



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Luís Rafael Sardinha Rodrigues

**MICROPROPAGAÇÃO E AVALIAÇÃO DO ENRAIZAMENTO *IN VITRO* DE  
DIFERENTES GENÓTIPOS DE EUCALIPTO**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal orientada pelo Professor Doutor Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto e Doutora Cristina Maria Pereira Marques e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2020



“We can judge our progress by the courage of our questions and the depth of our answers, our willingness to embrace what is true rather than what feels good.”

**Carl Sagan**



Trabalho realizado no âmbito da Unidade de I&D Centre for Functional Ecology – Science for People & the Planet (CFE), com a referência UIDB/04004/2020, com apoio financeiro da FCT/MCTES através de fundos nacionais (PIDDAC) e do projecto “RENATURE- Valorization of the Natural Endogenous Resources of the Centro Region” (CENTRO-01-0145-FEDER-000007). Funded by the Comissão de Coordenação da Região Centro (CCDR-C) and subsidized by the European Regional Development Found (FEDER).

**FCT** Fundação  
para a Ciência  
e a Tecnologia



**CENTRE FOR  
FUNCTIONAL  
ECOLOGY**

**RAIZ**

 Instituto de Investigação da Floresta e Papel

Cofinanciado por:

**CENTRO** 



 **UNIÃO EUROPEIA**  
Fundo Europeu  
de Desenvolvimento Regional



# Agradecimentos

---

Embora a sua realização seja individual, não poderia deixar de agradecer a algumas pessoas que me acompanharam durante este percurso académico e que contribuíram, por diversas razões, para a concretização deste projeto.

Primeiramente quero agradecer aos meus orientadores, por todo o conhecimento transmitido e tempo que dispensaram. Ao Professor Doutor Jorge Canhoto por tudo o que me ensinou ao longo destes dois anos de mestrado, pelo apoio científico, incentivo e disponibilidade. À Doutora Cristina Marques pela disponibilidade e confiança que depositou em mim para integrar este trabalho.

Agradeço ao RAIZ pelo material vegetal, protocolos e iluminação fornecidos para este trabalho.

Agradeço ainda à Doutora Mónica Zuzarte e ao Rui da QualityPlant por gentilmente terem cedido parte do seu laboratório para alguns dos meus ensaios com iluminação LED e por toda a ajuda e boa disposição sempre presente ao longo deste trabalho.

À Ana e à Mariana por toda a ajuda que me deram, principalmente por me terem iniciado no funcionamento do laboratório e na prática da micropropagação.

Ao André pelos conselhos, esclarecimento de dúvidas e ajuda prestada, principalmente no tratamento de dados e na estatística.

Não posso deixar de agradecer a todos os meus colegas de mestrado e de laboratório pela amizade, companheirismo e momentos bem passados.

Ao GESAC pela grande amizade que já levamos há mais de seis anos, grupo de amigos este que certamente foi um dos, senão o mais marcante, que tive a oportunidade de conhecer ao longo destes anos e que irei para sempre recordar todas as gargalhadas e momentos que passámos. Agradeço ainda a um grupo especial de amigos de Évora que me receberam sempre com grande saudade e entusiasmo e dos quais tenho a certeza que terei sempre a confiança, orgulho e amizade.

A ti Coimbra, a saudade que sinto quando falo em ti, todos eles um dia irão perceber.

E por último, mas não menos importante, aos meus pais, por serem um exemplo de vida e de superação. Sem eles nunca conseguiria.



# Índice

<b>Resumo</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>xviii</b>
1.1. Contextualização do trabalho .....	2
1.2. A floresta em Portugal .....	2
1.3. O início da cultura de eucalipto em Portugal.....	4
1.3.1 Vantagens e limitações da cultura de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	6
1.4. Distribuição geográfica.....	8
1.5. Melhoramento genético do eucalipto .....	10
1.6. Reprodução de plantas .....	11
1.7. Micropropagação de plantas .....	12
1.7.1 Etapas principais da micropropagação.....	13
1.7.1.1 Estabelecimento <i>in vitro</i> .....	14
1.7.1.2 Fase de multiplicação.....	15
1.7.1.3 Enraizamento .....	15
1.8. Micropropagação de eucalipto .....	17
1.9. Luz artificial .....	19
1.10. Objetivos.....	20
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	<b>21</b>
2.1. Material vegetal .....	23
2.2. Iluminação LED.....	23
2.3. Avaliação do potencial de micropropagação dos genótipos de eucalipto .....	23
2.3.1. Germinação de sementes e estabelecimento <i>in vitro</i> .....	23
2.3.2. Estabelecimento <i>in vitro</i> e micropropagação.....	25
2.3.3 Multiplicação .....	26
2.3.4 Enraizamento.....	29
2.4. Avaliação dos parâmetros morfológicos .....	30
2.5. Análise estatística .....	31
<b>2. Resultados e Discussão</b> .....	<b>32</b>
3.1. Germinação de sementes e estabelecimento <i>in vitro</i> de plantas de eucalipto.....	33
3.2. Avaliação das taxas de sobrevivência e enraizamento de plantas de diferentes origens .....	33
3.2.1. Ensaio de enraizamento.....	35
<b>3. Conclusão e perspectivas futuras</b> .....	<b>48</b>

<b>4. Referências bibliográficas .....</b>	<b>51</b>
--------------------------------------------	-----------



