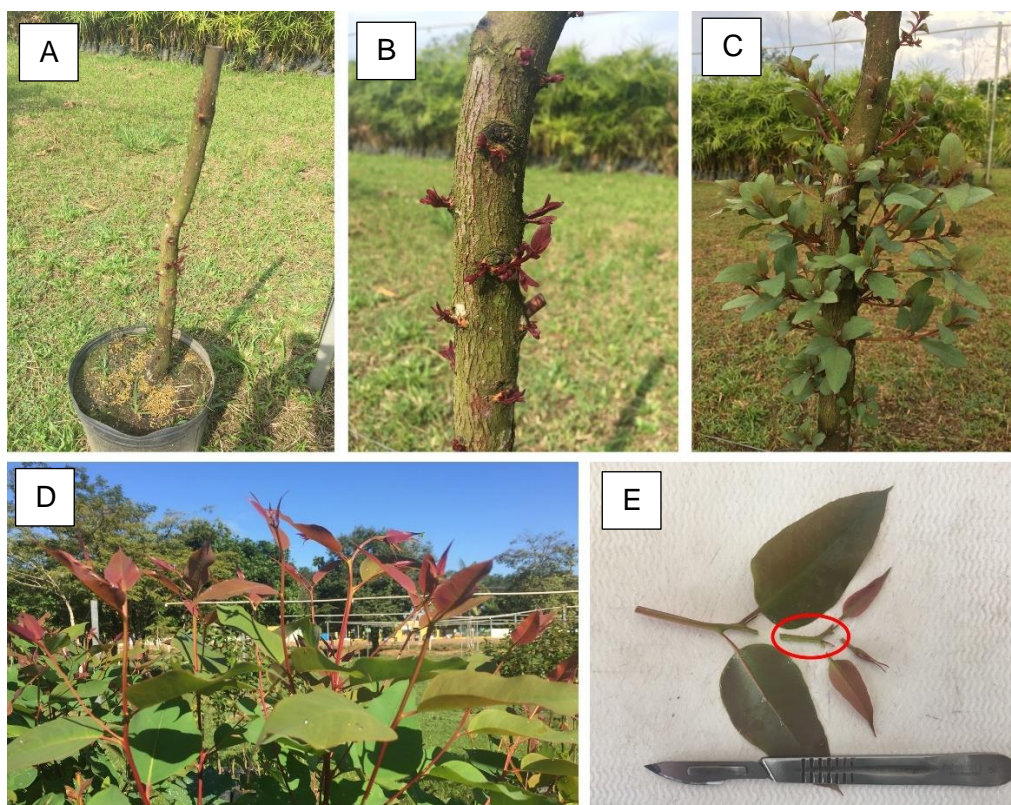


Figura 4 – Cepa do clone de *Eucalyptus urophylla* podada para a obtenção de brotações laterais (A); Brotações laterais de cepa do clone de *Eucalyptus urophylla* uma semana após o procedimento de poda (B); Brotações laterais de cepa do clone de *Eucalyptus urophylla* três semanas após o procedimento de poda (C); Brotações laterais de cepa do clone de *Eucalyptus urophylla* com padrão utilizado para obtenção de explantes para a micropropagação (D); Detalhe do segmento nodal extraído de brotações do clone de *Eucalyptus urophylla* para a micropropagação (E)

Inicialmente os explantes foram submetidos a lavagem com água destilada esterilizada em autoclave, sob temperatura de 118°C por 15 minutos e 1,3 atm de pressão, com três gotas de detergente neutro líquido, seguida de tríplex lavagem em água destilada esterilizada.

A manipulação do material vegetal foi realizada dentro de câmara de fluxo laminar horizontal, sob condições assépticas, para evitar que alguma contaminação

ocorresse durante o trabalho. Foram utilizados pinças, bisturis e placas de petri esterilizados em autoclave.

Metade dos explantes então foram imersos em solução aquosa de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) a 70% (v/v) durante 30 segundos. Como agente desinfestante foi utilizada solução de hipoclorito de sódio (NaClO) por 10 minutos e, por fim, os explantes foram lavados em água destilada esterilizada sob agitação por oito vezes.

Foram realizados tratamentos variando a concentração de cloro ativo em NaClO a 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%, os explantes então imersos sob constante agitação e posteriormente inoculados em meio de cultura.

Os meios de cultura utilizados foram MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) e $\frac{1}{2}$ MS, com a metade da concentração do MS. Todos os meios foram enriquecidos com $30 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ de sacarose, $800 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ de antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) e adicionados os fitorreguladores, $0,1 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ de benzilaminopurina (BAP) e $0,1 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ de ácido naftaleno acético (ANA).

Foi realizado o ajuste de pH dos meios de cultura para $5,8 \pm 2$ com hidróxido de potássio (KOH (1 N)) e ácido clorídrico (HCl (1 N)) e todos os meios foram solidificados com $6,5 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ de ágar e autoclavados a uma pressão de 1,3 atm e temperatura de 118°C por 15 minutos.

Para a inoculação dos explantes foram utilizados tubos de ensaio (132 x 25 mm) contendo 10 mL de meio de cultura cada, esterilizados em autoclave sob as mesmas condições descritas anteriormente. Em cada tubo de ensaio foi inoculado apenas um explante.

Por fim, os explantes foram acondicionados em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (Figura 5), mantendo-os inicialmente por sete dias na ausência de luz para evitar a oxidação. Após este período os tubos de ensaio foram expostos a iluminação fluorescente branca fria com irradiação de $20 \mu\text{molm}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ e 16 horas de fotoperíodo diárias por mais 28 dias (Figura 5).

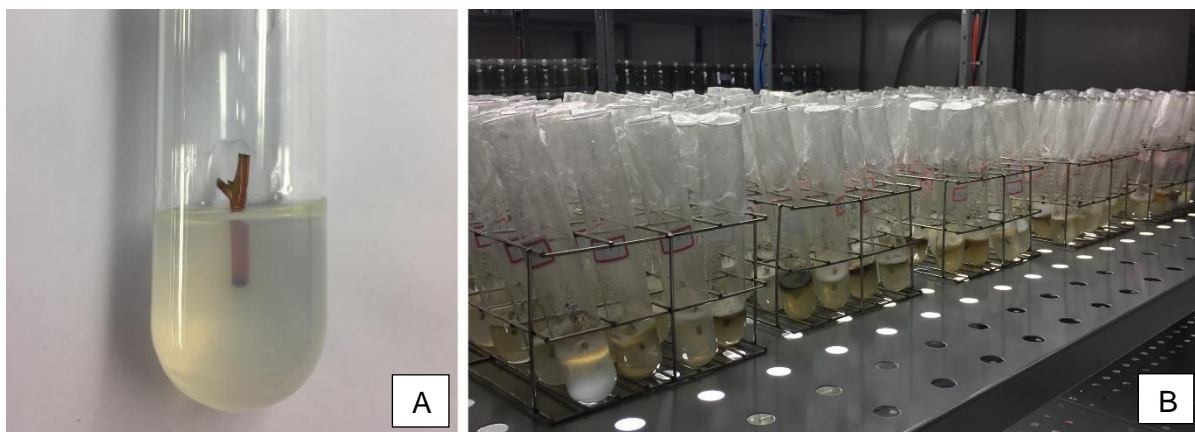


Figura 5 – Explante do clone de *Eucalyptus urophylla* inoculado individualizado em meio de cultura no tubo de ensaio (A); Disposição dos tratamentos com explantes do clone de *Eucalyptus urophylla* inoculados em diferentes meios de cultura utilizados nos tratamentos (B).

O experimento foi estruturado com 24 tratamentos e 10 repetições, em um universo amostral de 240 explantes. As avaliações foram realizadas por meio de inspeção visual da ocorrência de contaminações no meio de cultura e/ou no explante, além da oxidação de tecido vegetal do explante. Os explantes que apresentaram ocorrência de brotações foram considerados estabelecidos.

A primeira avaliação das variáveis de resposta, ocorrência de contaminação dos explantes por fungos; ocorrência de contaminação dos explantes por bactérias e ocorrência de oxidação dos explantes, foi realizada aos sete dias e, assim semanalmente até os 35 dias, após a inoculação dos explantes nos meios de cultura avaliados.

A avaliação da variável de resposta, estabelecimento de explantes, por meio da verificação de ocorrência de brotações, livres de contaminação por fungos e bactérias e não oxidados, foi realizada em uma única ocasião, aos 35 dias.

3.3.1 Estratégia para análise estatística do experimento

Para avaliar as variáveis de resposta do experimento, foi realizada Análise de Variância, de acordo à Teoria dos Modelos Lineares Generalizados, considerando um Delineamento Inteiramente ao Acaso, com o seguinte modelo estatístico:

$$y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \tau_k + \lambda_l + \delta_{ij} + \theta_{ik} + \varphi_{jk} + \omega_{jl} + \phi_{jl} + \varepsilon_{m(ijkl)}$$

Em que,

$$y_{ijkl} \rightarrow \eta_{ijkl} = \log\left(\frac{\pi_{ijkl}}{1 - \pi_{ijkl}}\right) = \eta + \alpha_i + \beta_j + \tau_k + \delta_{ij} + \theta_{ik} + \varphi_{jk} + \varepsilon_{l(ijk)}$$

Assim:

$i = \frac{1}{2}$ MS; WPM; MS; tipos de meios de cultura;

$j = 0,5; 1,0; 1,5; 2,0$; unidades de concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO);

$k = 0, 1$; níveis de etanol (CH₃CH₂OH);

$l = 1, 2, 3, \dots, 10$ tubos de ensaio por tratamento (repetição);

π_{ijkl} = probabilidade do explante no l -ésimo tubo de ensaio onde aplicou-se o i -ésimo meio de cultura combinado com a j -ésima concentração de NaClO e o k -ésimo nível de CH₃CH₂OH, possuir brotação e que este não esteja contaminado por fungos ou bactérias, ou esteja oxidado;

η = média geral da função logarítmica;

α_i = efeito fixo do i -ésimo tipo de meio de cultura;

β_j = efeito fixo da j -ésima concentração de NaClO;

τ_k = efeito fixo do k -ésimo nível de CH₃CH₂OH;

λ_l = efeito fixo do l -ésimo quantidade de dias de medição do experimento;

ω_{il} = efeito fixo da interação entre o i -ésimo tipo de meio de cultura e o l -ésimo quantidade de dias de medição do experimento;

ω_{jl} = efeito fixo da interação entre o j -ésimo nível de hipoclorito de sódio e o l -ésimo quantidade de dias de medição do experimento;

δ_{ij} = efeito fixo da interação entre o i -ésimo tipo de meio de cultura e a j -ésima concentração de NaClO;

θ_{ik} = efeito fixo da interação entre o i -ésimo tipo de meio de cultura e o k -ésimo nível de álcool;

φ_{jk} = efeito fixo da interação entre a j -ésima concentração de NaClO e o k -ésimo nível de álcool;

$\varepsilon_{l(ijk)}$ = efeito aleatório dos resíduos.

