

# DESINFESTAÇÃO E MEIO DE CULTURA PARA O ESTABELECIMENTO *In Vitro* DE SEGMENTOS NODAIS DE *Liquidambar styraciflua*

Gilvano Ebling Brondani<sup>1</sup>, Fabricio Augusto Hansel<sup>2</sup>, Leonardo Ferreira Dutra<sup>3</sup>, Ivar Wendling<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Eng. Florestal, M.Sc., Doutorando em Recursos Florestais, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil - gebrondani@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Químico, Dr., Embrapa Florestas, Colombo, PR, Brasil - hansel@cnpf.embrapa.br

<sup>3</sup>Eng. Agrônomo, Dr., Embrapa-CPACT, Pelotas, RS, Brasil - leo@cpact.embrapa.br

<sup>4</sup>Eng. Florestal, Dr., Embrapa Florestas, Colombo, PR, Brasil - ivar@cnpf.embrapa.br

Recebido para publicação: 31/10/2008 – Aceito para publicação: 20/02/2010

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi testar a desinfestação e meios de cultura para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Liquidambar styraciflua* L. Os explantes foram coletados de minicepas propagadas pelo processo de estaquia e manejadas em minijardim clonal sob sistema semi-hidropônico em leito de areia. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado no arranjo fatorial (3x2x2), sendo os fatores constituídos por três clones (L 26, L 35 e L 63), duas metodologias de desinfestação (A1 - hipoclorito de sódio (NaOCl) durante 10 minutos a 2,5% v/v de cloro ativo e A2 - explantes mergulhados durante 40 minutos em solução a base de *benomyl* à 1% p/v) e dois meios de cultura (WPM e MS), com quatro repetições. Os clones não diferiram em relação à assepsia e meio de cultura, obtendo-se média de 4% de explantes isentos de contaminação. Contudo, cerca de 80% dos explantes apresentaram contaminação bacteriana, indicando a necessidade do desenvolvimento de um protocolo de desinfestação mais eficiente. Embora tenham ocorrido poucas diferenças entre os meios de cultura testados, o meio de cultura MS apresentou superioridade em relação ao WPM para a maioria das características morfológicas estudadas.

**Palavras-chave:** Micropropagação; assepsia; contaminação bacteriana; hipoclorito de sódio; *benomyl*.

## Abstract

*Disinfestation and culture medium for the in vitro establishment of Liquidambar styraciflua nodal segments.* The objective of this research was to test the culture medium sterilization for the *in vitro* establishment of *Liquidambar styraciflua* L. nodal segments. Ministumps, from which the explants were collected, were propagated by cutting process and managed in clonal mini garden under semi-hydroponic system in a sand bed. The experiment was conducted in a completely randomized design under factorial arrangement (3x2x2); the factors were: three clones (L 26, L 35 and L 63), two sterilization methods (A1 - sodium hypochlorite (2.5% v/v of active chlorine) during 10 minutes; A2 - explants immersed during 40 minutes in a solution of *benomyl* 1% w/v) and two culture mediums (WPM and MS), with four replications. The clones did not differ in relation to the asepsis and culture medium. In average, 4% of the explants were free of contamination. However, almost 80% of the material presented bacterial contamination, what indicated the necessity of developing a more efficient sterilization protocol. Although only a little difference between the culture mediums had been observed, the MS medium showed superiority in relation to the WPM regarding the majority of the morphological characteristics studied.

**Keywords:** Micropropagation; asepsis; bacterial contamination; sodium hypochlorite; *benomyl*.

## INTRODUÇÃO

O liquidâmbar (*Liquidambar styraciflua* L.), pertencente à família Hamamelidaceae e conhecido no termo inglês como sweetgum (McCARTER; HUGHES, 1984), é uma espécie folhosa, monoica, autoestéril (SCHMITT; PERRY, 1964; WILCOX, 1967). É originária das Américas do Norte e Central, distribuindo-se desde a latitude 41° N até 13° N. No México e América Central, ocorre mais frequentemente em regiões

montanhosas, com altitudes compreendidas entre 900 m e 1.600 m, particularmente ao longo de rios. Nesse local, forma árvores que chegam a 45 m de altura e superiores a 1,0 m de DAP (diâmetro acima do peito), apresentando-se com caules retos, ramificação leve e copa fina (McCARTER; HUGHES, 1984). Sua reprodução se dá principalmente por rebrotos de raízes, podendo ocorrer também através de sementes (MUÑOZ, 1992) e por reprodução assexuada (WENDLING *et al.*, 2010).

Uma importante característica dessa espécie é a capacidade de se desenvolver em solos úmidos (SHIMIZU; SPIR, 2004). Além disso, apresenta rápido crescimento, cuja madeira, de elevada qualidade, pode ser empregada na indústria madeireira (GURGEL GARRIDO *et al.*, 1997; SHIMIZU; SPIR, 2002), na fabricação de móveis, chapas, gabinetes, revestimento de interiores, pisos, laminados, compensados, aglomerados, embalagens e barris (McCARTER; HUGHES, 1984). A espécie produz terebentina, que é utilizada para a fabricação de perfumes e adesivos e usada na indústria do tabaco e produtos farmacêuticos, existindo plantações com fins ornamentais e outras para fins produtivos (MUÑOZ, 1992; DAI *et al.*, 2004), perfazendo multiusos.

O liquidâmbar tem sido avaliado em alguns países, apresentando potencial madeireiro no Brasil, Zimbábue e África do Sul (McCARTER; HUGHES, 1984). Shimizu; Spir (1999) salientam que a espécie apresenta-se como alternativa potencial para o setor madeireiro, dada a sua capacidade de adaptação e crescimento no Brasil. Gurgel Garrido *et al.* (1997), trabalhando em Paraguaçu Paulista (SP), concluíram que a produção de madeira de *Liquidambar styraciflua* pode ser comparável à alcançada por algumas espécies dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*. Shimizu; Spir (2004), avaliando a produtividade de madeira de liquidâmbar em Quedas do Iguaçu (PR), concluíram que essa espécie constitui uma valiosa alternativa para reflorestamento no sudoeste do Paraná, com produtividade de madeira em torno de 40 m<sup>3</sup>.ha<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup>.

Diante do potencial de aplicação da espécie no setor florestal brasileiro, surge a necessidade de se desenvolverem protocolos de multiplicação de genótipos superiores selecionados, visando aprimorar o melhoramento genético da espécie para futuros programas de plantios florestais. Entre as técnicas biotecnológicas de multiplicação massal, a cultura de tecidos têm sido empregada em diferentes formas para a clonagem de cultivares superiores de plantas, sendo geralmente utilizada em algumas etapas do melhoramento, não necessariamente no desenvolvimento direto de novos cultivares (FERREIRA *et al.*, 1998). Entre as várias técnicas, a micropropagação é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e a de maior impacto no que se refere à multiplicação de espécies arbóreas madeireiras (HARTMANN *et al.*, 2002; NEHRA *et al.*, 2005; BUZZY *et al.*, 2007).