## Índice de figuras

---

Figura 1 - Distribuição das áreas totais por espécie/grupo de espécies. Fonte: ICNF (2015). .....	4
Figura 2 - Distribuição geográfico do <i>Eucalyptus globulus</i> em Portugal. Fonte: Celpa (2016) e ICNF (2015). .....	7
Figura 3 - Distribuição das populações puras e híbridas de <i>E. globulus</i> , <i>E. bicostata</i> , <i>E. pseudoglobulus</i> e <i>E. maidenii</i> na Oceania. Fonte: Jordan et al. (1993). .....	9
Figura 4 - Diagrama de micropropagação, exemplificando os sistemas de enraizamento, <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i> . Fonte: Beltrame (2013). .....	15
Figura 5 - Módulos LED utilizados para os ensaios de enraizamento. ....	24
Figura 6 - Germinação de semente de <i>E. nitens</i> em caixa de Petri, no escuro, após 15 dias de cultura. ....	26
Figura 7 - Plantas-mãe (35 plantas) dos diferentes genótipos utilizados nos ensaios. ....	27
Figura 8 - Processo de esterilização dos explantes de eucalipto para o estabelecimento <i>in vitro</i> . A) Explantes pertencentes ao genótipo <i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i> (MFR7423) desinfectados com lixívia comercial a 10%; B) Explantes do genótipo <i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i> (MFR7423) em caixa de Petri já com os tecidos oxidados removidos. ....	27
Figura 9 - Taxa de sobrevivência dos genótipos estudados para a escolha do meio de cultura preferencial. ....	37
Figura 10 - Aspecto dos explantes em fase de multiplicação de alguns genótipos. A) explante do genótipo <i>E. grandis</i> x <i>E. globulus</i> (77000) em meio <i>Eucalyptus</i> ; B) explantes do genótipo <i>E. viminalis</i> x <i>E. saligna</i> (BAR6) em meio <i>Eucalyptus</i> ; C) explante do genótipo <i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i> (MFR7423) em meio <i>Eucalyptus</i> . As barras correspondem a 1cm. ....	37
Figura 11 - Aspecto dos explantes onde são visíveis as raízes desenvolvidas após os diferentes ensaios de enraizamento. A) explante enraizado do genótipo <i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i> (MFR7423) em meio <i>Eucalyptus</i> ; B) explante enraizado do genótipo <i>E. grandis</i> x <i>E. globulus</i> (77000) em meio <i>Eucalyptus</i> ; C) explante enraizado do genótipo <i>E. nitens</i> em meio <i>Eucalyptus</i> ; D) explante enraizado do genótipo <i>E. globulus</i> em meio Fossard. As barras correspondem a 1cm. ....	39
Figura 12 - Comparação dos parâmetros de enraizamento dos genótipos <i>E. globulus</i> (G09) e <i>E. viminalis</i> x <i>E. saligna</i> (BAR6) para o mesmo meio de cultura, relativos ao ensaio A (*p <0,05, **p <0,01; ***p <0,001). ....	40
Figura 13 - Teste ANOVA relativo à avaliação dos parâmetros de enraizamento para os genótipos <i>E. nitens</i> x <i>E. globulus</i> (H.197.01), <i>E. grandis</i> x <i>E. globulus</i> (77000) e <i>E. urophylla</i> x <i>E. maidenii</i> (MFR7423) sob o mesmo meio de cultura para o ensaio A (*p <0,05, **p <0,01; ***p <0,001). ....	41
Figura 14 - Teste ANOVA realizado para avaliação dos parâmetros de enraizamento relativos ao ensaio B sob iluminação LED (*p <0,05, **p <0,01; ***p <0,001). ....	44
Figura 15 - Teste ANOVA realizado para avaliação dos parâmetros de enraizamento relativos ao ensaio B sob luz branca (*p <0,05, **p <0,01; ***p <0,001). ....	45
Figura 16 - Avaliação dos parâmetros de enraizamento de <i>E. globulus</i> para o ensaio C comparando dois tipos de iluminação (LED e luz normal) (*p <0,05, **p <0,01; ***p <0,001). ....	47
Figura 17 - Avaliação dos parâmetros de enraizamento de <i>E. nitens</i> para o ensaio C comparando dois tipos de iluminação (LED e luz normal) (*p <0,05, **p <0,01; ***p <0,001). ....	48

## Índice de tabelas

---

Tabela 1 - Caracterização do material vegetal utilizado nos ensaios.....	23
Tabela 2 - Composição química do meio Fossard modificado utilizado para a cultura de tecidos. ....	28
Tabela 3 - Composição química do meio <i>Eucalyptus</i> modificado utilizado para a cultura de tecidos.....	29
Tabela 4 - Composição dos meios testados em relação aos reguladores de crescimento.....	32
Tabela 5 - Taxa de germinação das 80 sementes (40 de <i>Eucalyptus globulus</i> e 40 de <i>Eucalyptus nitens</i> ) em tubos de ensaio. Resultados obtidos após 15 dias de cultura. ....	36
Tabela 6 - Taxas de enraizamento e parâmetros avaliados para o ensaio A.....	40
Tabela 7 - Taxas de enraizamento e parâmetros avaliados para as plantas do ensaio B sob iluminação LED. ....	42
Tabela 8 - Taxas de enraizamento e parâmetros avaliados para as plantas do segundo ensaio sob luz branca.....	43
Tabela 9 - Taxas de enraizamento e parâmetros avaliados para as plantas do ensaio C sob iluminação LED e luz branca. ....	46

## Lista de abreviaturas

---

Ao longo deste trabalho, serão utilizadas abreviaturas em língua inglesa por ser esta a utilizada na literatura da especialidade.

**BAP** - 6-benzilaminopurina

**°C** - Grau Celsius

**Celbi** - Celulose Beira Industrial

**cm** - centímetro

**DCV** - Departamento de Ciências da Vida

**ENF** - Estratégia Nacional para a Floresta

**ha** - hectare

**IBA** - Ácido 3-indolbutírico

**ICNF** - Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

**L** - Litro

**LED** - Light-emitting diodes

**ml** - Mililitro

**p/v** - Peso/volume

**RAIZ** – Instituto de Investigação da Floresta e do Papel

**s** - Segundo

**μ** - Micro



## Resumo

---

O género *Eucalyptus*, pelo seu rápido crescimento e propriedades físico-químicas da madeira, é amplamente utilizado como matéria-prima para a indústria papelreira. Nesse contexto assume assim uma grande importância em termos económicos e sociais, pela produção industrial e pelo emprego gerado através de diversos meios ligados ao setor florestal.

Este género apresenta barreiras no que toca ao sucesso no enraizamento *in vitro*, ocorrendo génotipos mais fáceis e outros mais difíceis de enraizar, sendo por isso importante estudar a sua recalcitrância.

Este trabalho foi realizado no âmbito de uma parceria entre o RAIZ e a Universidade de Coimbra e incidiu sobre a avaliação do enraizamento *in vitro* de génotipos de eucalipto em diferentes condições de iluminação, através de parâmetros fenotípicos. Os génotipos utilizados pertenciam a duas espécies puras e a quatro híbridos diferentes.

Foi possível verificar que a germinação de *Eucalyptus globulus* é muito elevada, na ordem dos 95%, em relação ao *Eucalyptus nitens*.

Com base nas taxas de sobrevivência, conseguiu-se estabelecer qual o meio preferencial para cada génotipo.

Para o ensaio de enraizamento A, concluímos que o génotipo *E. globulus* (G09) apresentou maior capacidade de enraizamento, mas o génotipo *E. grandis* x *E. globulus* (77000) é o que apresenta de forma geral uma avaliação superior dos parâmetros estudados, com um número médio de raízes formadas de  $3,2 \pm 1,31$  e a maior média do comprimento da > raiz. No ensaio B, para as plantas sem um período de escuro, a taxa de enraizamento foi nula para todos os génotipos com exceção do génotipo *E. globulus* (7%). No entanto, para as plantas que ficaram 10-15 dias no escuro e foram transferidas posteriormente para luz branca, apresentam taxas de enraizamento significativas com exceção dos génotipos *E. globulus* (G09), *E. viminalis* x *E. saligna* (BAR6) e *E. grandis* x *E. globulus* (77000). Para o último ensaio, foi possível observar que o génotipo *E. globulus* apresentou maior capacidade de enraizamento do que o génotipo *E. nitens*, nas duas condições de iluminação.

A análise dos resultados permitiu concluir que a utilização de iluminação LED durante o processo de enraizamento não demonstrou diferenças significativas comparando com a iluminação normal, ainda de

destacar que se observou uma maior taxa de enraizamento quando existiu um período de escuro após indução com IBA.

Deverão ser realizados estudos mais detalhados de forma a perceber que outras variáveis poderão ter influência no enraizamento *in vitro* de vários genótipos de eucalipto.

**Palavras-chave:** enraizamento; eucalipto; iluminação; *in vitro*; LED



## Abstract

---

Eucalyptus, due to its fast growth and applied physical properties of wood, is promoted as a raw material for the paper industry. In this context, it is thus assumed a great importance in economic and social terms, for industrial production and for employment through various means linked to the forestry sector.