No caso do Modelo Linear Generalizado, os valores das variáveis de resposta (Ocorrência de contaminação por fungos; Ocorrência de contaminação por bactérias; Ocorrência de oxidação do explante e Ocorrência de brotações) foram avaliados pela função de ligação logarítmica e analisada considerando a Distribuição Binomial.

Para avaliar a Ocorrência de contaminação por fungos; Ocorrência de contaminação por bactérias; Ocorrência de oxidação do explante, foi utilizado um modelo misto, visto que cada unidade experimental (tubo de ensaio) foi avaliada repetidas vezes ao longo do tempo. Esta estratégia permitiu considerar dentro da análise estatística o efeito de medições correlacionadas entre si no mesmo tubo de ensaio. Para tal, utilizou-se a matriz de variância e covariância auto regressiva de primeira ordem (AR1), visto que a correlação da variável de resposta diminui com o aumento do tempo entre as medições.

Para toda a análise estatística, considerou-se efeito significativo aqueles que apresentaram valores de probabilidade menores ou iguais que 0,05. Todas as comparações de médias foram realizadas por meio do teste ajustado de Tukey-Kramer utilizando o procedimento GLIMMIX, no software SAS® (Instituto SAS®, Cary, Nova Iorque). Para melhor visualização dos resultados, os dados originais foram transformados em porcentagens.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CRESCIMENTO E PRODUÇÃO

Considerando a taxa de sobrevivência do talhão de 65% dos indivíduos e a densidade inicial de plantio de 1.111 árvores x ha⁻¹, calculou-se o estande de 721 árvores x ha⁻¹. Com este estande foi estimado o volume de 178 m³ x ha⁻¹ aos 57 meses de idade (sem colheitas parciais).

Considerando a densidade de plantio encontrada no talhão (721 árvores x ha⁻¹) pôde-se estimar o Incremento Médio Anual (IMA) aos 57 meses (4,75 anos) do plantio seminal em 39,9 m³ x ha⁻¹ x ano⁻¹.

A árvore matriz do clone de *E. urophylla*, apresentou um IMA de 0,16 m³ x ano⁻¹ aos 57 meses. A projeção do desenvolvimento deste indivíduo estimada, considerando a densidade encontrada no talhão (721 árvores x ha⁻¹), portanto,

resultaria em um IMA de $112 \text{ m}^3 \times \text{ha}^{-1} \times \text{ano}^{-1}$ aos 4,75 anos idade da floresta naquele sítio.

Na Tabela 01 estão representados os dados obtidos da medição das 14 árvores dominantes no talhão estudado, com características de matrizes, onde foi realizado o anelamento parcial do caule para a obtenção de brotações epicórmicas e para a seleção do indivíduo com as melhores características observadas. O indivíduo selecionado de *E. urophylla* apresentou o segundo maior diâmetro das árvores dominantes e a maior altura total do talhão, além do maior Incremento Médio Anual aos 57 meses.

Tabela 1 – Variáveis dendrométricas das árvores dominantes no plantio de *Eucalyptus urophylla*

Árvore	DAP (cm)	Altura Total (m)	IMA ($\text{m}^3 \times \text{árvore}^{-1} \times \text{ano}^{-1}$)
01*	26,7	26,3	0,16
02	27,1	24,2	0,15
03	26,4	26,1	0,15
04	25,3	21,8	0,12
05	23,6	25,0	0,11
06	23,3	22,1	0,10
07	22,8	23,8	0,10
08	22,3	23,8	0,10
09	22,3	23,8	0,10
10	22,3	24,2	0,10
11	22,2	22,0	0,09
12	21,6	24,2	0,09
13	21,3	23,6	0,09
14	21,3	22,9	0,09

(*) Árvore matriz selecionada para a clonagem

Para o cálculo do volume por indivíduo e IMA aos 4,75 anos, foi utilizado o fator de forma comum (ff) de 0,50, assim como verificado por Cipriani et al. (2015a, b) para *Eucalyptus* no sul de Rondônia, não foram encontradas informações sobre fator de forma e o autor observa que estes valores transitam entre 0,40 e 0,60. Estes valores

de ff normalmente são próximos de 0,50, ou seja, o volume real de madeira equivale a 50% do volume cilíndrico.

Pode haver correlação entre o crescimento do clone selecionado e demais árvores dominantes e a menor densidade de plantio verificada no talhão, ocasionada pela mortalidade precoce de alguns indivíduos. Como observado por Lisita et al. (1997) e Scheeren et al. (2004), um dos efeitos da morte de árvores no plantio é o estímulo do crescimento em diâmetro das árvores remanescentes pela menor densidade do povoamento, o que resulta em uma maior produtividade a partir de um número menor de árvores.

De acordo Simioni et al. (2017), segundo dados da Indústria Brasileira de Árvores (2015), a produtividade medida pelo Incremento Médio Anual (IMA) dos plantios clonais de *Eucalyptus* nas empresas associadas, foi de $39 \text{ m}^3 \times \text{ha}^{-1} \times \text{ano}^{-1}$ em 2014. Portanto, o IMA aferido no talhão seminal deste estudo é superior à média observada no Brasil demonstrando o potencial deste clone de *E. urophylla* para a região Sudeste do Acre, considerando ainda que os dados médios de produtividade foram calculados antes do ciclo de corte médio de 6-7 anos, normalmente empregado em muitas empresas e propriedades.

4.2 DESINFESTAÇÃO DE EXPLANTES

4.2.1 Ocorrência de contaminação por fungos

Os critérios de ajuste estatístico mostraram que o modelo Binomial apresentou ser satisfatório para descrever os dados de ocorrência de fungos no experimento, conforme Tabela 2. A dispersão residual (relação entre o Qui-quadrado e os graus de liberdade generalizado) mostrou valor abaixo de 1 (0,95) indicando que não há problemas de superdispersão dos valores.

A infestação por fungos nos explantes de *E. urophylla* não aumentou com o passar do tempo de medição do experimento conforme descrito na Tabela 2 (Tempo, $\text{Pr} > \text{F} = 0,2326$). Esse resultado indica que a contaminação severa nos explantes após 14 dias de instalado o experimento (31% das unidades amostrais contaminadas) influenciou a significância do efeito tempo avaliado no experimento.

Tabela 2 – Teste para os efeitos fixos avaliados no experimento para a ocorrência de fungos nos explantes de *Eucalyptus urophylla*

Efeito avaliado/ Bondade de ajuste	G.L. Numerador	G.L. Denominador	Valor de F	Pr > F
Tempo	4	36	1,47	0,2326
Tempo x Meio de cultura	8	72	0,17	0,9938
Tempo x NaClO	12	108	0,11	0,9999
Tempo x CH ₃ CH ₂ OH	4	36	0,03	0,9997
Meio de cultura	2	18	6,99	0,0057
NaClO	3	27	4,21	0,0144
CH ₃ CH ₂ OH	1	9	22,82	0,0010
NaClO x CH ₃ CH ₂ OH	3	27	4,48	0,0112
Log Pseudo-Verossimilhança			6519,96	
Qui-quadrado generalizado/GL			0,95	

Tempo= Período de avaliação (35 dias); NaClO = hipoclorito de sódio; CH₃CH₂OH = etanol;

Esse comportamento de infestação severa também foi relatado por Dutra et al. (2009), em que a contaminação na cultura de tecidos de *Eucalyptus*, pode ser perceptível já na primeira semana de cultivo.

O efeito de severidade da contaminação tornou todas as interações de efeitos combinado com o tempo de medição não significativo conforme observado na Tabela 2 para os meios de cultura, MS, ½ MS e WPM (Pr > F = 0,9938), concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO) (Pr > F = 0,9999) e para o fator etanol (CH₃CH₂OH) (Pr > F = 0,9979).

Quando avaliados os efeitos, de forma independente um do outro, o tipo de meio de cultura utilizado no experimento influenciou a contaminação dos explantes por fungos de forma significativa (Pr > F = 0,0057), bem como quando utilizado a desinfecção dos explantes com diferentes concentrações de NaClO (Pr > 0,0144) e CH₃CH₂OH (Pr > F = 0,0010), conforme pode ser observado na Tabela 02.

O efeito combinado da utilização do NaClO e CH₃CH₂OH, da mesma forma como descrito na Tabela 02, também influenciou significativamente a ocorrência de fungos nos explantes de *E. urophylla*.

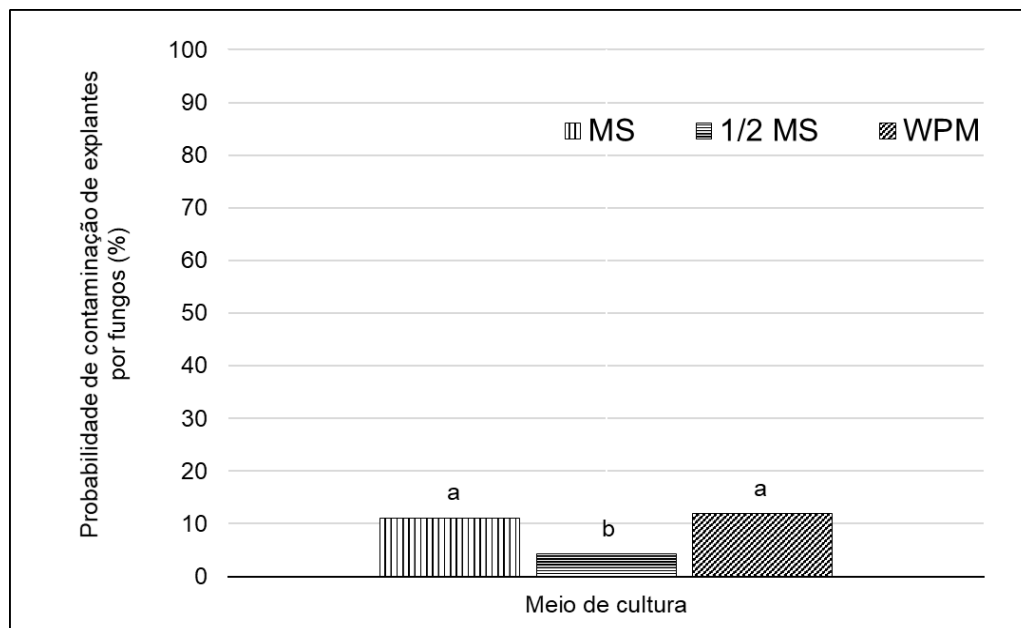


Figura 6 – Probabilidade de ocorrer contaminação de explantes do clone de *Eucalyptus urophylla* por fungos, quando avaliados em diferentes meios de cultura. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer

Os tratamentos com o meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS apresentaram os melhores resultados, com a menor probabilidade (4,3%) de contaminação dos explantes por fungos (Figura 6).