Contudo, a fase de estabelecimento de explantes *in vitro* é sempre uma etapa complexa na micropropagação de árvores, em razão dos altos níveis de contaminação dos tecidos, inclusive por bactérias endógenas, as quais são difíceis de ser eliminadas (NIEDZ; BAUSHER, 2002; WATT *et al.*, 2003). A desinfestação é realizada assepticamente em câmara de fluxo laminar (GEORGE, 1993; ALFENAS, 2004), e a dificuldade maior nessa etapa reside em se obter tecido descontaminado sem conduzi-lo à morte quando isolado (SOUZA; JUNGHANS, 2006; BRONDANI *et al.*, 2009).

Vários são os fatores que afetam a obtenção de plantas a partir da cultura *in vitro*, entre eles a oxidação fenólica, a contaminação de material proveniente do campo e a composição do meio de cultura (CARVALHO *et al.*, 1990). Muitas substâncias com ação germicida são utilizadas para a desinfestação dos explantes e, juntamente com o etanol, o cloro é o princípio ativo mais utilizado, em geral na forma de hipoclorito de sódio (NaOCl), sendo facilmente encontrado em formulações comerciais de água sanitária. As concentrações mais comuns variam de 0,5 a 2,0% de cloro ativo, e o tratamento geralmente dura até 40 minutos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Adicionalmente, para a eliminação de fungos, o princípio ativo *benomyl* pode ser utilizado em cultura *in vitro*, para evitar a contaminação do meio nutritivo e dos tecidos vegetais (FLORES *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 1999; SALGADO *et al.*, 2001; WATT *et al.*, 2003).

Além disso, o meio de cultura deve suprir tecidos e órgãos vegetativos com nutrientes essenciais ao crescimento, quando cultivados em condições *in vitro*. Basicamente, o meio de cultura não fornece apenas macro e micronutrientes, também pode ser fonte de carboidratos, geralmente representados pela sacarose. Adicionalmente, visando o maior crescimento, incluem-se compostos orgânicos, como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento. Porém as concentrações desses compostos irão depender das respostas dos diversos materiais genéticos e condições ambientais.

Entre os primeiros relatos na literatura para liquidâmbar, Sutter; Barker (1985) estabeleceram brotações apicais (1 a 1,5 cm de comprimento) de árvores de um ano de idade, mantidas em condições de casa de vegetação, ao exporem os explantes durante 15 minutos em 0,1% de NaOCl (0,1% de Tween 20), seguido de quatro lavagens com água destilada. Recentemente, estudos de embriogênese somática com a espécie pura e alguns de seus híbridos foram estabelecidos via origem seminal (MERKLE; BATTLE,

2000; VENDRAME *et al.*, 2001; DAI *et al.*, 2004), porém estudos de micropropagação visando o estabelecimento de segmentos nodais a partir do resgate de genótipos selecionados em campo são escassos.

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes metodologias de desinfestação e meios de cultura, para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de três clones de *Liquidambar styraciflua* L., provenientes de minijardim clonal manejado em sistema semi-hidropônico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Origem das brotações e manejo das minicepas

O experimento foi instalado no ano de 2005, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pertencente à Embrapa Florestas, Colombo, PR. O material utilizado para a obtenção dos explantes foi proveniente de minicepas propagadas pela técnica de estaquia convencional de árvores selecionadas, com 15 anos de idade, as quais foram identificadas como L 26, L 35 e L 63. Mudas produzidas por estaquia e com 120 dias de idade foram plantadas em sistema semi-hidropônico (100 minicepas.m<sup>-2</sup>), em canaletão com areia média, as quais, após uma semana, tiveram o ápice podado para indução de brotações para formar as minicepas. O corte foi efetuado 15 cm acima da brotação de cada estaca enraizada, tomando-se o cuidado de deixar, no mínimo, um par de folhas remanescentes por minicepa, para reduzir o estresse e facilitar a iniciação da brotação posterior, conforme metodologia descrita por Wendling (1999), constituindo dessa forma o minijardim clonal.

As minicepas receberam diariamente nutrientes por gotejamento a uma vazão de 5 L.m<sup>-2</sup>. A solução nutritiva foi composta por monoamônio fosfato (0,04 g.L<sup>-1</sup>), sulfato de magnésio (0,40 g.L<sup>-1</sup>), nitrato de potássio (0,44 g.L<sup>-1</sup>), sulfato de amônio (0,31 g.L<sup>-1</sup>), cloreto de cálcio (0,79 g.L<sup>-1</sup>), ácido bórico (2,88 mg.L<sup>-1</sup>), sulfato de manganês (3,70 mg.L<sup>-1</sup>), molibdato de sódio (0,18 mg.L<sup>-1</sup>), sulfato de zinco (0,74 mg.L<sup>-1</sup>) e hidroferro em pó (81,80 mg.L<sup>-1</sup>). A cada troca de solução (realizada a cada três semanas) ou quando a condutividade elétrica da solução drenada se tornava maior que 4,0 mS.cm<sup>-1</sup> a 25 °C, foi realizada irrigação com água para lavar o excesso de sais, usando-se aproximadamente 11 L.m<sup>-2</sup>. O pH das soluções iniciais foi ajustado para 5,6 ± 1, usando-se HCl e NaOH (1 M).

### Coleta e preparo dos explantes

Visando a desinfestação prévia dos explantes, as minicepas receberam pulverização por sete dias previamente à coleta das brotações, com fungicida Kumulus DF<sup>®</sup> a 3 g.L<sup>-1</sup> (p/v) (ALFENAS *et al.*, 2004). As brotações utilizadas foram provenientes da quinta coleta (150 dias após a poda do ápice da minicepa) de três clones identificados como L 26, L 35 e L 63, e acondicionadas em sacos de polietileno contendo solução a 1% (v/v) de ácido ascórbico, para minimizar o processo oxidativo e a perda da turgescência celular.

Em laboratório, as brotações foram lavadas com água deionizada, visando a remoção superficial de partículas e poeira dos tecidos. Os explantes foram constituídos de segmentos nodais com 2,0 cm de comprimento e um par de gemas axilares sem as folhas. Todo o equipamento utilizado foi desinfestado com álcool etílico a 70% (v/v).