This genus presents barriers in terms of success in rooting *in vitro*, with genotypes easier and others more difficult to root, so it is important to study its recalcitrance.

This work was carried out as part of a partnership between RAIZ and the University of Coimbra and focused on the evaluation of the *in vitro* rooting of eucalyptus genotypes under different lighting conditions, through phenotypic parameters. The genotypes used were from two pure species and four different hybrids.

It was possible to confirm that the germination of *Eucalyptus globulus* is very high, reaching 95% success in relation to *Eucalyptus nitens*.

Based on the survival rates, it was possible to establish the preferred medium for each clone.

For rooting test A, we concluded that genotype *E. globulus* (G09) showed greater rooting capacity, but genotype *E. grandis* x *E. globulus* (77000) is the one that generally presents a higher evaluation of the studied parameters, with an average number of roots formed of  $3.2 \pm 1,31$  and the highest mean root length. In rooting test B, for plants without a dark period, rooting rate was zero for all genotypes except for the *E. globulus* genotype (7%). However, for plants that were 10-15 days in the dark and later transferred to white light, it showed significant rooting rates with the exception of genotypes *E. globulus* (G09), *E. viminalis* x *E. saligna* (BAR6) and *E. grandis* x *E. globulus* (77000). For the last test, we can see that genotype *E. globulus* had the best rooting capacity compared to *E. nitens* genotype, under both lighting conditions.

The analysis of the results showed that the use of LED lighting during the rooting process does not differ by comparison with normal lighting, it should also be noted that a higher rooting rate was observed when there is a dark period after induction with IBA. More detailed studies should be carried out in order to understand that other variables influence the *in vitro* rooting of various eucalyptus genotypes.

**Keywords:** eucalyptus; *in vitro*; LED; lighting; rooting



# 1. Introdução

---



## 1.1 Contextualização do trabalho

A floresta em Portugal tem grande importância a nível económico e social, não só pelo contributo das suas exportações para o PIB nacional mas também por empregar muitas pessoas, contribuindo também para a evolução positiva das exportações portuguesas (Sarmiento *et al.*, 2013).

O eucalipto (sendo a espécie *Eucalyptus globulus* Labill. a que tem maior expressão em Portugal) ocupa aproximadamente 26% da área florestal (ICNF, 2015). Devido ao crescimento rápido e uma alta capacidade de adaptação aos solos e clima do nosso país, é uma das espécies lenhosas mais cultivada em florestas de produção em Portugal, principalmente como matéria-prima para a indústria do papel.

Uma das técnicas utilizadas na multiplicação de espécies florestais com grande destaque atualmente, é a micropropagação, permitindo a seleção *in vitro* de genótipos com características interessantes, para um determinado fim.

Apesar da sua utilidade há mais variáveis que influenciam o sucesso do processo de propagação vegetativa, como é o caso do meio de cultura, das hormonas de crescimento e da iluminação.

No caso do *E. globulus*, um dos grandes problemas é a dificuldade no enraizamento *in vitro*, havendo genótipos que são mais fáceis de enraizar e genótipos difíceis de enraizar, que precisam de condições ótimas para a formação de raízes adventícias.

Perante esta situação, é necessário selecionar e multiplicar genótipos que apresentam uma maior capacidade de enraizamento *in vitro*, para além de outras características de desempenho e adaptabilidade superiores.

A hibridação de *E. globulus* com outras espécies do género *Eucalyptus* tem demonstrado excelentes resultados, que vão desde a qualidade da madeira, ao seu crescimento, uma maior adaptação a condições climáticas e a uma maior facilidade de propagação (Alfenas *et al.*, 2009).

Este trabalho de mestrado realizou-se no âmbito de uma parceria entre a Universidade de Coimbra e o RAIZ (Instituto de Investigação da Floresta e do Papel), com o intuito de otimizar protocolos de micropropagação de eucalipto e avaliar o enraizamento *in vitro* de diferentes genótipos em condições distintas de iluminação, com particular incidência na iluminação LED.

## 1.2 A floresta em Portugal

O aumento populacional a que se tem assistido nas últimas décadas, atingindo atualmente perto de oito mil milhões de pessoas e com perspectivas para aumentar (Pison, 2019) tem levado a um aumento igualmente acelerado da procura de bens alimentares e matérias-primas de origem vegetal. Esta pressão demográfica tem impacto nos recursos naturais do planeta, de onde se destaca a redução da área de floresta natural. As florestas plantadas, estabelecidas através da plantação ou sementeira de espécies nativas ou exóticas, surgem como alternativa para suprir as necessidades crescentes de produção de matérias-primas a partir de biomateriais, de proteção das florestas naturais e/ou conservação ambiental (Evans, 2009).

No final do século XV, assistiu-se a uma grande preocupação com a falta de madeira, uma vez que restavam quase apenas os coutos de caça, levando assim, mais tarde, ao conceito de recriar artificialmente as florestas como proteção do solo e forma de retenção da água (Pereira, 2014). Criou-se assim legislação para incentivar a reflorestação, como aconteceu com a Lei das Árvores, criada em 1562, que obrigava todos os municípios a ordenar o plantio de diversas árvores para a obtenção de madeira, sendo o pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*), uma das espécies florestais mais utilizadas na época.

Em Portugal, no século XX, o setor florestal teve uma evolução significativa, devido a uma forte intervenção, inicialmente pelos proprietários florestais e, de seguida, pelo Estado, através de uma estratégia política que pretendia aumentar a área florestada (Radich e Batista, 2005). Daí resultaram recursos económicos para uma melhoria das condições sociais das populações, e com esse intuito procedeu-se à criação de entidades reguladoras e legislação para o fomento florestal.

A área mundial de florestas plantadas teve um crescimento considerável entre 1990 e 2010, passando de 178 milhões de hectares para 264 milhões ha, representando assim um aumento de cerca de 7% de área florestal mundial (Jürgensen *et al.*, 2014).

A floresta em Portugal tem atualmente um grande impacto económico e ecológico, pois é dela que usufruímos de vários bens e serviços essenciais, tais como a madeira (construção, produção de biomassa, produção de pasta de papel), sementes, frutos, cortiça e até lazer (Pessoa *et al.*, 2014).

De acordo com o 6º Inventário Florestal Nacional (ICNF, 2015), as diferentes espécies de eucalipto têm a maior área no país relativamente à superfície florestal (812 mil ha; 26%), o sobreiro a segunda (737 mil ha; 23%), seguindo-se o pinheiro-bravo (714 mil ha; 23%). A área ocupada por espécies resinosas corresponde

a cerca de 31% da superfície florestal em Portugal, sendo a restante (69%) ocupada por espécies folhosas, como se observa na figura 1.