A avaliação da eficiência do controle da contaminação pela ocorrência de fungos nos explantes, com diferentes concentrações de NaClO, mostrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos com 1,5% e 2,0%. Os tratamentos com 1,5% não apresentaram diferença significativa comparados aqueles com 0,5% de cloro ativo (v/v) (Figura 7).

Além disso, pode ser observado por meio da análise da Figura 8, que a probabilidade da ocorrência de contaminação por fungos nos tratamentos onde se utilizou o etanol, foi baixa, indicando sua utilização ser um bom método para desinfestação dos explantes.

Pode-se observar, portanto, que a menor probabilidade da ocorrência de contaminação dos explantes por fungos, ocorreu nos tratamentos em que foram aplicadas as maiores concentrações de cloro ativo em hipoclorito de sódio (NaClO) e quando utilizado etanol (CH₃CH₂OH), como agentes desinfestantes.

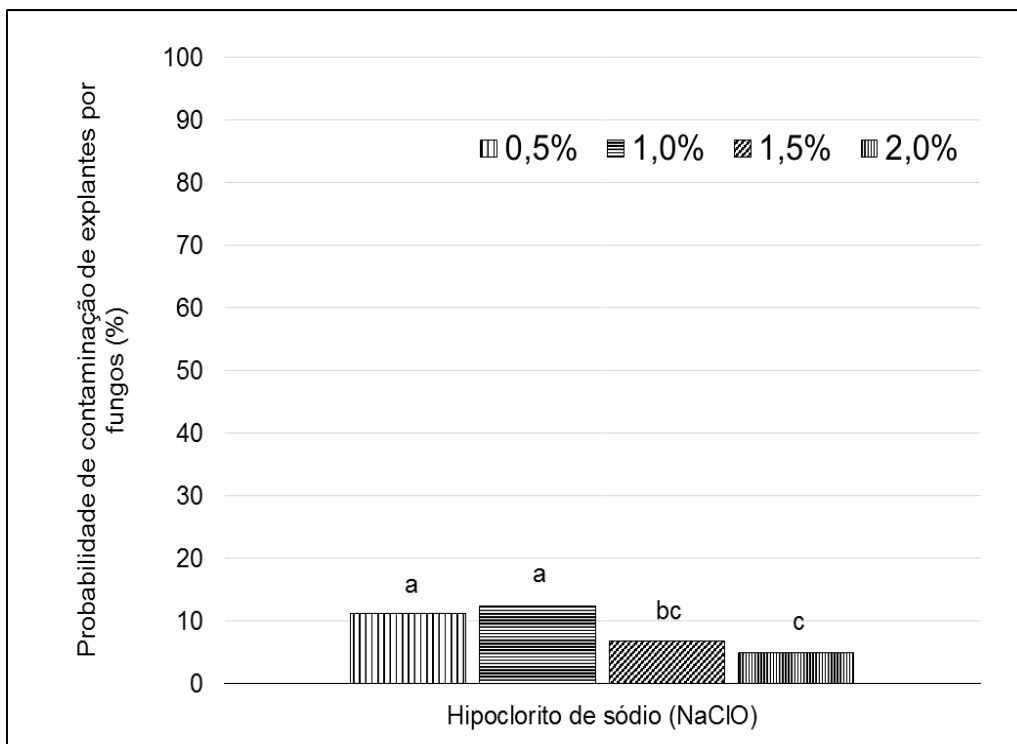


Figura 8 – Probabilidade de ocorrer contaminação de explantes do clone de *Eucalyptus urophylla* por fungos, quando avaliados em diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO) para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer

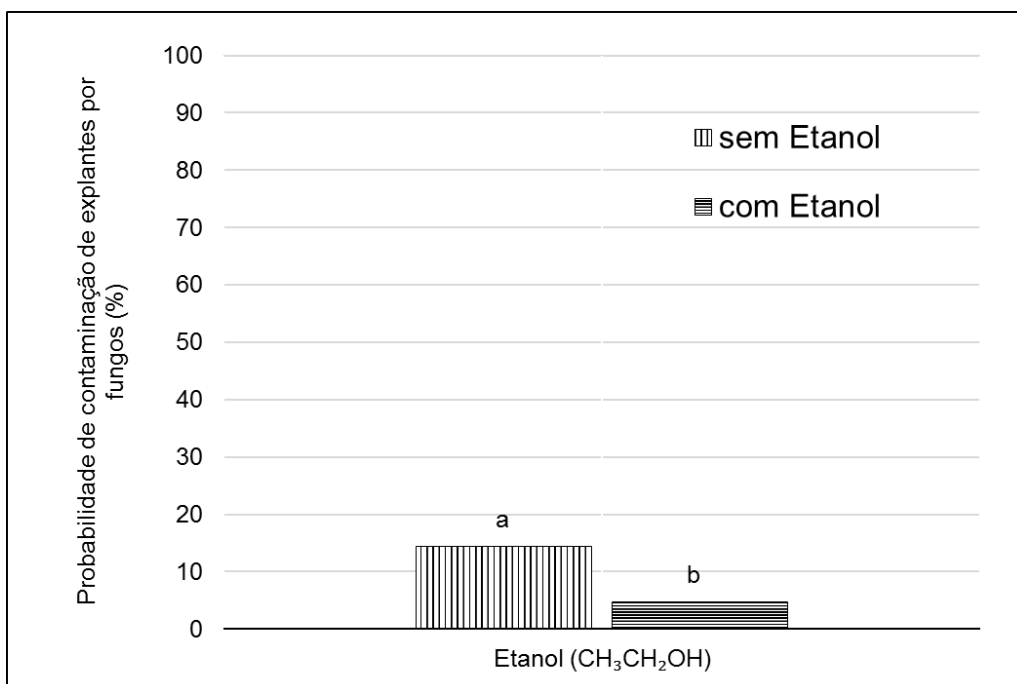


Figura 7 – Probabilidade de ocorrer contaminação de explantes do clone de *Eucalyptus urophylla* por fungos, quando avaliados com o fator etanol (CH₃CH₂OH) para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer

A análise estatística revelou que houve influência significativa quando se utilizou hipoclorito de sódio combinado com etanol, para a desinfestação dos explantes ($P > F = 0,0112$), conforme ilustrado na Figura 9.

Quando comparado a eficiência no controle de fungos entre os tratamentos com as quatro concentrações de NaClO, com o CH₃CH₂OH, foi observado que não houve diferença significativa entre eles e, portanto, não é possível a indicação de qual método integrado de desinfestação se mostrou superior aos demais.

A contaminação de fungos nos explantes observada em todos os tratamentos com utilização do fator etanol (CH₃CH₂OH), combinado com todas as concentrações de NaClO, foi, de forma geral, mais baixa quando comparada a todos os tratamentos em que não foi utilizado o etanol. Pode ser observado a menor probabilidade (3%) de contaminação, no tratamento com 0,5% de NaClO e com etanol (CH₃CH₂OH).

Ainda, observado a Figura 9, é possível constatar a baixa eficiência entre os tratamentos com diferentes concentrações de NaClO, sem o CH₃CH₂OH, no controle da contaminação por fungos. A contaminação, contudo, foi inferior nos tratamentos sem a utilização do álcool e com hipoclorito de sódio nas concentrações 1,5% e 2,0% de cloro ativo.

Brondani et al. (2009), avaliando a desinfestação de clones de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, verificou quanto ao tratamento asséptico que não existiu interação às diferentes concentrações de cloro ativo testadas e a utilização de etanol durante 15 segundos, no controle da contaminação por fungos, por se tratar de material proveniente diretamente do campo e recomenda a concentração de 0,5% de cloro ativo para a desinfestação de explantes do material híbrido proveniente de minijardim clonal cultivado em leito de areia.

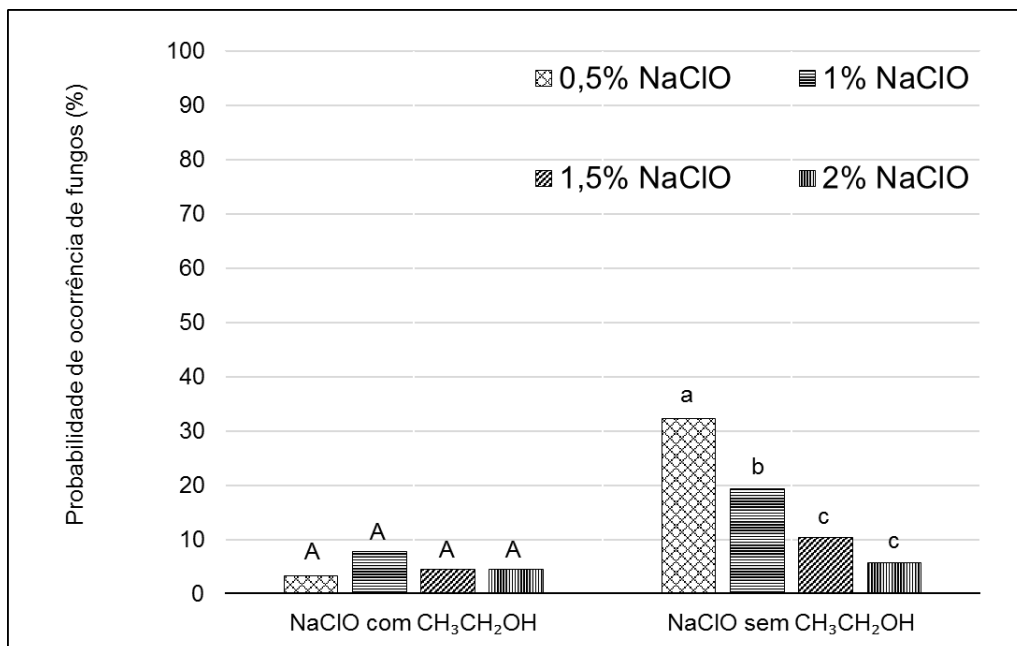


Figura 9 – Probabilidade de ocorrer contaminação por fungos nos explantes do clone de *Eucalyptus urophylla*, quando tratados com diferentes concentrações de NaClO, combinado com a utilização de etanol (CH₃CH₂OH), para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer

4.2.2 Ocorrência de contaminação por bactérias

A análise estatística para avaliação da ocorrência da contaminação dos explantes de *E. urophylla* por bactérias, durante o período de avaliação do experimento, revelou a significância do efeito tempo no experimento ($Pr > F = 0,0047$). Portanto, a infestação se intensificou no decorrer do período de avaliação.