### Desinfestação dos explantes

Em câmara de fluxo laminar, os explantes foram imersos em solução a 70% de álcool etílico (v/v) por 15 segundos e enxaguados por duas vezes com água deionizada e autoclavada. Após, os explantes foram submetidos aos tratamentos assépticos: A1 - mergulhados em NaOCl a 5% (v/v) (aproximadamente 2,5% de cloro ativo) por 10 minutos; e A2 - mergulhados durante 40 minutos em solução à base de *benomyl* a 1% (p/v) como princípio ativo. Finalmente, foram enxaguados por três vezes com água deionizada e autoclavada e inoculados verticalmente em tubos de ensaio contendo os meios de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) e MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

### Condições de cultivo

Os explantes foram cultivados em sala de incubação com temperatura do ar mantida a 25 °C (±2 °C), com umidade relativa do ar variando em torno de 50% e 60%, fotoperíodo de 16 horas e intensidade de radiação de 40 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, a partir de lâmpadas fluorescentes brancas frias. Os explantes permaneceram nessas condições por 30 dias.

### Preparo do meio de cultura de isolamento

Após o preparo dos meios de cultura com água deionizada, foram ajustados os valores do pH para 5,8 com HCl e NaOH (0,1 M), e então autoclavados à temperatura de 121 °C ( $\cong 1,0 \text{ kgf.cm}^{-2}$ ) durante 20 minutos. Os meios de cultura foram distribuídos em tubos de ensaio cônicos (15 cm x 2 cm) contendo 10 ml do meio de isolamento na ausência de reguladores de crescimento.

### Variáveis-resposta

Ao final do experimento, 30 dias após a inoculação, avaliaram-se a sobrevivência em relação à contaminação fúngica e bacteriana e à oxidação. Dos explantes que não apresentaram contaminação fúngica e oxidação, foram mensuradas a produção de massa fresca das brotações em balança de precisão (0,001 g), o comprimento médio de broto e o número de folhas emitidas. Consideraram-se como explantes sadios somente os segmentos nodais que não apresentaram fonte de contaminação e oxidação.

Dos explantes que não apresentaram oxidação e contaminação fúngica, foram mensuradas as características da massa fresca das brotações (MB), o comprimento médio de brotos (CMB), o número de folhas emitidas (NF) e o número de brotações (NB).

### Delineamento e análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado no arranjo trifatorial (3x2x2), sendo os fatores constituídos por três clones de *L. styraciflua* L., duas assepsias e dois meios de cultura, perfazendo um total de 12 tratamentos com quatro repetições e 10 explantes para compor as unidades experimentais de cada repetição.

Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de Lilliefors ( $p < 0,05$ ), a fim de verificar a condição de normalidade da distribuição dos dados, e, em seguida, procedeu-se a análise de variância ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ). As médias obtidas das variáveis que apresentaram significância foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Utilizou-se o pacote estatístico SOC (EMBRAPA, 1990) para a realização dos procedimentos estatísticos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados da análise de variância para as características mensuradas, pôde-se observar que não existiu interação entre clone, assepsia e meio de cultura para as variáveis-resposta referentes à porcentagem de contaminação fúngica ou bacteriana, porcentagem de oxidação e explantes sadios aos 30 dias após a inoculação (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado da análise de variância para a porcentagem de contaminação fúngica (F), bacteriana (B), oxidação (O) e explantes sadios (S) de *L. styraciflua* em função dos tratamentos testados.

Table 1. Result of variance analysis for the percentage of fungal (F) and bacterial (B) contamination, oxidation (O) and healthy explants (S) of *L. styraciflua* in function of tested treatments.

| Causas da variação     | GL | Quadrados médios     |                      |                      |                      |
|------------------------|----|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                        |    | F <sup>(1)</sup>     | B <sup>(1)</sup>     | O <sup>(1)</sup>     | S <sup>(1)</sup>     |
|                        |    | ----- (%) -----      |                      |                      |                      |
| Clone (Cl)             | 2  | 0,0572 <sup>ns</sup> | 0,0141 <sup>ns</sup> | 0,0327 <sup>ns</sup> | 0,0391 <sup>ns</sup> |
| Assepsia (As)          | 1  | 0,2450 <sup>ns</sup> | 0,0793 <sup>ns</sup> | 0,0403 <sup>ns</sup> | 0,0223 <sup>ns</sup> |
| Meio (Me)              | 1  | 0,0087 <sup>ns</sup> | 0,0042 <sup>ns</sup> | 0,0403 <sup>ns</sup> | 0,0223 <sup>ns</sup> |
| Cl * As                | 2  | 0,1421 <sup>ns</sup> | 0,0831 <sup>ns</sup> | 0,0173 <sup>ns</sup> | 0,0391 <sup>ns</sup> |
| Cl * Me                | 2  | 0,0096 <sup>ns</sup> | 0,0058 <sup>ns</sup> | 0,0403 <sup>ns</sup> | 0,0056 <sup>ns</sup> |
| As * Me                | 1  | 0,0589 <sup>ns</sup> | 0,0042 <sup>ns</sup> | 0,0026 <sup>ns</sup> | 0,0223 <sup>ns</sup> |
| Cl * As * Me           | 2  | 0,0479 <sup>ns</sup> | 0,0331 <sup>ns</sup> | 0,0026 <sup>ns</sup> | 0,0726 <sup>ns</sup> |
| Resíduo                | 36 | 0,1307               | 0,0338               | 0,0327               | 0,0484               |
| Média                  | —  | 14,00                | 80,00                | 2,00                 | 4,00                 |
| CV <sub>exp.</sub> (%) | —  | 34,58                | 8,70                 | 23,85                | 26,99                |

<sup>ns</sup> valor de F não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro. <sup>(1)</sup> dados transformados por  $(n+0,5)^{0,5}$  pelo teste de Lilliefors ao nível de 5% de probabilidade de erro; n: dado amostrado; GL: graus de liberdade; CV<sub>exp.</sub>: coeficiente de variação experimental.

Uma possível explicação para o efeito não significativo entre os clones L 26, L 35 e L 63 pode ser inferida quanto à homogeneidade entre os materiais clonais, visto que as plantas-matrizes (minicepas) foram manejadas nas mesmas condições de minijardim clonal, as quais, segundo diversos autores (HIGASHI *et al.*, 2000; WENDLING; XAVIER, 2003; ALFENAS *et al.*, 2004; MAFIA *et al.*, 2005; BRONDANI *et al.*, 2009) estão relacionadas ao maior controle ambiental, fitopatológico, hídrico e nutricional das minicepas, bem como à maior uniformidade das miniestacas produzidas e à menor variação sazonal.