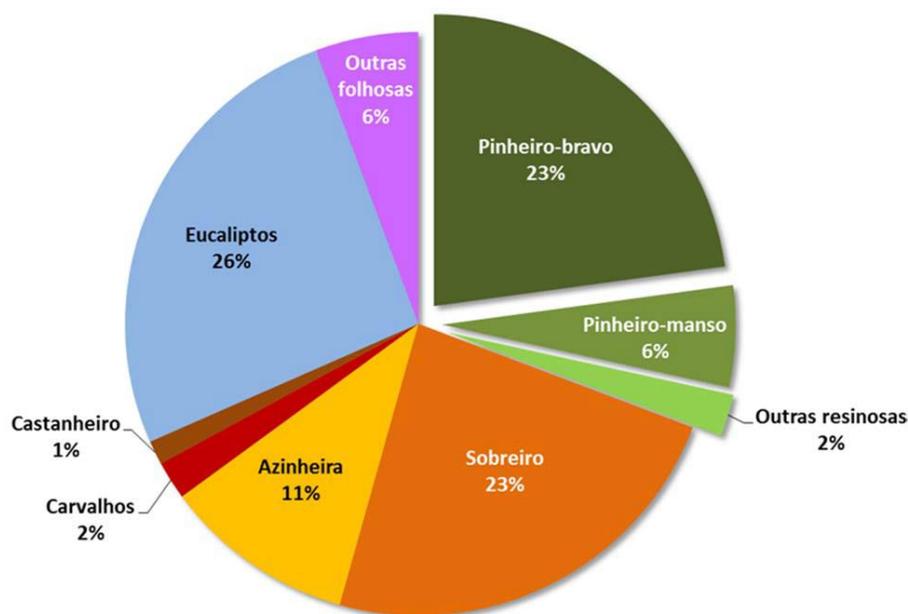


Figura 1 - Distribuição das áreas totais por espécie/grupo de espécies. Fonte: ICNF (2015).

### 1.3 O início da cultura de eucalipto em Portugal

O género *Eucalyptus*, originário da Austrália, alberga várias espécies importantes para a indústria da madeira, bem adaptadas a uma ampla variedade de condições ambientais (Pinto *et al.*, 2016). A grande adaptabilidade dos eucaliptos, combinada com um rápido crescimento e propriedades superiores da madeira, levou à sua plantação em mais de 100 países em todo o mundo, representando mais de 20 milhões de hectares (Iglesias-Trabad *et al.*, 2009).

Este género inclui mais de 800 espécies, pertencente à família Myrtaceae à qual também pertencem outras espécies de importância económica, como as fruteiras *Acca sellowiana* (feijoa) e *Psidium guajava* (Pinto *et al.*, 2016). O género *Eucalyptus* divide-se em oito subgéneros sendo o subgénero *Symphyomyrthus* aquele que alberga a maioria das espécies (Poke *et al.*, 2005). As dez espécies de eucalipto economicamente mais importantes e cultivadas em todo o mundo são: *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*,

*E. urophylla*, *E. viminalis*, *E. saligna*, *E. deglupta*, *E. exserta* e *E. citriodora*, *E. paniculata* e *E. robusta* para produção de celulose e madeira (Pinto *et al.*, 2016). Destas espécies, Potts e Dungey (2004) relataram que *E. grandis*, *E. urophylla* e os seus híbridos são os melhores para a produção de celulose em regiões tropicais e subtropicais, enquanto *E. globulus* é mais comum em regiões temperadas (livre de geadas severas). Em comparação com outras espécies de eucalipto, a espécie *E. globulus* possui uma morfologia superior das fibras e requer menor utilização de produtos químicos para obter uma pasta branqueada, devido ao seu menor teor em lenhina (Pinto *et al.*, 2016). *E. camaldulensis* é conhecida pela sua capacidade de proliferar em regiões áridas e semi-áridas enquanto que *E. urophylla* é altamente produtiva e *E. nitens* é reconhecida pela sua adaptabilidade a climas mais frios (Gomes e Canhoto, 2003). A grande diversidade, adaptabilidade e crescimento do eucalipto tornou-o um recurso global renovável de fibra e energia, representando assim uma opção adequada para atender às crescentes necessidades de madeira a nível mundial. Parece, portanto, inevitável que as áreas ocupadas por eucaliptos de rápido crescimento continuem a aumentar nos próximos anos.

Em Portugal, a introdução do eucalipto, nomeadamente o *E. globulus* terá ocorrido entre 1820 e 1830, com alguns autores a citar que tenha sido mais tarde, na década de 1850 (Borrvalho *et al.*, 2007). Esta introdução deveu-se em grande parte a uma grande falta de madeira a nível nacional. O aparecimento desta espécie de crescimento rápido, com troncos apurados e esguios, constituía um grande atrativo para os agricultores, pois era um modo eficaz de obter madeira para uso nas explorações agrícolas e como combustível (Borrvalho *et al.*, 2007).

A utilização desta espécie foi, inicialmente, fomentada por entusiastas para fins ornamentais e medicinais em algumas regiões do território, sendo que a primeira utilização para fins comerciais, foi no âmbito da criação de travessas de madeira para caminhos-de-ferro (Borrvalho *et al.*, 2007). Segundo Borrvalho *et al.* (2007), as primeiras plantações com essa finalidade foram realizadas em 1870 pela Companhia Real dos Caminhos de Ferro Portugueses, a partir de viveiros e da instalação definitiva nas áreas reservadas das estações, casas de guarda e ao longo das linhas. Entretanto, assistiu-se a um longo período em que o recurso ao eucalipto não teve grande expressão, e só a partir da década de 1940 se tornou numa óbvia e importante fonte de matéria-prima para a produção de pasta de papel (Radich, 1994). A utilização da madeira de eucalipto para a produção de pasta de papel pelo processo denominado *kraft* pela Companhia Portuguesa de Celulose em Cacia, Aveiro (atualmente The Navigator Company), a partir de 1956, foi um marco para o sucesso mundial da indústria do papel, constituindo atualmente um dos setores mais importantes a nível nacional (Alves 2007; Gutierrez-Poch 2012). Em 2018, o volume de vendas correspondeu a 1,44% do produto interno bruto e as exportações do setor representam 4,9% do total das exportações nacionais (CELPA, 2018).

### 1.3.1 Vantagens e limitações da cultura de *Eucalyptus globulus*

Da lista de espécies exóticas introduzidas no nosso país, o eucalipto é o género que mais se distingue do ponto de vista económico, possui uma forte capacidade de adaptação em condições diferentes do seu *habitat* natural, eficiência na captação e utilização de nutrientes e água, assim como o grande porte e potencial de crescimento (Silva *et al.*, 2007).

Segundo Canadas e Novais (2014), a área disponível para a realização da plantação do *E. globulus* também é reflexo da modernização da agricultura aliada ao declínio demográfico das áreas cultiváveis, e ao abandono da atividade agrícola. A ocupação agroflorestal e florestal constituem assim uma forma de ocupação do terreno e fixação de população, que segundo a ENF (Estratégia Nacional para a Floresta, 2015) gera cerca de 100 mil empregos, ou seja, cerca de 4% do emprego nacional.

A espécie *E. globulus* teve uma boa adaptabilidade às regiões de clima mediterrânico com inverno suave, mas apesar da sua resistência ao stress hídrico, por ser uma espécie de crescimento rápido, necessita de uma precipitação anual média acima do que se verifica normalmente em muitas regiões de Portugal. Estas características são encontradas no continente português com maior expressão a norte do rio Tejo (Fig. 2). Nas regiões em que as necessidades hídricas não são atingidas a competitividade por água irá fazer com que o subcoberto arbustivo e herbáceo não se instale adequadamente. Já em condições ótimas de clima e solo, o eucalipto pode, como outra qualquer espécie arbustiva, ajudar ao desenvolvimento de perfis de solos mais férteis (Madeira *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2007). Deste modo, podemos compreender que a produtividade de um eucaliptal depende de vários fatores bióticos (pragas e doenças) e abióticos (temperatura, pluviosidade, solo).