Contudo, quando avaliada a contaminação por bactérias, combinado o tempo de medição com todas as interações de efeitos, meios de cultura, MS, $\frac{1}{2}$ MS e WPM, concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO) e para o fator etanol (CH₃CH₂OH), foi observado não haver efeito significativo, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 – Teste para os efeitos fixos avaliados no experimento para avaliação da ocorrência de bactérias nos explantes de *Eucalyptus urophylla*

Efeito avaliado/ Bondade de ajuste	G.L. Numerador	G.L. Denominador	Valor de F	Pr > F
Tempo	4	36	4,51	0,0047
Tempo x Meio de cultura	8	72	0,25	0,9791
Tempo x NaClO	12	108	0,35	0,9774
Tempo x CH ₃ CH ₂ OH	4	36	0,71	0,5923
Meio de cultura	2	18	7,82	0,0036
NaClO	3	27	10,95	< 0,0001
CH ₃ CH ₂ OH	1	9	87,10	< 0,0001
NaClO x CH ₃ CH ₂ OH	3	27	9,00	0,0003
Log Pseudo-Verossimilhança			5339,34	
Qui-quadrado generalizado/GL			0,96	

Tempo= Período de avaliação (35 dias); NaClO = hipoclorito de sódio; CH₃CH₂OH = etanol

Quando avaliado os efeitos de forma independente um do outro, pode ser observado por meio da Tabela 3, que o efeito do meio de cultura utilizado no experimento, influenciou a contaminação por bactérias de forma significativa (Pr > F = 0,0036), bem como quando utilizado a desinfecção dos explantes com diferentes concentrações de NaClO (Pr > 0,0001) e CH₃CH₂OH (Pr > F = 0,0001).

Os tratamentos com o meio de cultura WPM apresentaram os melhores resultados, com a menor probabilidade (29%) de contaminação dos explantes por bactérias (Figura 10).

A avaliação da eficiência no controle da contaminação de bactérias nos explantes, com diferentes concentrações de NaClO, mostrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos com 1,0% e 1,5%, entretanto foram os que apresentaram os melhores resultados para desinfestação (Figura 11).

Diferente do observado por Almeida et al. (2008), avaliando desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* Maiden visando estabelecimento *in vitro*, não encontrou diferenças significativas entre as concentrações utilizadas de NaClO na contaminação bacteriana.

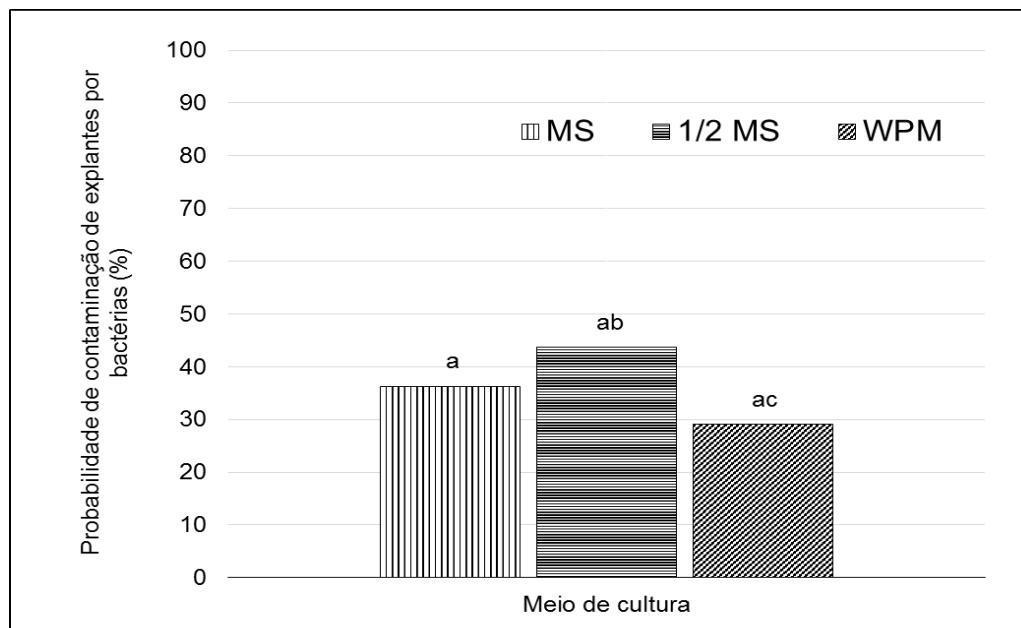


Figura 10 – Probabilidade de ocorrer contaminação de explantes do clone de *Eucalyptus urophylla* por bactérias, quando avaliados em diferentes meios de cultura. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer

A avaliação do fator álcool para o controle da contaminação, pode ser observada por meio da análise da Figura 12, onde a probabilidade da ocorrência de bactérias nos explantes nos tratamentos em que não foi utilizado o etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), foi baixa, diferentemente quando comparada com a avaliação realizada para fungos.

Ainda pode-se observar que a menor probabilidade da ocorrência de contaminação dos explantes por bactérias, ocorreu nos tratamentos em que foram aplicadas concentrações intermediárias de cloro ativo em NaClO (1,0% e 1,5%) v/v.

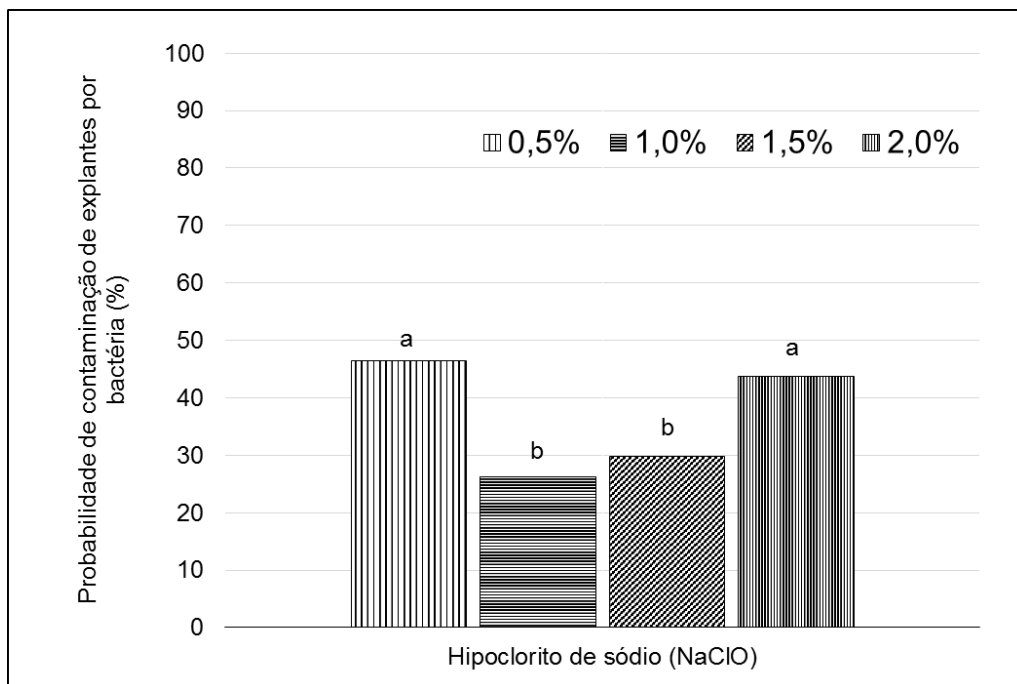


Figura 11 – Probabilidade de ocorrer contaminação de explantes do clone de *Eucalyptus urophylla* por bactérias, quando tratados com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer

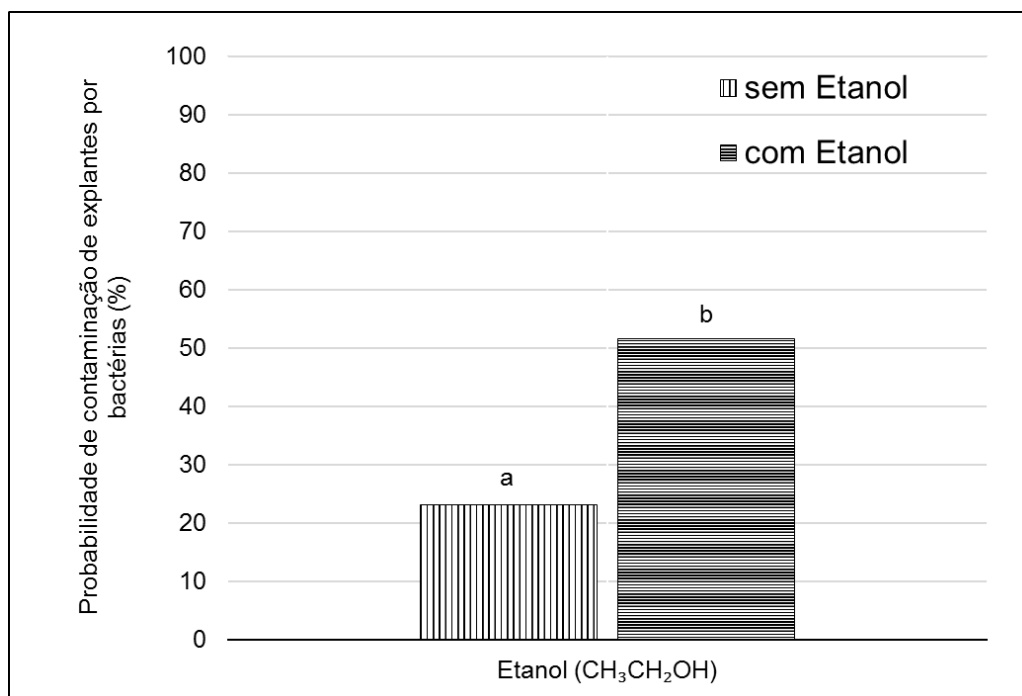


Figura 12 – Probabilidade de ocorrer contaminação de explantes do clone de *Eucalyptus urophylla* por bactérias, quando tratados com o fator etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer

A análise estatística revelou que houve influência significativa quando se utilizou hipoclorito de sódio combinado com etanol, para a desinfestação dos explantes ($P > F = 0,0003$), conforme ilustrado na Figura 13 e observado na Tabela 03.

Quando comparado a eficiência no controle de bactérias entre os tratamentos com as quatro concentrações de NaClO, sem o CH₃CH₂OH, foi observado que não houve diferença significativa entre eles e, portanto, não é possível a indicação de qual método de desinfestação se mostrou superior aos demais.

Ainda, conforme demonstrado na Figura 13, é possível constatar a baixa eficiência entre os tratamentos com diferentes concentrações de NaClO, com o CH₃CH₂OH, no controle da contaminação por bactérias. A contaminação, contudo, foi inferior nos tratamentos sem a utilização do CH₃CH₂OH e com NaClO nas concentrações 0,5%, 1,0% e 1,5% de cloro ativo.

A contaminação de bactérias nos explantes observada em todos os tratamentos sem a utilização do fator etanol (CH₃CH₂OH), combinado com todas as concentrações de hipoclorito de sódio, foi, de forma geral, mais baixa quando comparada a todos os tratamentos em que foi utilizado o álcool.