Provavelmente, essas condições de manejo intensivo atribuíram respostas semelhantes aos clones, não sendo detectada diferença significativa pela análise de variância, em relação tanto à fonte contaminante quanto aos explantes estabelecidos. Esse resultado assemelha-se ao relatado por Rocha *et al.* (2007), que, durante o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de porta-enxerto de pessegueiro cv. Tsukuba, não verificaram efeito significativo do meio de cultura em relação à fonte contaminante e aos explantes estabelecidos. Em outro estudo, Brondani *et al.* (2009) também não verificaram diferença significativa entre clone e assepsia para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais provenientes de minicepas de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunnii* manejadas em condições de minijardim clonal, sendo recomendada a concentração de 0,5% de cloro ativo para a desinfestação dos explantes.

Em termos gerais, obteve-se média de 4% de explantes estabelecidos, independentemente do clone, assepsia e meio de cultura (Tabela 1). A contaminação fúngica e a taxa de explantes oxidados foram reduzidas, com valores médios de 14% e 2%, respectivamente, o que denota eficiência e viabilidade das assepsias testadas (A1 e A2) para o controle dessas fontes contaminantes, ao se introduzirem *in vitro* segmentos nodais de *L. styraciflua* provenientes de minijardim clonal manejado em sistema semi-hidropônico. Contudo, independentemente do tratamento aplicado, os clones apresentaram elevada porcentagem de contaminação bacteriana, com média geral de 80%, sendo essa a principal fonte de contaminação. Esse fato indica a necessidade de maior prudência no controle asséptico utilizado ao se trabalhar com essa fonte de material (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios para a porcentagem de contaminação fúngica (F), bacteriana (B), oxidação (O) e explantes sadios (S) de *L. styraciflua* em função dos tratamentos testados.

Table 2. Mean values to the percentage of fungical (F) and bacterial (B) contamination, oxidation (O) and healthy explants (S) of *L. styraciflua* in function of tested treatments.

| Clone | Assepsia | Meio de cultura | F <sup>(1)</sup> | B <sup>(1)</sup> | O <sup>(1)</sup> | S <sup>(1)</sup> |
|-------|----------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|       |          |                 | ----- (%) -----  |                  |                  |                  |
| L 26  | A1       | WPM             | 15,0 ± 0,50      | 75,0 ± 0,50      | 0,0 ± 0,00       | 10,0 ± 0,58      |
|       |          | MS              | 20,0 ± 0,82      | 75,0 ± 0,50      | 0,0 ± 0,00       | 5,0 ± 0,50       |
|       | A2       | WPM             | 15,0 ± 0,96      | 80,0 ± 1,15      | 0,0 ± 0,00       | 5,0 ± 0,56       |
|       |          | MS              | 15,0 ± 0,50      | 80,0 ± 0,82      | 0,0 ± 0,00       | 5,0 ± 0,45       |
|       | Média    |                 | 16,25            | 77,50            | 0,00             | 6,25             |
| L 35  | A1       | WPM             | 15,0 ± 0,96      | 80,0 ± 0,82      | 0,0 ± 0,00       | 5,0 ± 0,50       |
|       |          | MS              | 5,0 ± 0,65       | 85,0 ± 0,96      | 5,0 ± 0,50       | 5,0 ± 0,50       |
|       | A2       | WPM             | 15,0 ± 0,96      | 85,0 ± 0,96      | 0,0 ± 0,00       | 0,0 ± 0,00       |
|       |          | MS              | 25,0 ± 1,50      | 70,0 ± 1,00      | 10,0 ± 1,00      | 0,0 ± 0,00       |
|       | Média    |                 | 15,00            | 80,00            | 3,75             | 2,50             |
| L 63  | A1       | WPM             | 5,0 ± 0,55       | 95,0 ± 0,50      | 0,0 ± 0,00       | 0,0 ± 0,00       |
|       |          | MS              | 5,0 ± 0,50       | 90,0 ± 0,58      | 0,0 ± 0,00       | 5,0 ± 0,50       |
|       | A2       | WPM             | 15,0 ± 0,50      | 70,0 ± 0,58      | 5,0 ± 0,50       | 10,0 ± 0,58      |
|       |          | MS              | 20,0 ± 0,82      | 75,0 ± 0,50      | 5,0 ± 0,50       | 0,0 ± 0,00       |
|       | Média    |                 | 11,25            | 82,50            | 2,50             | 3,75             |

A1: explantes mergulhados em NaOCl (5% v/v) por 10 minutos; A2: explantes mergulhados durante 40 minutos em solução à base de *benomyl* (1% p/v). <sup>(1)</sup> dados apresentados como média ± desvio padrão.

Taxas elevadas de contaminação bacteriana *in vitro* são comumente encontradas em espécies lenhosas (GEORGE, 1993), como as registradas em *Ilex paraguariensis* (BERNASCONI *et al.*, 1996) e *Mangifera indica* (CORDEIRO *et al.*, 2002), as quais são difíceis de se estabelecer quando provenientes do campo. Para se obter maior êxito no estabelecimento em condições *in vitro* de *L. styraciflua*, outros

tratamentos assépticos deverão ser testados, bem como tipos de explantes a partir de meristemas apicais terminais e/ou axilares, como os estudados por Erig; Fortes (2002), que obtiveram até 92,9% de estabelecimento *in vitro* de *Pyrus* spp. a partir de isolamento de meristemas apicais.

Embora não tenha ocorrido diferença significativa em relação aos explantes saudáveis, assepsia e meio de cultura (Tabela 1), pode-se verificar que os clones L 26 e L 63 apresentaram 10% de explantes isentos de contaminação em meio de cultura WPM, respectivamente, ao se utilizarem as assepsias A1 e A2 (Tabela 2). Já para o clone L 35, obtiveram-se até 5% de explantes isentos de contaminação quando se utilizou a assepsia A1, independentemente do meio de cultura.

Apesar dos valores terem sido baixos, os materiais assim estabelecidos apresentaram-se aptos para o cultivo na fase subsequente de multiplicação de gemas. Embora não tenha sido constatada diferença significativa, observa-se que a assepsia A2 apresentou tendência de aumentar a taxa de oxidação para os clones L 35 e L 63, sendo que esse efeito não ocorreu para o clone L 26, o qual não apresentou taxa de oxidação. Além disso, a assepsia A1 apresentou tendência de ser mais eficiente quanto à eliminação da contaminação fúngica em relação a A2 (Tabela 2), corroborando os resultados encontrados por Watt *et al.* (2003).

Existiu interação entre os fatores clone e meio de cultura para as características da massa fresca das brotações (MB) ( $p < 0,05$ ), comprimento médio de brotos (CMB) ( $p < 0,05$ ) e número de folhas (NF) ( $p < 0,01$ ) (Tabela 3). Pode-se observar que o tratamento asséptico também influenciou a MB ( $p < 0,01$ ).