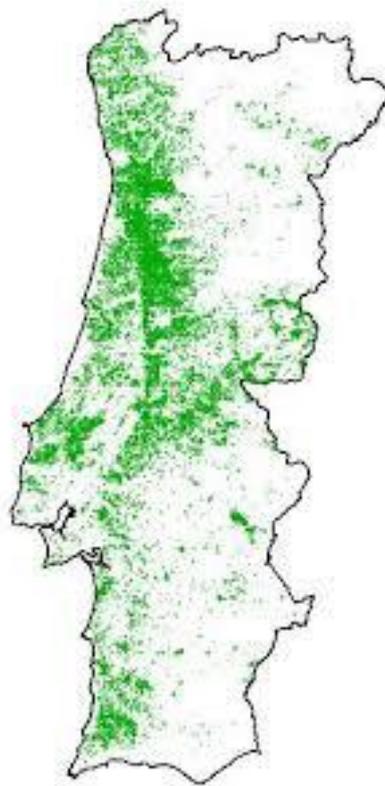


Figura 2 - Distribuição geográfica do *Eucalyptus globulus* em Portugal. Fonte: Celpa (2016) e ICNF (2015).

O crescimento das árvores e a sua produtividade dependem do balanço de carbono existente na planta, ou seja, da diferença entre o que é assimilado pelas plantas (fotossíntese) e o carbono gasto no catabolismo, o que juntamente com os sais minerais e a água, irá constituir a biomassa vegetal. De acordo com alguns estudos, cerca de 95% da biomassa vegetal do eucalipto é resultado direto do processo de fotossíntese realizado pela planta (Silva *et al.*, 2007).

A falta de manta orgânica nas talhadas de eucalipto, em regiões onde o solo tem escassez de água, faz com que o solo seja mais compacto quando comparado com outras culturas florestais como os carvalhos e o pinheiro. Além disso, a questão da grande absorção de água por esta espécie, apesar de eficiente, está relacionada com o primeiro conflito social e ecológico em relação ao cultivo do eucalipto. Alguns agricultores, nos anos 30 do século XX, queixaram-se do decréscimo da produção de suas culturas que ficavam próximas às plantações da espécie, pela disputa de água entre as plantas agricultáveis e o eucalipto (Pereira, 2007). Noutros casos, em áreas não adequadas para a plantação resultou na secagem das fontes de abastecimento público, como foi o caso da Serra D'Ossa, no Alto Alentejo (Silva *et al.*, 2007).

Segundo Soares *et.al.*, (2007), a expansão do cultivo do eucalipto em Portugal, desenvolveu-se numa época em que na sociedade portuguesa, crescentemente urbanizada, tinham cada vez maior relevância as atitudes ecológicas e a conservação da biodiversidade. Foi neste contexto, em que os valores de produtividade florestal se foram confrontando com um imaginário de defesa do ambiente, que surgiu a contestação ambiental ao cultivo desta espécie que podemos observar ainda hoje. No entanto, o eucalipto tem também um papel importante na conservação da biodiversidade.

É consensual que os eucaliptais podem tornar-se *habitats* mais favoráveis se geridos de forma apropriada (CELPA, 2016), e numa ótica de gestão florestal sustentável, que compatibilize a produtividade florestal com a preservação dos valores naturais e a biodiversidade, deve ser promovida ao nível da paisagem.

#### **1.4 Distribuição geográfica**

As árvores do género *Eucalyptus* dominam a maior parte das florestas e bosques da Oceania (Kirkpatrick, 1975). A área de dispersão natural inclui populações ao longo da costa sul e oeste da ilha da Tasmânia, ilhas do estreito de Bass (ilhas King, Flinders e Cape Barren) e duas regiões do estado de Vitória (na Austrália Continental), designadamente em Otways, a oeste, e South Gippsland a sudeste do estado (Soares *et al.*, 2007). O *E. globulus*, pertence a um grupo de quatro subespécies muito aparentados entre si: *globulus*, a *maidenii*, a *pseudoglobulus* e a *bicostata*. Estas quatro subespécies têm uma distribuição natural muito maior chegando mesmo ao interior norte e nordeste de Vitória e até parte da região sul da Nova Gales do Sul, como podemos observar na figura 3.

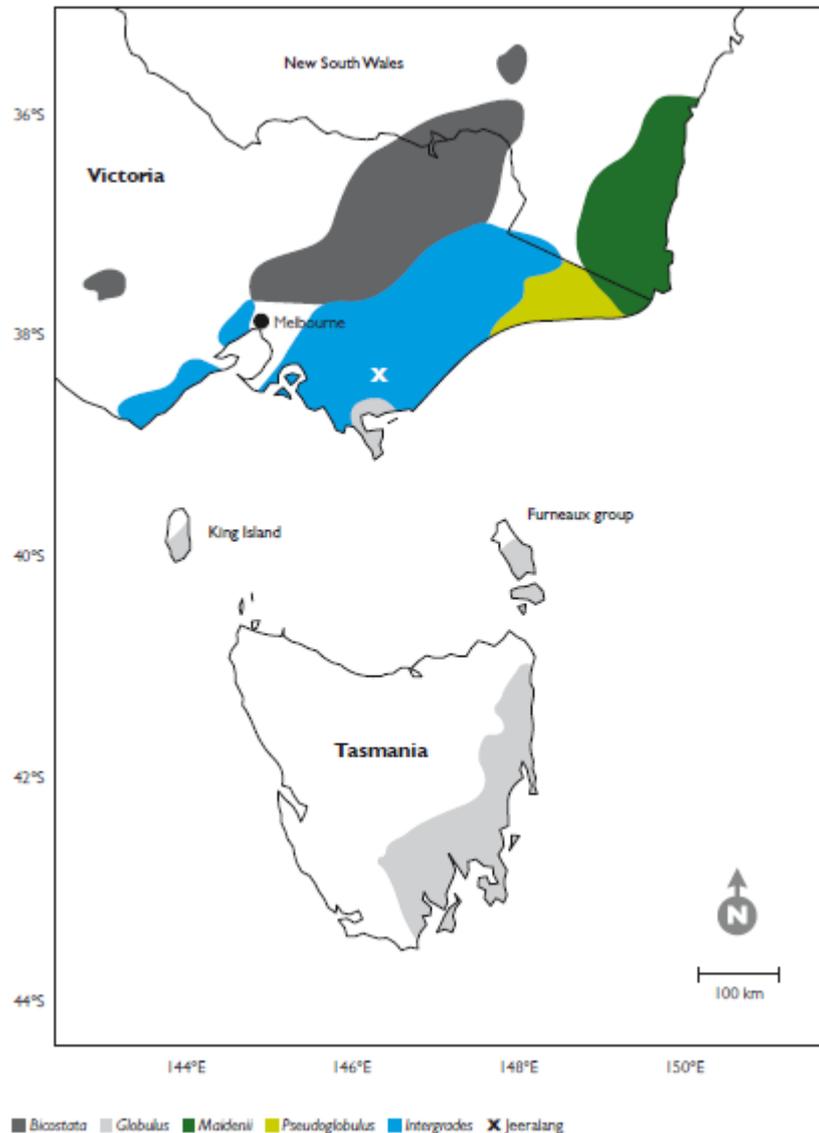


Figura 3 - Distribuição das populações puras e híbridas de *E. globulus*, *E. bicostata*, *E. pseudoglobulus* e *E. maidenii* na Oceania. Fonte: Jordan et al. (1993).