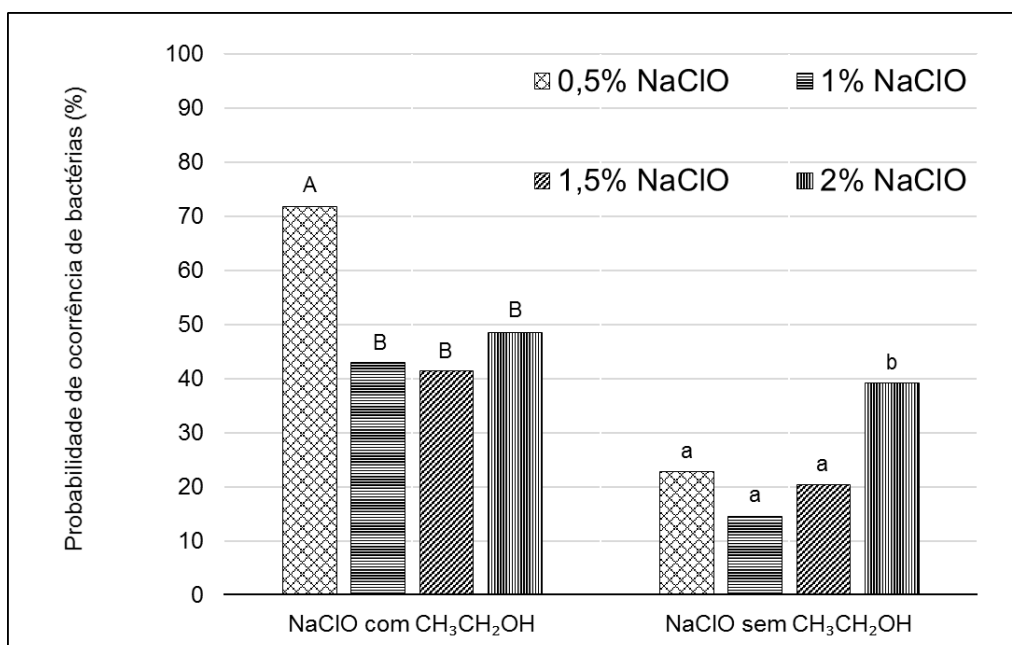


Figura 13 – Probabilidade de ocorrer contaminação por bactérias nos explantes do clone de *Eucalyptus urophylla*, quando tratados com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO), combinado com a utilização de etanol (CH₃CH₂OH), para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer

Foi observado que a menor probabilidade de ocorrência de contaminação por bactérias (23%) foi verificada em explantes que não receberam o tratamento com etanol e 29% de probabilidade de contaminação em explantes, quando inoculados em meio de cultura WPM.

Os métodos mais eficientes no controle da contaminação por bactérias com a menor probabilidade de ocorrência destes patógenos, foi observado quando não foi utilizado o $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ e por meio da utilização do NaClO nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5% de cloro ativo, como agente desinfestante dos explantes.

4.2.3 Ocorrência de oxidação dos explantes

A análise estatística para avaliação da ocorrência de oxidação nos explantes do clone de *E. urophylla* durante o período de avaliação, revelou a significância do efeito tempo no experimento ($\text{Pr} > \text{F} = 0,0001$). Portanto, a oxidação também se intensificou no decorrer do período de avaliação.

No entanto, quando avaliada a ocorrência da oxidação, combinado o tempo de medição com todas as interações de efeitos, meios de cultura, concentrações de hipoclorito de sódio e para o fator etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), foi observado não haver efeito significativo, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Teste para os efeitos fixos avaliados no experimento para avaliação da ocorrência de oxidação nos explantes de *Eucalyptus urophylla*

Efeito avaliado/ Bondade de ajuste	G.L. Numerador	G.L. Denominador	Valor de F	Pr > F
Tempo	4	36	9,20	< 0,0001
Tempo x Meio de cultura	8	72	0,09	0,9995
Tempo x NaClO	12	108	0,05	1,0000
Tempo x $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	4	36	0,04	0,9967
Meio de cultura	2	18	16,67	< 0,0001
NaClO	3	27	5,40	0,0048
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	1	9	15,90	0,0032
$\text{NaClO} \times \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	3	27	2,40	0,0901
Log Pseudo-Verossimilhança			5325,90	
Qui-quadrado generalizado/GL			1,00	

Tempo= Período de avaliação (35 dias); NaClO = hipoclorito de sódio; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ = etanol

Quando avaliado os efeitos de forma independente um do outro (Tabela 4), o tipo de meio de cultura utilizado no experimento influenciou a ocorrência de oxidação dos explantes de forma significativa, bem como quando utilizado a desinfecção dos explantes com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO) e o etanol (CH₃CH₂OH).

A menor probabilidade, 27%, de ocorrência de oxidação de explantes, foi encontrada nos tratamentos com o meio de cultura ½ MS (Figura 14), de 26% nos tratamentos com 0,5% de NaClO (Figura 15) e com a utilização de CH₃CH₂OH, de 30% (Figura 16).

A oxidação normalmente pode ser controlada em diferentes espécies lenhosas pela redução da concentração de sais e de reguladores de crescimento no meio de cultura (Bassan, 2006) e este fator pôde ser observado por meio dos resultados encontrados, com a menor probabilidade de ocorrer a oxidação nos explantes quando avaliados no meio de cultura ½ MS, com metade das concentrações de sais em relação ao MS.

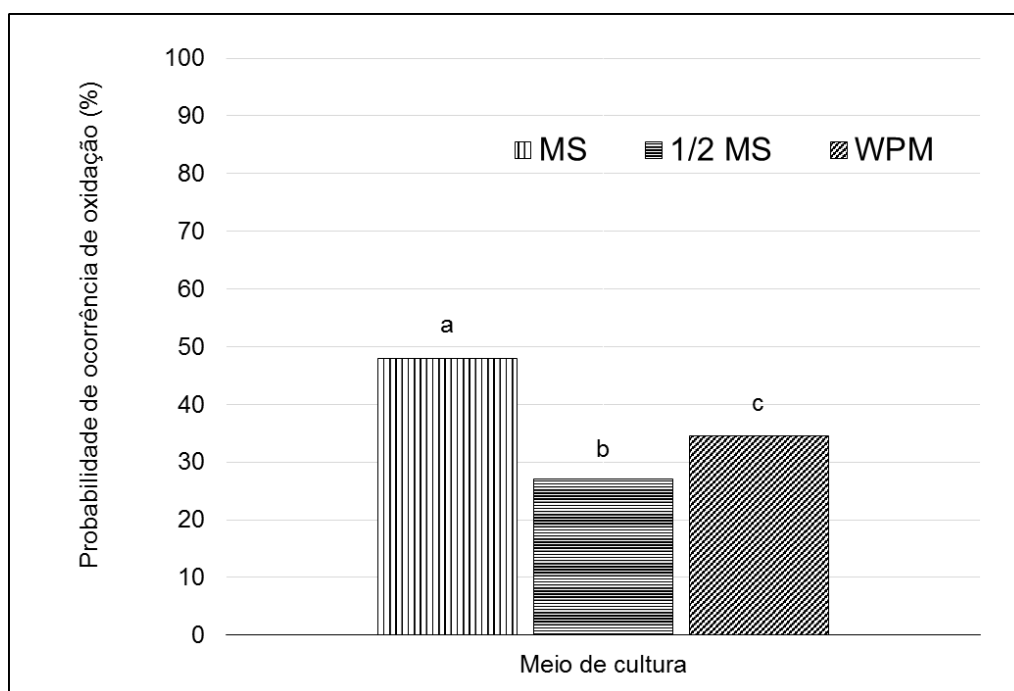


Figura 14 – Probabilidade de ocorrer oxidação de explantes do clone de *Eucalyptus urophylla*, quando tratados em diferentes meios de cultura. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer

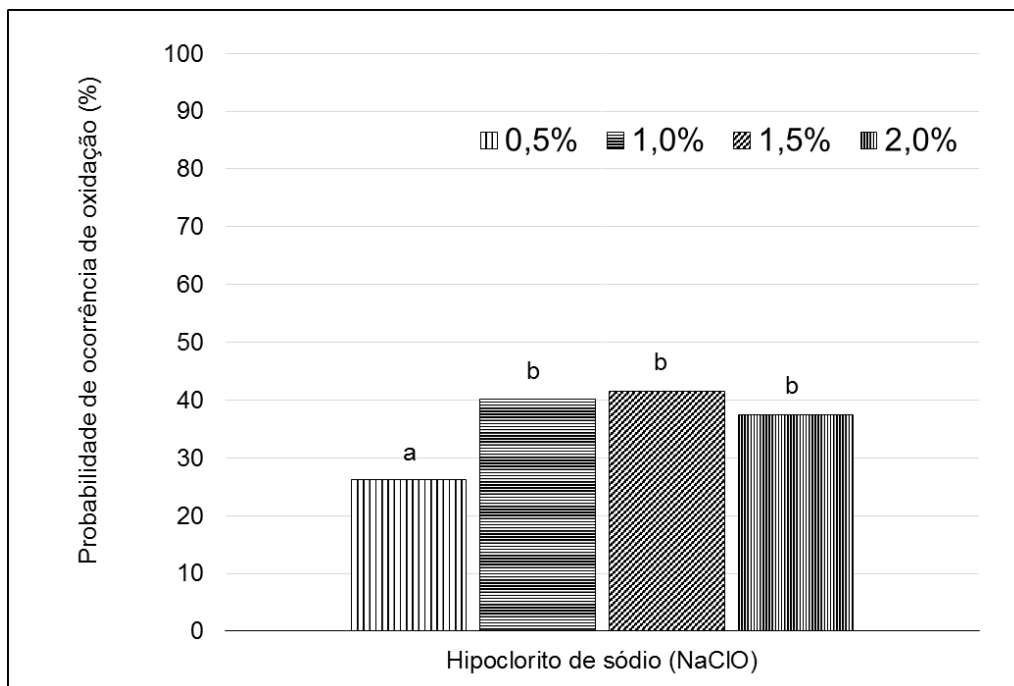


Figura 16 – Probabilidade de ocorrer oxidação nos explantes do clone de *Eucalyptus urophylla*, quando tratados com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer

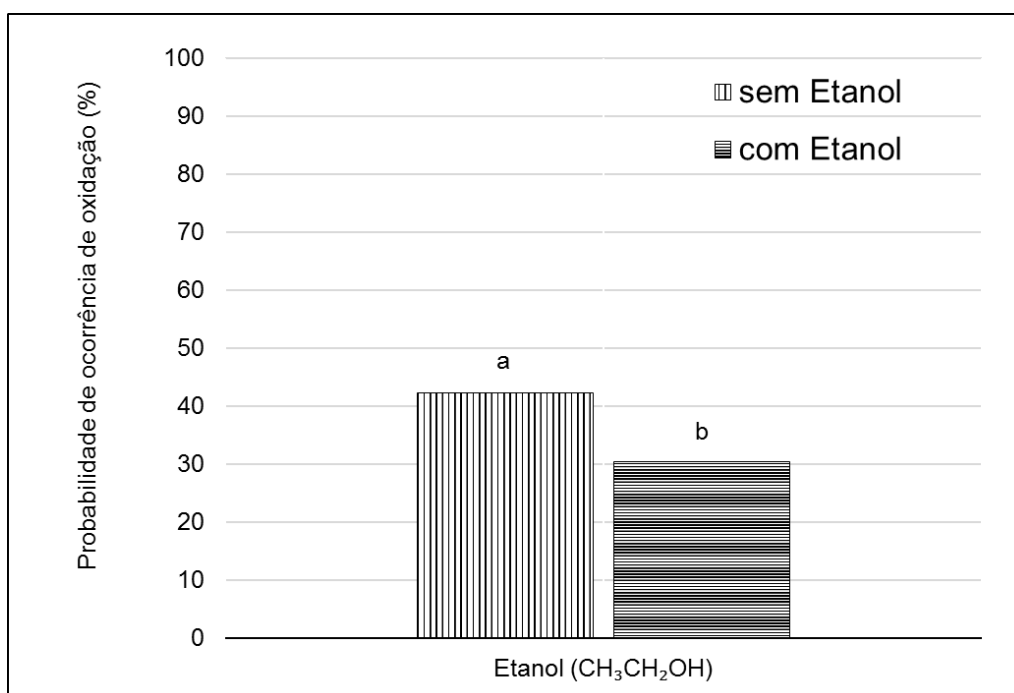


Figura 15 – Probabilidade de ocorrer oxidação de explantes do clone de *Eucalyptus urophylla*, quando tratados com o fator etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer

Foi observado que houve efeito significativo da interação entre os níveis do fator meio de cultura e níveis do fator etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) ($\text{Pr} > \text{F} = 0,0004$), na ocorrência de oxidação dos explantes, como demonstrado. Por isso, observando a Figura 17, pode-se constatar a menor probabilidade de oxidação (17%) ocorreu nos tratamentos com o meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS e com a utilização do etanol na desinfestação dos explantes, antes da desinfestação com hipoclorito de sódio.

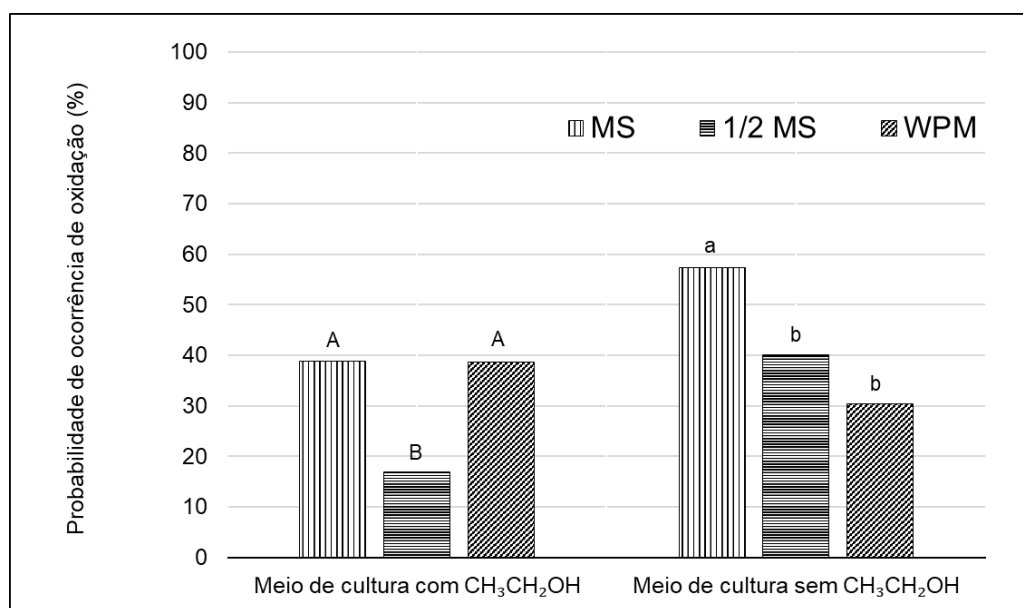


Figura 17 – Probabilidade de ocorrer oxidação nos explantes do clone de *Eucalyptus urophylla*, quando tratados com etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e cultivados em diferentes meios de cultura. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer

4.3 ESTABELECIMENTO DE EXPLANTES

A análise estatística revelou (Tabela 5) para o clone de *E. urophylla*, que quando avaliados os efeitos de forma independente um do outro, o tipo de meio de cultura utilizado no experimento e o fator etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), influenciaram o estabelecimento de explantes de forma significativa. Assim, o meio de cultura WPM foi o que apresentou a maior probabilidade de estabelecimento, em 29% do estande de explantes com brotações (Figura 18).

Quando avaliada a utilização do $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ previamente ao NaClO nos tratamentos de desinfestação (Figura 19), foi possível verificar a influência deste fator no estabelecimento do clone avaliado. A maior probabilidade de estabelecimento de

explantes (29%), foi nos tratamentos sem a utilização do etanol como agente desinfestante.

Foi observado que não houve influência significativa para o estabelecimento dos explantes, o efeito nos tratamentos com diferentes concentrações de NaClO na desinfestação ($Pr > F = 0,5369$).

Tabela 5 – Teste para os efeitos fixos avaliados no experimento para a avaliação da ocorrência de brotação para o estabelecimento dos explantes de *Eucalyptus urophylla*

Efeito avaliado/ Bondade de ajuste	G.L. Numerador	G.L. Denominador	Valor de F	Pr > F
Meio de cultura	2	227	3,32	0,0381
NaClO	3	227	0,73	0,5369
CH ₃ CH ₂ OH	1	227	11,70	0,0007
Log Pseudo-Verossimilhança			226,53	
Qui-quadrado generalizado/GL			1,09	

NaClO = hipoclorito de sódio; CH₃CH₂OH = etanol

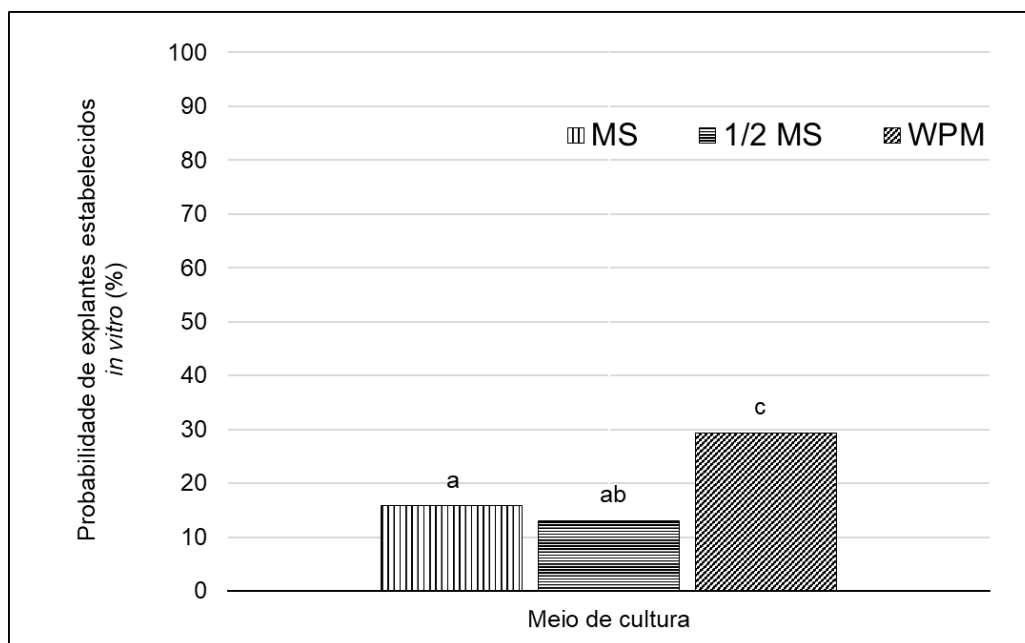


Figura 18 – Probabilidade de explantes saudáveis do clone de *Eucalyptus urophylla*, estabelecidos *in vitro* com diferentes meios de cultura. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer

Assim como observado por Oliveira et al. (2016), estudando o estabelecimento para geração de protocolo para organogênese indireta em explantes de um clone *E. grandis* x *E. urophylla*, verificou-se que a maior porcentagem de brotações foi obtida no meio de cultura WPM.

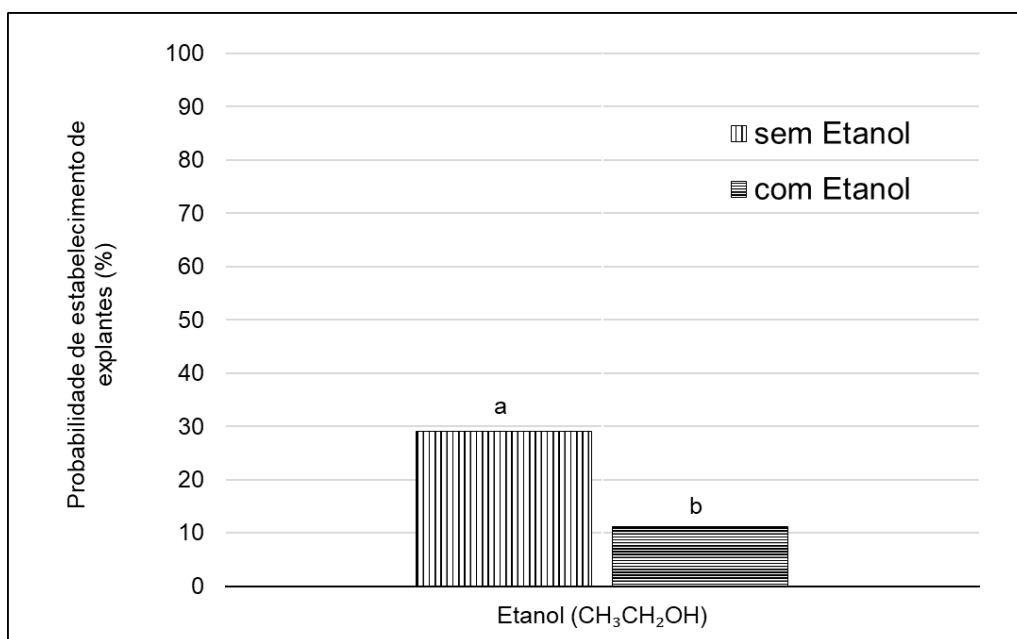


Figura 19 – Probabilidade de estabelecimento de explantes do clone de *Eucalyptus urophylla*, quando tratados com a utilização de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), para desinfestação. Percentuais com letras iguais não diferiram significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey-Kramer

A micropropagação é uma técnica que pode ser utilizada no resgate de árvores adultas. A introdução da cultura de *Eucalyptus in vitro* é uma etapa complexa na micropropagação de árvores a partir do campo, pelos altos níveis de contaminação por patógenos (ALFENAS et al., 2009) representando limitações ao estabelecimento das culturas em condições *in vitro* (XAVIER et al., 2013).

A micropropagação é uma estratégia importante considerando que milhares de espécies de plantas superiores necessitam ser mantidas em bancos de germoplasma, visando a preservação e à utilização de fontes de genes para futuros projetos (NETO et al., 2011).