A interação entre os fatores assepsia e meio de cultura foi observada apenas para as características do número de folhas por explante (NF) ( $p < 0,01$ ). Além disso, os clones diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) quanto a essa variável (Tabela 3).

O número de brotações emitidas por explante (NB) não variou em função dos tratamentos testados, apresentando valor médio de 1,13 brotos por explante aos 30 dias após a inoculação (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado da análise de variância para as características da massa fresca da brotação (MB), comprimento médio de brotos (CMB), número de folhas (NF) e número de brotos (NB) por explante de *L. styraciflua* em função dos tratamentos testados.

Table 3. Result of variance analysis to the characteristics: fresh weight of shoots (MB), medium length of buds (CMB), leaves number (NF) and shoots number (NB) per explants, of *L. styraciflua* in function of tested treatments.

| Causas da variação     | GL | Quadrados médios                   |                                     |   |                            |
|------------------------|----|------------------------------------|-------------------------------------|---|----------------------------|
|                        |    | MB<br>(mg.explante <sup>-1</sup> ) | CMB<br>(cm.explante <sup>-1</sup> ) | NF<br>----- (explante <sup>-1</sup> ) ----- | NB <sup>(1)</sup><br>----- |
| Clone (Cl)             | 2  | 404,74 **                          | 0,0642 <sup>ns</sup>                | 3,7852 *                                    | 0,0005 <sup>ns</sup>       |
| Assepsia (As)          | 1  | 572,01 **                          | 0,0009 <sup>ns</sup>                | 0,1576 <sup>ns</sup>                        | 0,0001 <sup>ns</sup>       |
| Meio (Me)              | 1  | 1954,58 **                         | 0,0253 <sup>ns</sup>                | 0,5526 <sup>ns</sup>                        | 0,0030 <sup>ns</sup>       |
| Cl * As                | 2  | 154,87 <sup>ns</sup>               | 0,1141 <sup>ns</sup>                | 1,3090 <sup>ns</sup>                        | 0,0007 <sup>ns</sup>       |
| Cl * Me                | 2  | 283,98 *                           | 0,2151 *                            | 5,4952 **                                   | 0,0006 <sup>ns</sup>       |
| As * Me                | 1  | 9,45 <sup>ns</sup>                 | 0,1484 <sup>ns</sup>                | 7,4813 **                                   | 0,0007 <sup>ns</sup>       |
| Cl * As * Me           | 2  | 118,63 <sup>ns</sup>               | 0,0953 <sup>ns</sup>                | 1,7908 <sup>ns</sup>                        | 0,0004 <sup>ns</sup>       |
| Resíduo                | 36 | 74,54                              | 0,0431                              | 0,7498                                      | 0,0012                     |
| Média                  | —  | 43,01                              | 0,72                                | 4,02  | 1,13                       |
| CV <sub>exp.</sub> (%) | —  | 20,07                              | 28,96                               | 21,52                                       | 10,19                      |

<sup>ns</sup> valor de F não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro. \* e \*\* valor de F significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente. <sup>(1)</sup> dados transformados por  $(n/10)^{0,5}$  pelo teste de Lilliefors ao nível de 5% de probabilidade de erro; n: dado amostrado; GL: graus de liberdade; CV<sub>exp.</sub>: coeficiente de variação experimental.

O tratamento asséptico com hipoclorito de sódio (5% v/v) durante 10 minutos (A1) apresentou o maior valor médio para a massa fresca das brotações emitidas, a qual correspondeu a 47 mg por explante, diferindo significativamente do tratamento com exposição dos explantes em princípio ativo *benomyl* (1% p/v) durante 40 minutos (A2), o qual correspondeu a 39,6 mg (Tabela 4).

Embora em outras condições de trabalho, Brondani *et al.* (2007) também constataram efeito positivo ao submeterem segmentos nodais de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunni* de 1,5 cm de comprimento a concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) durante 10 minutos, previamente à inoculação *in vitro*.

Ao final de 21 dias de estabelecimento, os autores verificaram que as concentrações situadas entre 1,0 a 1,5% de NaOCl resultaram no maior valor médio das brotações, cerca de 1 cm por explante, sendo constatada resposta quadrática.

Tabela 4. Valores médios para a massa fresca das brotações (MB) por explante de *L. styraciflua* aos 30 dias após a inoculação.

Table 4. Mean value of fresh weight of shoots (MB) per explant of *L. styraciflua* at 30 days after the inoculation.

| Assepsia | Massa fresca das brotações<br>(mg.explante <sup>-1</sup> ) |
|----------|--|
| A1       | 46,5 a   |
| A2       | 39,6 b   |

Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A1: explantes mergulhados em NaOCl (5% v/v) por 10 minutos; A2: explantes mergulhados durante 40 minutos em solução à base de *benomyl* (1% p/v).

Efeitos positivos do hipoclorito de sódio quando aplicado em baixas concentrações para assepsia de meios de cultura foram observados por Ribeiro (2006), o qual relatou aumento do comprimento médio de ramos em explantes de *Eucalyptus pellita*, maior número de brotações e maior peso de massa fresca para *Ananas comosus* e maior formação de ramos para *Sequoia sempervirens*. O autor sugere que o cloro na presença de compostos orgânicos contidos no meio de cultura pode formar substâncias cloradas que ficam retidas no meio nutritivo, sendo que alguns desses compostos podem ser responsáveis por efeitos benéficos ao crescimento *in vitro*, contudo eles ainda não foram identificados.

Esses resultados sugerem que o hipoclorito de sódio, além de apresentar efeitos na assepsia em cultivo *in vitro*, como a eliminação superficial de patógenos, também pode favorecer o crescimento dos explantes quando aplicado em determinadas concentrações e formas de aplicação, considerando as suas propriedades oxidantes. Sabe-se que o cloro (Cl) é um elemento essencial ao desenvolvimento vegetal, atuando na fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2004), bem como podendo afetar o potencial osmótico da planta (HECKMAN, 1995). Contudo os efeitos benéficos e modo de ação do NaOCl no cultivo *in vitro* de vegetais não estão bem elucidados, sendo foco para futuros estudos a serem desenvolvidos.

Quando os explantes do clone L 26 foram cultivados em meio de cultura MS, foi observado o maior valor médio da massa fresca da brotação por explante, a qual foi de 59,6 mg, diferindo significativamente do meio de cultura WPM, que apresentou valor médio para massa fresca de 38,1 mg por brotação emitida para cada explante. Esse efeito positivo na massa fresca da brotação, quando os explantes de *L. styraciflua* foram cultivados em meio de cultura MS, correspondeu a um acréscimo de 36% em comparação ao observado no meio de cultura WPM.