As populações de *E. globulus* consideradas típicas ocorrem a este e sul da Tasmânia, nas ilhas Cape Barren e South Flinders e em algumas manchas no sul de Gippsland (em Vitória). No entanto, em vários pontos da distribuição das quatro espécies, ocorrem áreas de contacto onde as populações mostram características intermédias (Figura 3). Esta situação dificulta a separação óbvia entre os quatro *taxa* e complica consideravelmente a decisão sobre qual a população base de *E. globulus* que deve ser considerada para programas de melhoramento, por exemplo. Apesar da complexidade que esta situação aparenta, tem-se hoje uma ideia relativamente bem consolidada da filogenia da espécie *E. globulus* e da sua relação com as espécies *E. maidenii*, *E. bicostata* e *E. pseudoglobulus* (Soares et al., 2007).

## 1.5 Melhoramento genético do eucalipto

É importante compreender a estrutura genética das populações naturais de eucalipto porque só assim podemos entender quais os recursos genéticos disponíveis na natureza, numa fase inicial de constituição de um programa de melhoramento. A longo prazo, o conhecimento da variabilidade genética permite que se constitua uma população com uma base genética suficientemente ampla e bem adaptada, evitando-se uma consanguinidade excessiva que comprometa o ganho nas gerações futuras (Soares *et al.*, 2007).

Os programas de melhoramento em Portugal pelas empresas, Portucel, Soporcel e Caima, tiveram início a partir dos anos 80 e 90 com esquemas de seleção e instalação de pomares (Soares *et al.*, 2007). O investimento nestes programas de melhoramento teve como principal objetivo a produção industrial de pasta de papel. Com o objetivo traçado, recursos humanos e financiamento apropriado, foi possível o progresso destes programas por mais de quatro décadas tornando Portugal um dos países do mundo em que o melhoramento de *E. globulus* se encontra mais avançado (Soares *et al.*, 2007).

A produtividade vegetal, tão importante para a indústria da pasta do papel, é um parâmetro complexo, condicionado por eventos acumulados ao longo da ontogenia da árvore e depende quer da eficiência de produção em períodos de abundância de recursos, quer de tolerância (e sobrevivência) a períodos de stresse abiótico e/ou biótico. Por isso, dados como a altura, diâmetro ou volume individual têm uma elevada variabilidade, mesmo num ensaio experimental. Esta enorme variabilidade depende das condições locais, qualidade do delineamento experimental, qualidade da instalação, condução do povoamento e competição entre árvores. Foi previsto em estudos anteriores taxas anuais teóricas de melhoramento para crescimento na ordem dos 2,3 a 2,5% em programas de melhoramento em Portugal, uma estimativa que encaixa bem nos ganhos reportados pelo programa RAIZ desde 1995 (de 2,5% ao ano em volume) e pela Celbi (60% após duas gerações de melhoramento) (Soares *et al.*, 2007).

Um elemento chave no delineamento dos programas de melhoramento é a importância da interação que existe entre genótipo e ambiente, ou por outras palavras de que modo o comportamento de um genótipo (relativamente aos restantes) sofre alterações em função do ambiente em que se encontra, com especial destaque para o solo e o clima, mas também relativamente à silvicultura e à competição. No nosso país este assunto tem um peso importante uma vez que a área abrangida pelas plantações de eucalipto é muito vasta e diversificada, quer do ponto de vista climático, quer no que diz respeito às propriedades físicas e químicas do solo.

Há que referir também a importância dos trabalhos de genética molecular e genómica desenvolvidos no âmbito dos programas de melhoramento em Portugal. A utilização direta destas tecnologias tem tido grande expressão assim como a biotecnologia aplicada ao eucalipto. As primeiras áreas de pesquisa em biotecnologia incluíram a regeneração de material por micropropagação, através da utilização de proliferação de meristemas, embriogénese e organogénese (Pinto *et al.*, 2016). Estes trabalhos foram motivados pela necessidade de desenvolver processos de propagação vegetativa que ultrapassem as limitações do fraco enraizamento e os custos elevados de clonagem associados ao *E. globulus*. Com a descoberta de novas técnicas de genética molecular (sobretudo durante os anos 90) procurou-se desenvolver protocolos para seleção assistida por marcadores moleculares, dentro de famílias de *pedigree* conhecido e, através da genómica, identificar genes de interesse de modo a proceder à seleção de haplótipos desejáveis ou eventualmente à sua transformação (Myburg *et al.*, 2007).

## 1.6 Reprodução das plantas

A propagação vegetativa é uma técnica amplamente usada em programas de melhoramento de árvores para gerir eficientemente as populações e aumentar o número de plantas disponíveis mais rapidamente do que é possível com os procedimentos convencionais de propagação através de sementes (Mullin e Park, 1994).

Existe um leque alargado de técnicas que permite a multiplicação de plantas para os mais diversos fins. Devido à sua natureza, estes métodos podem ser divididos em dois grupos principais, os métodos de propagação sexuada e os de propagação assexuada, e devem ser escolhidos de acordo com o objetivo pretendido. Na propagação sexuada, surgem novas plantas após a fusão dos gâmetas parentais e desenvolvem a partir de embriões zigóticos contidos em sementes ou frutos, sendo que na maioria dos casos, as plântulas serão variáveis e cada uma representará uma nova combinação de genes, formada durante o desenvolvimento dos gâmetas (meiose) e durante a fusão (George *et al.*, 2008). O método de propagação assexuada não envolve a fusão de gâmetas, nem depende da meiose, pelo que, as novas plantas daí originadas são geneticamente idênticas à planta inicial. No entanto, podem ocorrer variações fenotípicas entre os rebentos de um mesmo clone. Estas variações são provavelmente causadas por fatores ambientais ou devido à morfologia dos clones, isto é, tamanho da estaca, altura em que as estacas foram recolhidas e as condições em viveiro relacionadas ao vigor do propágulo ou a qualidade do sistema radicular (Higashi e Silveira, 2000).

A técnica de propagação assexuada mais simples e de baixo custo para a obtenção de clones de espécies florestais tem sido o enraizamento de estacas. É um processo de propagação vegetativa que consiste em colocar um segmento caulinar ou foliar em meio adequado para o enraizamento e desenvolvimento da parte aérea e da raiz, de maneira a que se forme um novo rebento (Almeida e Xavier, 2007; Dias *et al.*, 2007). No entanto, várias espécies apresentam taxas de enraizamento muito baixas, com índices inferiores aos desejados (Borges, 2009), sendo necessário a utilização de outros métodos de propagação vegetativa.