A contaminação dos explantes por fungos e bactérias no cultivo *in vitro* do clone de *E. urophylla*, poderia vir ainda a ser menor, se realizado previamente a aplicação de defensivos agrícolas nas cepas cultivadas em ambiente de viveiro coberto e protegido da chuva.

Considerando o ciclo da micropropagação é necessário a continuidade dos estudos com o enraizamento e a multiplicação *in vitro* do clone de *E. urophylla*.

Para determinar a realização dos ganhos potenciais esperados na micropropagação do clone de *E. urophylla*, é necessária a realização de testes de campo replicado, das plantas produzidas *in vitro*.

A ausência de informações para o Estado do Acre, requer estudos para o ajuste de modelos de crescimento e produção para os plantios comerciais de *Eucalyptus*, com projeção de rendimentos;

Para o fomento de florestas plantadas de *Eucalyptus* no Estado do Acre, devem ser promovidos mais testes de espécies, procedências e progênies, conduzidos em vários locais, durante três a sete anos, expondo-os a condições edafoclimáticas distintas.

5 CONCLUSÕES

- A menor probabilidade de contaminação de explantes por fungos foi verificada nos tratamentos com meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS, tratados com hipoclorito de sódio na concentração de 2% de cloro ativo (v/v) e com a utilização de etanol;
- A menor probabilidade de contaminação de explantes por bactérias foi verificada nos tratamentos com meio de cultura MS e WPM, tratados com hipoclorito de sódio nas concentrações de 1,0% e 1,5% de cloro ativo (v/v) e sem a utilização de etanol;
- A menor probabilidade de oxidação de explantes foi verificada nos tratamentos com meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS, tratados com hipoclorito de sódio na concentração de 0,5% de cloro ativo (v/v) e com a utilização de etanol;
- A menor probabilidade de oxidação de explantes foi verificada nos tratamentos onde houve a interação do meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS com a utilização de etanol;
- A maior probabilidade de estabelecimento de explantes foi verificada nos tratamentos com meio de cultura WPM e nos tratamentos com a utilização de etanol;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. R. de.; MARTINS, C. R.; DUTRA, L. F. **Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunii* visando estabelecimento *in vitro***. Rev. Da FZVA, Uruguaiana, v. 15, n. 1, p. 54-60, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS (ABRAF). **Anuário estatístico da ABRAF 2013 ano base 2012**. Brasília: ABRAF, 2012. 146 p.
- ACRE. Governo do Estado do Acre. **Zoneamento Ecológico-Econômico do Estado do Acre**, Fase II (Escala 1:250.000): Documento Síntese. 2. Ed. Rio Branco: SEMA, 2010. 356p.
- ACRE. Lei nº 3.349, de 18 de dezembro de 2017. Institui o Programa de Regularização Ambiental...**Diário Oficial do estado do Acre**, Rio Branco, 19 de dezembro de 2017, p. 1-4.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. de. **Clonagem e doenças do eucalipto, 2ª edição**. Viçosa, MG, Ed. UFV, 2009, 500 p.
- ALMEIDA, F. D. de.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M. **Propagação vegetativa de árvores selecionadas de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. por estaquia**. Rev. Árvore, Viçosa, MG, v. 31, p. 445-453, 2007.
- ARAÚJO, H. J. G. de.; MAGALHÃES, W. L. E.; OLIVEIRA, L. C. de. **Durabilidade de madeira de eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson) tratada com CCA em ambiente amazônico**. Rev. Acta Amazônica, v. 42 (1), p. 49-58, 2012.
- ASSMANN, E. **The principles of forest yield study**. New York: Pergamon, 1970. 506 p.
- ASSIS, T. F.; TEIXEIRA, S. L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, p.261-296,1998.
- BACCARIN, F. J. B.; BRONDANI, G. E.; ALMEIDA, L. V. de.; VIEIRA, I. G.; OLIVEIRA, L. S. de.; ALMEIDA, M. de. **Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees**. New Forests, v. 46, p. 465-483, 2015.
- BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. **Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.)**. Rev. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.
- BENTES-GAMA, M. de M. **Orientações para pesquisa florestal em Rondônia**. Porto Velho, Embrapa Rondônia, Comunicado Técnico nº 290, 2005, 4 p.
- BINKLEY, D.; CAMPOE, O. C.; ALVARES, C. A.; CARNEIRO, R. L.; CEGATTA, I.; STAPE, J. L. **The interactions of climate, spacing and genetics on**

clonal Eucalyptus plantations across Brazil and Uruguay. Forest Ecology and Management, v. 405, p. 271-283, 2017.

BONGA, J. M. **Plant propagation in relation to juvenility, maturity, and rejuvenation.** In: BONGA, J.L.; DURZAN, D.J., ed. Tissue culture in forestry. Dordrecht: Nijhoff, p. 387-412, 1982.

BORGES, S. R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S. de.; LOPES, A. P.; OTONI, W. C.; TAKAHASHI, E. K.; MELO, L. A. **Estabelecimento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*.** Ciência Florestal, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 605-616, 2012.

BRASIL. Casa Civil. Lei nº 12.651, de 02 de março de 2006. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa...**Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 28 maio de 2012. Seção 1, p. 1-8.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. **Produção da extração vegetal e da silvicultura 2016.** Rio de Janeiro, v. 31, 2016, 54 p.

BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. **Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden.** Rev. Árvore, Viçosa-MG, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.

CARVALHO, A. C. P. P. de.; TORRES, A. C.; BRAGA, E. J. B.; LEMOS, E. E. P. de.; SOUZA, F. V. D.; PETERS, J. A.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T. R. **Glossário de cultura de tecidos de plantas.** Rev. Plant Cell Culture & Micropropagation, Lavras, v.7, n.1, p. 30-60, 2011.

CARVALHO, A. C. P. P. de.; RODRIGUES, A. A. de J.; SANTOS, E. de O. **Produção de mudas micropropagadas de bananeira.** Embrapa Agroindústria Tropical, Circular Técnica 37, Fortaleza, 2012.

CIPRIANI, H. N.; VIEIRA, A. H.; GODINHO, V. de P. C. Fatores de forma para eucaliptos em Vilhena, Rondônia. Embrapa Rondônia, Circular Técnica nº 143, Porto Velho, 2015a, 3 p.

CIPRIANI, H. N.; VIEIRA, A. H.; ROCHA, R. B.; COSTA, J. N. M.; MENDES, A. M.; ARAÚJO, L. V. de.; JUNIOR, J. R. V. **Cultivo de eucalipto para madeira em Rondônia.** Embrapa Rondônia, Sistemas de Produção nº 35, Porto Velho, 2015b, 84 p.

COLODETTE, J. L.; GOMES, C. M.; GOMES, F. J.; CABRAL, C. P. **The brasilian wood biomass supply and utilization focusing on eucalypt.** Chemical and Biological Technologies in Agriculture, p. 1-8, 2014.

CORREIA, D.; GONÇALVES A. N.; COUTO H. T. Z. do; RIBEIRO, M. C. **Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*.** IPEF 48/49, p. 107-116, 1995.

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

EUCALIPTO: Aspectos Botânicos. Disponível em: <<http://www.ciflorestas.com.br/texto.php?p=eucalipto>>. Acesso em: 07 fev. 2018.

EUCALYPTUS. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=eucalyptus>>. Acesso em: 07 fev. 2018.

FERREIRA, C. A.; SILVA, H. D. da. ***Eucalyptus* para Região Amazônica, estados de Rondônia e Acre**. Embrapa - Florestas, Comunicado Técnico 116, Colombo, 2004, 4 p.

FERREIRA, M. **Adaptação de *Eucalyptus* spp. e limitações na obtenção de sementes**. IPEF, Piracicaba, v. 3, n. 10, p. 1-32, 1982.

FERREIRA, M. **Melhoramento e silvicultura intensiva clonal**. IPEF, Piracicaba, n. 45, p. 22-30, 1992.

FOELKEL, C. E. B. **Eucalipto no Brasil, história de pioneirismo**. Rev. Visão Agrícola, ESALQ-USP, Piracicaba, n. 4, p. 66-69, 2005.

FONSECA, S. M. da.; RESENDE, M. D. V. de.; ALFENAS, A. C.; GUIMARÃES, L. M. da S.; ASSIS, T. F. de.; GRATTAPAGLIA, D. **Manual prático de melhoramento genético do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV, 2010. 200 p.

GAMBORG O., MILLER R., OJIMA K. **Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells**. Experimental Cell Research Vol. 50, p.148-151, 1968.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: The Technology**, Great Britain: Exegetics Limited, 1993, 574 p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: part.2 – In Practice**. 2 ed. Edington: Exegetics, 1996, 1361 p.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G.-J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3rd ed, The Background, Dordrecht: Springer, v. 1, p. 29-64, 2008.

GOLFARI, L. **Zoneamento ecológico para reflorestamento de regiões tropicais e subtropicais**. Série Divulgação PRODEPEF, Brasília, n.14, p.1-13, 1978a.

GOLFARI, L.; CASER, R. L.; MOURA, V. P. G. **Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil (2^a aproximação)**. Belo Horizonte: Centro de Pesquisa Florestal da Região do Cerrado, Série Técnica 11, 1978b. 66 p.

GONZALES, R.; TREASURE, T.; WRIGHT, J.; SALONI, D.; PHILLIPS, R.; ABT, R.; JAMEEL, H. **Exploring the potencial of *Eucalyptus* for energy production in the Southern Unites States: Financial analysis of delivered biomass. Part I**. Rev. Biomass and Bioenergy, n. 35, p. 755-766, 2011a.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/CNPH, p. 183-260, 1998.

GRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. **Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden.** Rev. Árvore, Viçosa-MG, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. de A.; GONÇALVES, A. N. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil.** IPEF, Circular Técnica, 192, Piracicaba, 2000.

Indústria Brasileira de Árvores, IBÁ. **Relatório IBÁ 2017.** Brasília, 2017, 77 p.

JAIM, S. M.; NAKHOODA M. **Clonal and Micropropagation.** Encyclopedia of Applied Plant Sciences, 2nd Edition, p. 428-432, 2017.

LLOYD, G.; McCOWN, B. **Commercially feasible micropropagations of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture.** Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society, v. 30, p. 421-426, 1980.

LISITA, A.; LEITE, H. G.; CAMPOS, J. C. C.; REGAZZI, A. J.; LELLIS, V. G. dos S. **Efeitos de reespaçamentos na produção, no diâmetro médio e na estrutura de povoamentos de *Eucalyptus camaldulensis*.** Revista Árvore, Viçosa, v. 21, n. 4, p. 473 - 482, 1997.

MARTIN, B.; COSSALTER, C. **Les *Eucalyptus* de iles de la Sonde.** Revue Bois et forêts des tropiques, Nogent- Sur-Marne, n. 165, p. 3-22, 1976.