Os demais clones, L 35 e L 63, não diferiram significativamente em relação à massa fresca da brotação ao variar o meio de cultivo. Contudo, quando o meio de cultura utilizado foi o MS, o clone L 26 diferiu significativamente dos clones L 35 e L 63. Essa diferença entre os clones não ocorreu quando o meio de cultura foi o WPM, apresentando valor médio de 36,7 mg, independentemente do clone avaliado (Figura 1a).

Em relação ao comprimento médio da brotação emitida por explante aos 30 dias após a inoculação, não foi observada diferença significativa entre os clones ao variar o meio de cultura, apresentando valor médio de 0,72 cm por explante. Porém, quando o meio de cultura foi o MS, observou-se efeito superior do clone L 26 em relação aos demais clones avaliados, apresentando o maior valor médio do comprimento da brotação emitida por explante, o qual correspondeu a cerca de 1 cm. Cabe ressaltar que esse efeito não ocorreu quando os explantes foram cultivados em meio de cultura WPM (Figura 1b).

O número de folhas variou significativamente entre os clones quando o meio de cultura foi o WPM, sendo que os clones L 35 e L 63, ambos com cerca de 5 folhas por explante, diferiram significativamente do clone L 26, com cerca de 3 folhas. Esse efeito não ocorreu quando o meio de cultura foi o MS. Não existiu diferença significativa do número de folhas emitidas por explante ao se comparar o mesmo clone em relação aos demais meios de cultura (Figura 1c).

Segundo Hartmann *et al.* (2002) e George (1993), cada material genético pode responder diferentemente à técnica de propagação vegetativa, nas mais variadas formas de aplicação e condições. Essa afirmação está de acordo com o presente estudo, ao se comparar o clone L 26 em relação aos clones L35 e L 63, que apresentaram diferente padrão de crescimento em relação à massa da brotação, comprimento médio da brotação e número de folhas, independentemente do meio nutritivo avaliado. Porém o efeito superior do clone L 26 aos demais clones também foi condicionado ao meio de cultura, sendo mais pronunciado ao ser cultivado em meio de cultura MS.

Diversos efeitos são relatados no estabelecimento *in vitro* de tecidos vegetativos lenhosos quando provenientes de matrizes manejadas em condições *ex vitro*. O meio de cultivo MS é o mais comumente empregado, sendo muito frequentemente reduzida a concentração total de seus componentes.

Merkle; Battle (2000) estabeleceram, em meio de cultura MS, explantes provenientes de gemas florais de árvores de *L. styraciflua* com 20 anos de idade. Joshi *et al.* (2003), para *Eucalyptus tereticornis* x *E. grandis*, e Bisht *et al.* (1999), para *E. tereticornis* x *E. camaldulensis*, também estabeleceram segmentos nodais em meio MS.

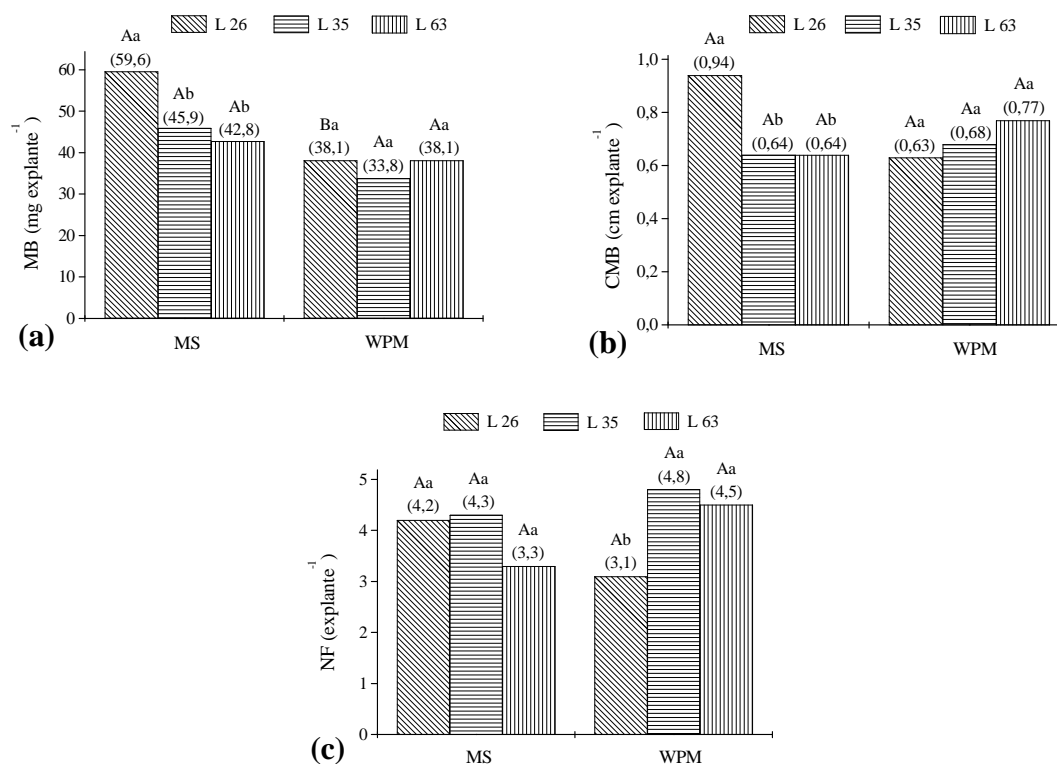


Figura 1. Valores médios da (a) massa fresca das brotações (MB), (b) comprimento da brotação (CMB) e (c) número de folhas (NF) por explante dos clones L 26, L 35 e L 63 de *L. styraciflua* em função dos meios nutritivos testados. Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula entre o mesmo clone nos diferentes meios de cultura e letras minúsculas entre os clones dentro do mesmo meio de cultura não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Figure 1. Mean value of (a) fresh weight of shoots (MB), (b) shoots length (CMB) and (c) leaves number (NF) per explant of *L. styraciflua* L 26, L 35 and L 63 clones, in function of tested culture mediums. Means followed by the same uppercase letter to the same clone in different culture mediums and lower case letter between clones in the same culture medium do not differ statistically by Tukey test at 5% of error probability level.



Couto *et al.* (2004) recomendam o uso do meio de cultura MS reduzido a 50% da concentração total dos seus componentes para o estabelecimento de porta-enxerto de *Prunus* sp., resultando em maior número de brotações emitidas por explante, bem como o de gemas.

Brondani (2008) estabeleceu segmentos nodais de *E. benthamii* x *E. dunnii* em meio MS, sugerindo um período mínimo de 21 dias para tal êxito, obtendo-se cerca de 2 brotações emitidas por explante, contendo 5 folhas e cerca de 1 cm de comprimento. Em outras condições de trabalho, Brondani *et al.* (2007) estabeleceram o mesmo material genético em meio de cultura JADS e MS, contudo não observaram diferença significativa em relação ao número de brotações formadas por explante e da massa fresca da brotação por explante, aos 35 dias após a inoculação.