## 1.7 Micropropagação de plantas

De acordo com Canhoto (2010), a micropropagação é um método cada vez mais utilizado para produção de plantas em larga escala, possibilitando a propagação de espécies difíceis de clonar através de técnicas de propagação mais convencionais, permitindo também entre outras vantagens, assegurar o estado fitossanitário dos propágulos mantidos em condições assépticas.

Esta técnica de propagação, que conheceu uma enorme expansão na segunda metade do século XX, veio melhorar a capacidade de produção de novas plantas, tanto pela qualidade como quantidade do material obtido. A micropropagação tem sido adotada como a principal estratégia de propagação de espécies, cujas características que se pretendem selecionar justifiquem tal investimento (Thorpe, 2007).

Através desta técnica, consegue-se obter um grande número de clones com recurso a meios de cultura que apresentem na sua constituição os elementos necessários de forma a induzir a resposta fisiológica pretendida (Trigiano e Gray, 2004).

Os meios de cultura utilizados para a cultura de tecidos vegetais fornecem as substâncias essenciais (vitaminas, minerais, açúcares) para o desenvolvimento dos tecidos e condições ideais de pH e esterilidade consoante as necessidades da espécie, entre outras (Canhoto, 2010). No entanto, são as hormonas, ou os reguladores de crescimento, adicionadas ao meio que têm um papel determinante na manipulação do desenvolvimento dos tecidos mantidos *in vitro*. Embora algumas hormonas não existam nos tecidos vegetais provocam, quando aplicados nas plantas, respostas análogas às induzidas pelas hormonas sendo as mais importantes as auxinas, citocininas e giberelinas (Canhoto, 2010).

O sucesso deste processo depende em grande parte da fase inicial de estabelecimento *in vitro*. Isto porque as etapas posteriores de multiplicação e aclimação das plantas *ex vitro* só são realizadas se as culturas apresentarem bom vigor vegetativo e forem mantidas em condições assépticas.

As técnicas de micropropagação mais usadas na propagação de plantas lenhosas são a embriogénese somática, a organogénese e a proliferação de rebentos caulinares (Gomes e Canhoto, 2009), podendo estes últimos ser resultantes da cultura de ápices ou de segmentos nodais.

Segundo Canhoto (2010), considera-se que a cultura de meristemas é a técnica mais simples de micropropagação, pois não ocorre uma nova indução meristemas mas apenas o desenvolvimento de meristemas já existentes no explante e o ulterior enraizamento dos rebentos caulinares resultantes.

O potencial da cultura de meristemas é grande tendo em conta que se pode obter um elevado número de plantas num curto espaço de tempo (Chawla, 2009), esta técnica, por sua vez permite também que se produzam novas variedades o que se torna fundamental para o estabelecimento de bancos de germoplasma (Canhoto, 2010).

### **1.7.1 Etapas principais da micropropagação**

Segundo Murashige (1974), estabelecem-se 3 fases diferentes aquando do processo de obtenção de plantas por proliferação de meristemas: 1) estabelecimento *in vitro* dos explantes, 2) multiplicação e 3) enraizamento.

#### **1.7.1.1 Estabelecimento *in vitro***

Numa primeira fase são selecionados os explantes, pois esta seleção está ligada ao eventual sucesso ou não da cultura, em geral, devem ser escolhidos os rebentos indicados conforme as características da espécie a estudar, pois o sucesso será maior e a complexidade dos meios utilizados menores (Canhoto, 2010). Esta etapa envolve todo o processo desde a recolha do material até ao estabelecimento *in vitro*. São aplicados pré-tratamentos ao material tal como sistemas de desinfeção, tratamentos estes que podem provocar a morte do tecido vegetal caso o procedimento seja demasiado nocivo. A desinfeção pode tornar-se também complicada no que se refere a microrganismos endógenos que, muitas vezes, não se manifestam nos estágios iniciais do processo de micropropagação, aparecendo passado algum tempo de cultura (Bunn,

2002). Para evitar a contaminação, os recipientes das culturas *in vitro* devem ser fechados e esterilizados, mas que permitam trocas gasosas com o exterior. É importante ainda trabalhar com instalações próprias e normas de trabalho que promovam a criação de um ambiente externo ao recipiente com total assepsia (Canhoto, 2010). As concentrações das soluções desinfetantes, assim como as combinações dos seus princípios ativos e os tempos de exposição podem influenciar significativamente a percentagem de contaminação, tornando-se necessário o estabelecimento de protocolos diferentes à medida de cada espécie a propagar pois cada espécie requer condições e tratamentos diferentes consoante as necessidades da mesma.

No que se refere ao material com maior potencial para estabelecer *in vitro*, os explantes retirados do ápice encontram-se num estado de desenvolvimento mais jovem comparativamente aos explantes obtidos a partir da base da planta, pois o ápice apresenta maior capacidade de regeneração, superior ao das gemas laterais (Canhoto, 2010).

Uma vez que se reúnam todas as condições desejadas nesta etapa inicial, passa-se para a fase seguinte que é a de multiplicação da cultura para a obtenção da quantidade de propágulos desejados.

### **1.7.1.2 Fase de multiplicação**

Esta fase depende em grande parte da forma como os explantes reagiram à fase de estabelecimento (Canhoto, 2010). O objetivo da fase de multiplicação é essencialmente, obter um elevado número de propágulos, com a mínima variação genética possível, no menor intervalo de tempo e livre de contaminações, tendo em conta fatores importantes para o seu sucesso como a formulação dos meios de cultura e as condições físicas do ambiente de crescimento (Beltrame, 2013).

A composição do meio de cultura utilizado nesta fase também irá variar de acordo com as exigências das plantas quanto aos nutrientes, com algumas modificações para atender às necessidades específicas da espécie, além disso, muitas vezes são utilizadas hormonas de crescimento, para que ocorra uma indução que promova o desenvolvimento dos explantes, sendo a 6-benzilaminopurina (BAP) a mais utilizada em espécies lenhosas (Dutra *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2013).

### 1.7.1.3 Enraizamento

O objetivo desta fase final é enraizar os rebentos produzidos na fase anterior de modo a obter plantas prontas a ser transferidas para um substrato e, depois, para condições de campo. É normalmente nesta fase que se verificam grandes perdas o que causa limitações importantes no sucesso da micropropagação (Canhoto, 2010).

Basicamente o enraizamento pode ocorrer *in vitro* ou *ex vitro* (Fig. 4), sendo que a escolha de um ou outro método irá depender da espécie que está a ser propagada. No enraizamento *in vitro* adiciona-se aos meios de cultura, auxinas, que são reguladores de crescimento que por norma estimulam a produção de raízes, enquanto no *ex vitro* utiliza-se apenas o substrato.