MIRANDA, M. A. da S.; RIBEIRO, G. B. de D.; VALVERDE, S. R.; ISBAEX, C. ***Eucalyptus* sp. woodchip potential for industrial termal energy production.** Rev. Árvore, v. 41, n. 6, 2017.

MORI, E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; FERREIRA, M. **Variação genética e interação progênies x locais em *Eucalyptus urophylla*.** IPEF, Piracicaba, n. 39, p. 53-63, 1988.

MOURA, V. P. G. **O germoplasma de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake no Brasil.** Embrapa-CENARGEM, (1^a Edição), Brasília, Comunicado Técnico n° 111, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.** Physiologia Plantarum, Copenhagem, v. 15, p. 437-497, 1962.

NETO, S. P. da S.; ANDRADE, S. R. M de. **Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações.** In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Embrapa Cerrados, Planaltina, p. 411-434, 2011.

OLIVEIRA, C. de.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J.; BETTENCOURT, G. M. de.; AMANO, E.; FRANCISCON, L.; QUOIRIN, M. **Micropropagation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* AEC 224 clone.** Journal of Forestry Research, v. 28, p. 29-39, 2017.

OLIVEIRA, T. K. DE.; LUZ, S. A. de.; SANTOS, F. C. B. dos.; LESSA, L. S. **Crescimento de mogno e eucalipto como cercas vivas no Acre, Brasil.** In: V

Congresso Brasileiro de Agroecologia. Rev. Brasileira de Agroecologia, v. 2, p. 830-833, 2007.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 81 p.

QUEIROZ, A. M. de.; SILVA, Z. A. G. P. da G. **Aspectos econômicos dos plantios com eucalipto (*Eucalyptus* spp.) na região do Baixo Acre**. Rev. Floresta, Curitiba, PR, v. 46, n. 3, p. 287-296, 2016.

QUORIN M.; LEPOIVRE P. **Étude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus* sp.** Acta Horticulture, Vol. 78, p. 437-442, 1977.

SANTOS, P. E. T. dos.; MORI, E. S.; MORAES, M. L. T. de. **Potencial para programas de melhoramento, estimativas de parâmetros genéticos e interação progênies x locais em populações de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake**. IPEF, n. 43/44, p. 11-19, 1990.

SANTOS, R. S.; GONÇALVES, R. **Primeira ocorrência de *Costalimaita ferruginea* (Coleoptera: Chrysomelidae) em eucalipto no estado do Acre**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 30, Porto Alegre, Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014.

SCANAVACA JUNIOR, L.; GARCIA, J. N. **Determinação das propriedades físicas e mecânicas da madeira de *Eucalyptus urophylla***. Rev. Scientia Forestalis, v. 65, p. 120-129, 2004.

SANTOS, R. S.; GONÇALVES, R.; SILVA, N. dos A. **Primeiro registro do besouro-amarelo-do-eucalipto em plantio de eucalipto no estado do Acre**. Rev. Ceres, Viçosa, v. 63, n.4, p. 584-587, 2016.

SAS, Statistical Analysis Software. Version 9.1; **SAS Institute Inc.** Cary, NC, USA.

SCHEEREN, L. W.; SCHNEIDER, P. R.; FINGER, C. A. G. **Crescimento e produção de povoamentos monoclonais de *Eucalyptus saligna* Smith manejados com desbaste, na região sudeste do estado do Rio Grande do Sul**. Rev. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 14, n. 2, p. 111-122, 2004.

SIVIERO, A.; ROWEDER, C.; MACEDO, P. E. F. de.; GOMES, N. S. B.; FURTADO, E. L. **Manchas foliares em plantios de eucalipto no Acre, Amazônia**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 48, 2015; CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA PÓS COLHEITA, 2., 2015, São Pedro, SP, 2015.

SIVIERO, A.; ROWEDER, C.; MACEDO, P. E. F. de.; GOMES, N. S. B.; FURTADO, E. L. **Ocorrência da murcha bacteriana em eucalipto no Acre, Amazônia**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 48, 2015; CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA PÓS COLHEITA, 2., 2015, São Pedro, SP, 2015.

SHIMIZU, J. Y.; KAGEYAMA, P. Y., HIGA. **Procedimentos e recomendações para estudos de progênies de essências florestais**. EMBRAPA – URPFCS. Curitiba, Documentos n. 11, 1982, 32 p.

SILVEIRO, A.; ROWEDER, C.; MACEDO, P. E. F. de.; THOMPSON, R. M.; OLIVEIRA, L. C. de. **Mancha foliar e desfolha causada por *Cylindrocladium* spp. em genótipos de eucalipto no Acre, Amazônia.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 49, Maceió, AL, 2016.

SIMINONI, F. F.; MOREIRA, J. M. M. Á. P.; FACHINELLO, A. L.; BUSCHINELLI, C. C. de A.; MATSUURA, M. I. da S. F. **Evolução e concentração da produção de lenha e carvão vegetal da silvicultura no Brasil.** Ciência Florestal, Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 731-742, 2017.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. **Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*.** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

SOUZA, C. S. de.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, M. L. T. de.; SEBBENN, A. M. **Estimativa de parâmetros genéticos para caracteres quantitativos em progênes de polinização aberta de *Eucalyptus urophylla*.** Rev. Floresta, Curitiba, PR, v. 41, p. 847-856, 2011.

THORPE, T. A. **History of plant tissue culture.** Rev. Mol Biotechnol Biological Sciences, University of Calgary, Alberta, v. 37, p. 169-180, 2007.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA/CNPq, 1998. 864 p.

VIEIRA, A. H.; ROCHA, R. B.; BENTES-GAMA, M. de M.; ROSSI, L. M. B.; LOCATELLI, M. **Dendrometria e avaliação da performance de clones de eucalipto (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*) plantados na região central do estado de Rondônia.** EMBRAPA Rondônia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 47, 2007, 18 p.

XAVIER, A.; SILVA, R. L. da. **Evolução da silvicultura clonal de *Eucalyptus* no Brasil.** Rev. Agonomía Costarricense, v. 31(1), p. 93-98, 2010.

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

WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. C.; MOKOTEDI, M. E. O.; JAIN, S. M. **Micropropagation of *Eucalyptus*.** Micropropagation of Woody Trees and Fruits, p. 217-244, 2003.

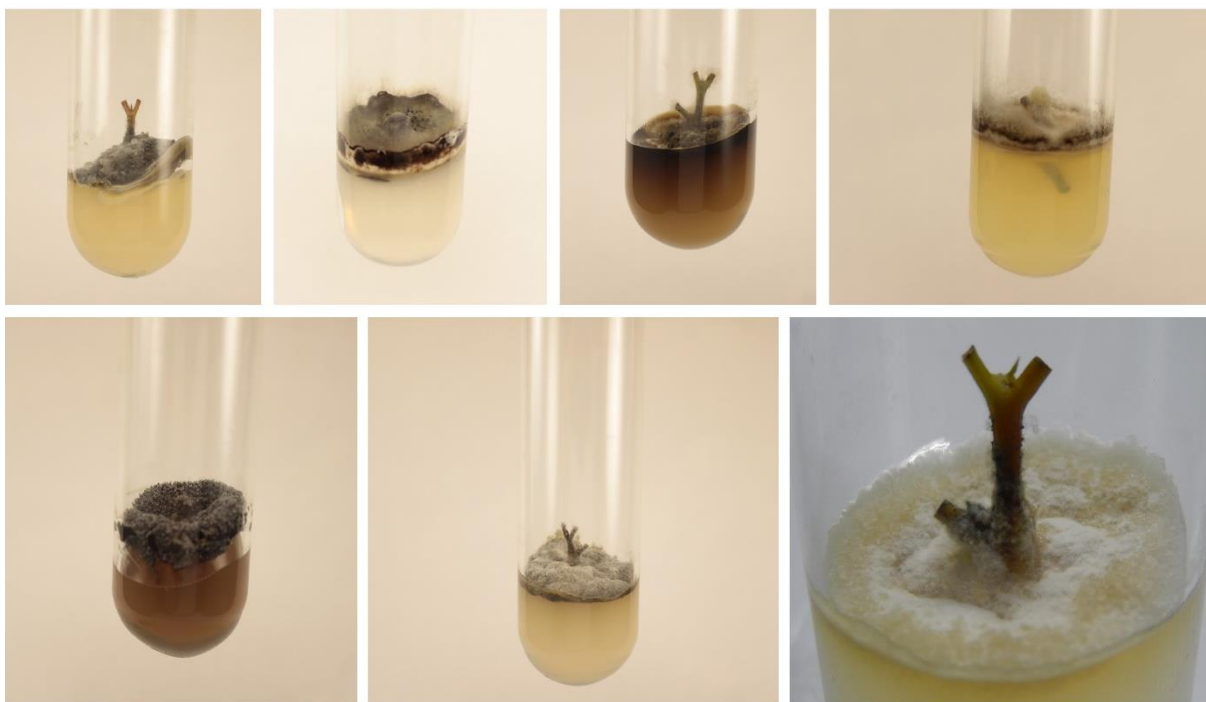
WENDLING, I.; TRUEMAN, S. J.; XAVIER, A. **Maturation and related aspects in clonal forestry – part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance.** Rev. New Forest, Dordrecht, v. 45, p. 473-486, 2014.

WHITE P.R. **Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots.** American Journal of Botany Vol. 30, p. 33-36, 1943.

APÊNDICES

APÊNDICE A - QUADRO DE DISTRIBUIÇÃO DOS TRATAMENTOS AVALIADOS

Tratamentos	Meios de Cultura	Concentrações de NaClO (v/v)	Etanol (CH ₃ CH ₂ OH)
T1	½ MS	0,5 %	Ausência
T2	½ MS	1,0 %	Ausência
T3	½ MS	1,5 %	Ausência
T4	½ MS	2,0 %	Ausência
T5	½ MS	0,5 %	Presença
T6	½ MS	1,0 %	Presença
T7	½ MS	1,5 %	Presença
T8	½ MS	2,0 %	Presença
T9	MS	0,5 %	Ausência
T10	MS	1,0 %	Ausência
T11	MS	1,5 %	Ausência
T12	MS	2,0 %	Ausência
T13	MS	0,5 %	Presença
T14	MS	1,0 %	Presença
T15	MS	1,5 %	Presença
T16	MS	2,0 %	Presença
T17	WPM	0,5 %	Ausência
T18	WPM	1,0 %	Ausência
T19	WPM	1,5 %	Ausência
T20	WPM	2,0 %	Ausência
T21	WPM	0,5 %	Presença
T22	WPM	1,0 %	Presença
T23	WPM	1,5 %	Presença
T24	WPM	2,0 %	Presença

APENDICE B – IMAGENS DA CONTAMINAÇÃO DOS EXPLANTES POR FUNGOS**APENDICE C – IMAGENS DA CONTAMINAÇÃO DOS EXPLANTES POR BACTÉRIAS**

APÊNDICE D – IMAGENS DO ESTABELECIMENTO DE EXPLANTES