Em relação ao efeito do meio nutritivo e assepsia avaliados, observou-se variação somente para o número de folhas emitidas (NF) por explante. Ao analisar o meio de cultura MS independentemente do WPM, observa-se que não existiu diferença significativa para o NF. Porém, quando foi utilizado o tratamento com princípio ativo *benomyl*, os explantes cultivados em meio WPM apresentaram o maior valor médio, cerca de 5 folhas por explante, diferindo significativamente do MS, o qual apresentou cerca de 4 folhas por explante. Essa diferença não ocorreu quando o tratamento asséptico foi conduzido com hipoclorito de sódio (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios do número de folhas (NF) por explante de *L. styraciflua* em função dos meios nutritivos testados e assepsia.

Table 5. Mean values to the leaves number (NF) per explant of *L. styraciflua* in function of the nutritive medium tested and asepsis.

| Assepsia | Meio de cultura |        |
|----------|-----------------|--------|
|          | MS              | WPM    |
| A1       | 4,3 Aa          | 3,7 Aa |
| A2       | 3,6 Ba          | 4,6 Aa |

Nas linhas, médias seguidas por mesma letra maiúscula, e nas colunas, médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. A1: explantes mergulhados em NaOCl (5% v/v) por 10 minutos; A2: explantes mergulhados durante 40 minutos em solução à base de *benomyl* (1% p/v).

Efeitos positivos do *benomyl* ao crescimento de tecidos vegetativos são apresentados por Flores *et al.* (2006), os quais verificaram que as soluções contendo fungicida *benomyl*, álcool etílico, hipoclorito de sódio e bicloreto de mercúrio foram eficazes para a desinfestação e regeneração de plantas *Pfaffia tuberosa* a partir de segmentos nodais, resultando em maior taxa de multiplicação *in vitro* quando comparada à dos explantes apicais. Salgado *et al.* (2001) observaram que somente os tratamentos com *benomyl* aumentaram a quantidade de matéria verde de plantas de crisântemo (*Dendranthema morifolium*). Esses trabalhos expressam o efeito positivo do *benomyl* para a desinfestação de explantes, bem como relatam aumento do crescimento de tecidos vegetativos, à semelhança dos resultados observados no presente estudo.

Porém o hipoclorito de sódio é um dos produtos mais bem sucedidos em termos de aplicabilidade e eficiência para desinfestação de explantes no cultivo *in vitro* de tecidos vegetais. Ribas *et al.* (2005) verificaram que o tratamento de imersão em solução de NaOCl a 0,25%, durante 10 minutos, foi satisfatório para a desinfestação de brotações apicais de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*), tendo em vista que esse tratamento proporcionou cerca de 70% de sobrevivência. Vengadesan *et al.* (2003) estabeleceram segmentos nodais de *Acacia sinuata* com variação de 3 a 4 cm de comprimento ao desinfestarem em solução contendo 5,25% de hipoclorito de sódio durante 10 minutos. Sutter; Barker (1985) definiram protocolo de estabelecimento ao submeterem brotações apicais de árvores de *L. styraciflua* de um ano de idade durante 15 minutos em 0,1% de NaOCl (0,1% de Tween 20), seguido de quatro lavagens com água destilada. A maior percentagem de sobrevivência de segmentos nodais de macieira (*Malus domestica* Borkh.) ocorreu com o uso de hipoclorito de sódio (ERIG; SCHUCH, 2003).

Em termos gerais, para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *L. styraciflua*, o meio de cultura MS apresentou efeito superior para as características morfológicas avaliadas em comparação com o meio WPM, corroborando os resultados observados por Bassan *et al.* (2006) para o estabelecimento *in vitro* de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. Possivelmente, esses efeitos podem

estar relacionados com a concentração dos elementos constituintes empregados para a composição total do meio de cultura, como sais e vitaminas, por exemplo, os quais diferem muito entre os meios nutritivos avaliados. Em relação à assepsia utilizada, a desinfestação com hipoclorito de sódio mostrou-se mais eficiente quando o meio de cultura foi o MS, além de ser facilmente empregada em termos de aplicabilidade para a assepsia de segmentos nodais. Porém outras formas de aplicação e tratamentos deverão ser testadas, tendo em vista a elevada contaminação bacteriana.

## CONCLUSÕES

- Os clones não diferiram em função dos tratamentos assépticos e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais.
- A assepsia com hipoclorito de sódio durante 10 minutos (A1) promoveu maior massa fresca de brotação e maior número de folhas por explante em meio de cultura MS.
- O tratamento com princípio ativo *benomyl* durante 40 minutos (A2) promoveu maior número de folhas em meio de cultura WPM.
- O meio de cultura MS é o mais indicado para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Liquidambar styraciflua*.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ e Embrapa Florestas (CNPQ), pelo apoio concedido.

## REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2004. 442 p.
- 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.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006.
- BERNASCONI, N. K.; MROGINSKI, L. A.; SANSBERRO, P. A.; REY, H. Y. Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): efecto del tipo de explante en el establecimiento de los cultivos *in vitro*. **Phyton: International Journal of Experimental Botany**, Buenos Aires, v. 58, n. 1/2, p. 23-31, 1996.
- BISHT, P.; SHARMA, V. K.; JOSHI, I.; KAPOOR, M. L. Micropropagation of newly produced F1 hybrid of *Eucalyptus* (*E. tereticornis* Sm. x *E. camaldulensis* Dehn. Southern Form). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 48, n. 2, p. 104-108, 1999.
- BRONDANI, G. E. **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 188 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HANSEL, F. A.; AZEVEDO, J. H. *In vitro* establishment and multiplication of the hybrid *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *E. dunnii* Maiden. In: IUFRO - TREE BIOTECHNOLOGY. PROPAGATION AND *IN VITRO* MANIPULATION, 2007, Ponta Delgada. **Proceedings...** Ponta Delgada, Azores, Portugal, 2007. p. 15.
- BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.
- BUZZY, N. S.; HERRERA, R. R.; ÁVALOS, R. M. G.; CAUICH, J. R. K.; CORTÉS, J. M.; PACHECO, L. C. G.; CANTO, A. FIGUEROA, F. Q.; VARGAS, V. M. L. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 43, n. 6, p. 507-520, 2007.

- CARVALHO, D.; PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. Uso de fungicida e antioxidantes em cultura “in vitro” de segmentos nodais de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 14, n. 1, p. 97-106, 1990.
- CORDEIRO, M. C. R.; CID, L. P. B.; PINTO, A. C. Q.; GOMES, A. C.; ANDRADE, S. R. M.; RAMOS, V. H. V. **Ensaio preliminares para o estabelecimento de um protocolo de assepsia, visando a micropropagação de cultivares de mangueira**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 43).
- COUTO, M.; BRAHM, R. U.; OLIVEIRA, R. P. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* sp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 561-563, 2004.
- DAI, J.; VENDRAME, W. A.; MERKLE, S. A. Enhancing the productivity of hybrid yellow-poplar and hybrid sweetgum embryogenic cultures. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 40, n. 4, p. 376-383, 2004.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Programa SOC-Software Científico**: Versão 2.1. Campinas, 1990.
- ERIG, A. C.; FORTES, G. R. L. Estabelecimento de pereira (*Pyrus* spp.) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p. 577-582, 2002.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, Lavras, v. 9, n. 3, p. 221-227, 2003.
- FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPq, 1998. p. 21-43.
- FLORES, R.; LESSA, A. O.; PETERS, J. A.; FORTES, G. R. L. Efeito da sacarose e do *benomyl* na multiplicação *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 12, p. 2363-2368, 1999.
- FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 845-851, 2006.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2<sup>nd</sup> ed. Edington: Exegetics, 1993. v. 1.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI / EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.
- GURGEL GARRIDO, L. M. A.; FARIA, H. H.; CRUZ, S. F.; PALOMO, M. Variabilidade genética de características silviculturais de *Liquidambar styraciflua* L. em teste de origens em Paraguaçu Paulista - SP. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 125-132. 1997.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, JÚNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7<sup>th</sup> ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880 p.
- HECKMAN, J. R. Corn responses to chloride in maximum yield research. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 3, p. 415-419, 1995.
- HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. Piracicaba: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2000. 11 p. (Circular Técnica IPEF, 192).
- JOSHI, I.; BISHT, P.; SHARMA, V. K.; UNİYAL, D. P. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). **Silvae Genetica**, Berlin, v. 52, n. 3/4, p. 110-113, 2003.

- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society**, Carlisle, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; ZARPELON, T. G.; SIQUEIRA, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 6, p. 843-851, 2005.
- McCARTER, P. S.; HUGHES, C. E. *Liquidambar styraciflua* L. – a species of potential for the tropics. **Commonwealth Forestry Review**, Oxford, v. 63, n. 3, p. 207-216, Sep. 1984.
- MERKLE, S. A.; BATTLE, P. J. Enhancement of embryogenic culture initiation from tissues of mature sweetgum trees. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 19, n. 3, p. 268-273, 2000.
- MUÑOZ, V. L. Apuntes sobre algunas latifoliadas de madeiras valiosas 3 – Liquidambar (*Liquidambar styraciflua* L.). **Ciência e Investigación Forestal**, Santiago, v. 2, n. 6, p. 335-348, 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kopenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NEHRA, N. S.; BECWAR, M. R.; ROTTMANN, W. H.; PEARSON, L.; CHOWDHURY, K.; CHANG, S.; WILDE, H. D.; KODRZYCKI, R. J.; ZHANG, C.; GAUSE, K. C.; PARKS, D. W.; HINCHEE, M. A. Invited review. Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 41, n. 6, p. 701-717, 2005.
- NIEDZ, R. P.; BAUSHER, M. G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 38, n. 5, p. 468-471, 2002.
- RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSKI, L.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, n. 4, p. 517-524, 2005.
- RIBEIRO, J. M. **Comparação entre as técnicas de esterilização de meios de cultura de tecidos vegetais com hipoclorito de sódio e por autoclavagem**. 47 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2006.
- ROCHA, P. S. G.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C.; MISTURA, C. C. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxerto de pessegueiro em diluições do meio MS acrescido de concentrações de BAP. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 4, p. 83-87, 2007.
- SALGADO, S. M. L.; CUNHA, R. L.; NIELLA, G. R.; TEIXEIRA, H.; PASQUAL, M. Efeito da utilização de TDZ e *benomyl* na micropropagação do crisântemo (*Dendranthema morifolium*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 274-280, 2001.
- SCHMITT, D.; PERRY, T. O. Self-sterility in sweetgum. **Forest Science**. Maryland, v. 10, n. 3, p. 302-305. 1964.
- SHIMIZU, J. Y.; SPIR, I. H. Z. Avaliação de procedências e progênies de liquidambar da América Central, do México e dos Estados Unidos, em Agudos, Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 39, p. 93-108, 1999.
- SHIMIZU, J. Y.; SPIR, I. H. Z. Produtividade de madeira de liquidambar de diferentes procedências em Quedas do Iguaçu, PR. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 44, p. 3-12, 2002.
- SHIMIZU, J. Y.; SPIR, I. H. Z. Produtividade de madeira de liquidambar (*Liquidambar styraciflua* L.) de diferentes procedências, em Quedas do Iguaçu, PR. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 28, n. 4, p. 487-491, 2004.

- SILVA, A. C. F.; ROSA, C. R. E.; MELO, I. S. Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* spp. a benomil e iprodione. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 3, p. 395-399, 1999.
- SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2006. 152 p.
- SUTTER, E. G.; BARKER, P. B. *In vitro* propagation of mature *Liquidambar styraciflua*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Netherlands, n. 5, p. 13-21, 1985.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. SANTARÉM, E.R. *et al.* (Trad.). 3. ed. Porto Alegre: Artmed., 2004. 719 p.
- VENDRAME, W. A.; HOLLIDAY, C. P.; MERKLE, S. A. Clonal propagation of hybrid sweetgum (*Liquidambar styraciflua* x *L. formosana*) by somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 20, n. 8, p. 691-695, 2001.
- VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; PREAM ANAND, R.; SELVARAJ, N. *In vitro* propagation of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. from nodal segments of a 10-year-old tree. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 39, n. 4, p. 409-414, 2003.
- WATT, M. P.; BERJAK, P.; MAKHATHINI, A.; BLAKEWAY, F. *In vitro* field collection techniques for Eucalyptus micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 75, n. 3, p. 233-240, 2003.
- WENDLING, I. **Propagação clonal de híbridos de Eucalyptus spp. por miniestaquia**. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.
- WENDLING, I.; BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; HANSEL, F. A. Mini-cuttings technique: a new *ex vitro* method for clonal propagation of sweetgum. **New Forests**, Dordrecht, 2010. (DOI: 10.1007/s11056-009-9175-2).
- WENDLING, I.; XAVIER, A. Miniestaquia seriada no rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 4, p. 475-480, 2003.
- WILCOX, J. R. Duration of pistillate flower receptivity in sweetgum. **Forest Science**, Maryland, v. 13, n. 1, p. 95-96, 1967.
- XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.