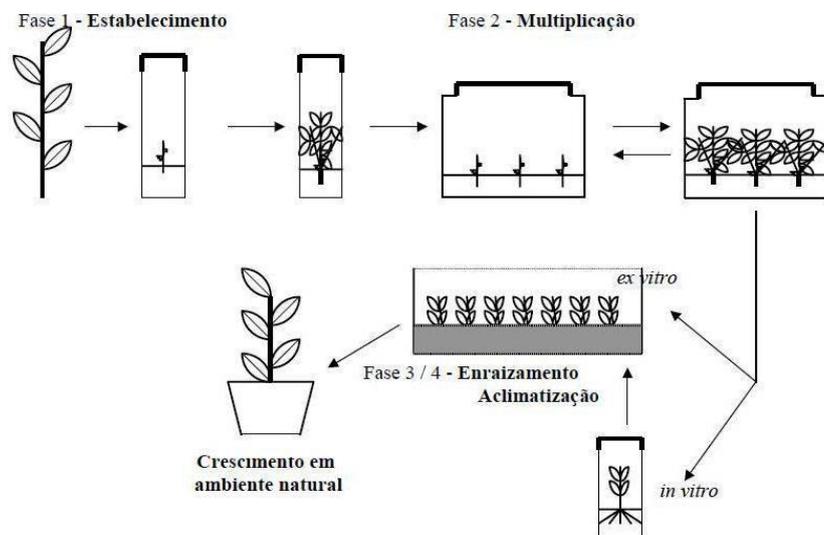


Figura 4 - Diagrama de micropropagação, exemplificando os sistemas de enraizamento, *in vitro* e *ex vitro*. Fonte: Beltrame (2013).

Na utilização das auxinas, há que ter em conta que as concentrações e tempos de utilização variam consoante a espécie utilizada. Pode ocorrer a formação de calos na base dos rebentos caulinares se houver uma exposição muito prolongada desta hormona ou as concentrações forem muito elevadas, só depois

ocorrendo a formação de raízes. Esta circunstância pode levar a uma anomalia na conexão que existe entre o sistema vascular do caule e das raízes, dificultando assim o seu crescimento (Canhoto, 2010).

O processo de enraizamento pode ser dividido em duas fases principais: a fase de iniciação radicular e de expressão e alongamento do primórdio radicular (Canhoto, 2010). Para a maioria das plantas, o procedimento aplicado para a diferenciação da raiz envolve a transferência de rebentos propagados, em meio líquido ou sólido, para um meio de enraizamento que contenha uma auxina, cuja concentração varia de espécie para espécie (McClelland *et al.*, 1990).

Em algumas espécies, como nas herbáceas, o referido processo pode ser facilmente obtido ao transferir os rebentos regenerados *in vitro* para um meio sem reguladores de crescimento (Canhoto, 2010). No entanto, para muitas das espécies lenhosas, como é o caso do eucalipto, o enraizamento pode ser mais problemático, o que acaba por prejudicar a comercialização das mesmas, com impactos económicos consideráveis. O enraizamento de rebentos que resultam da proliferação de gemas axilares é geralmente alcançado após um tratamento com ácido 3-indolbutírico ou uma auxina análoga (Fogaça e Fett-Neto, 2005). Uma origem para as raízes próximas ao sistema vascular é um pré-requisito para o sucesso do enraizamento, pois, nesse caso, as novas raízes podem facilmente estabelecer conexões com o sistema vascular das brotações, promovendo maior sobrevivência e aclimação das plântulas (Pinto *et al.*, 2016). Desta maneira, há que averiguar qual a origem das raízes através de estudos histológicos (Canhoto, 2010).

Após a fase de enraizamento, as plantas são aclimatadas em condições *ex vitro*. É um passo crítico, uma vez que as plantas ficam expostas a condições de stresse que poderão provocar taxas de mortalidade consideráveis (Stevens *et al.*, 2017).

## **1.8 Micropropagação de eucalipto**

A micropropagação de *Eucalyptus spp.* tem tido grande destaque nas últimas duas décadas tendo sido realizados trabalhos importantes para produzir clones em larga escala (Shanthi *et al.*, 2015). A propagação *in vitro* de *Eucalyptus* foi descrita pela primeira vez em 1964, utilizando tecidos de plântulas e, ulteriormente, micropropagação por proliferação axilar de rebentos e embriogénese somática (Le Roux and Van Staden 1991; Pinto *et al.*, 2013). Além da micropropagação em larga escala, a proliferação de rebentos axilares tem sido aplicada em programas que visam: selecionar clones com altos níveis de óleos essenciais,

nomeadamente, cineol em *E. polybractea* (Goodger e Woodrow, 2008), conservar espécies ameaçadas de extinção, como *E. phylacis* (Bunn *et al.*, 2005); criopreservar (Padayachee *et al.*, 2009); propagar híbridos selecionados (Watt, 2014); e até estabelecer “micro-jardins” clonais (Brondani *et al.*, 2012). Em geral, os explantes são cultivados em meios sólidos contendo uma citocinina ou um meio composto por uma auxina e uma citocinina (Pinto *et al.*, 2016).

Apesar dos avanços no sistema de propagação, a recalcitrância ainda é um grande problema no enraizamento adventício para a propagação clonal de muitas espécies de árvores, incluindo algumas espécies de eucalipto (Mendonça *et al.*, 2019). Os principais fatores que limitam a produção de raízes adventícias na propagação clonal de eucalipto são, entre outros fatores, grandes variações na capacidade de enraizamento entre espécies e clones de eucalipto (Mendonça *et al.*, 2019) e o pequeno número de raízes produzidas por cada estaca, o que afeta a simetria do sistema radicular e a estabilidade das árvores (Mokotedi *et al.*, 2009). Mesmo com a utilização de mini-estacas de material jovem, o enraizamento pode não ser o melhor (Mendonça *et al.*, 2019), devido à acumulação de hormonas que podem inibir este processo, o que pode dificultar a formação de raízes.

Um fator conhecido por influenciar o enraizamento é a idade ontogenética do material de origem. É uma característica determinante e muitas vezes limitadora da maturação das plantas lenhosas que pode levar a um acentuado declínio na capacidade de enraizamento (Stevens e Pijut, 2017). Portanto, a capacidade de enraizamento do eucalipto pode variar devido ao estado de maturação ou morfologia relacionada com efeitos posicionais nos rebentos originais e crescimento de estacas (Wendling *et al.*, 2014).

Condições fisiológicas específicas, como teor de hidratos de carbono, azoto, auxinas e compostos fenólicos, são essenciais para o enraizamento adventício (Pandey *et al.*, 2019). Os hidratos de carbono são a fonte de energia para a divisão celular e formação de parede celular, tendo um papel importante também na formação de novos meristemas radiculares (da Costa *et al.*, 2013), e o elevado fornecimento de azoto promove o enraizamento adventício de acordo com alguns estudos realizados (Zerche e Druege, 2009).

No que diz respeito às hormonas, o fornecimento destes compostos deve estar em equilíbrio adequado para o enraizamento adventício. As auxinas endógenas produzidas no ápice do explante e transportadas para a superfície de corte podem ser complementadas com auxinas exógenas, melhorando assim a resposta de enraizamento (Pop *et al.*, 2011).

Outro fator que poderá afetar o desenvolvimento radicular é a presença de barreiras anatómicas, que são modificações das células da epiderme mais grossas e lenhificadas (Mendonça *et al.*, 2019), o que pode reduzir o desenvolvimento dos primórdios radiculares devido à presença de fibras (Mendonça *et al.*, 2019), bloqueando a emergência de novas raízes.

Além disso, o enraizamento adventício depende do genótipo, e difere entre espécies, híbridos e até clones, que podem exigir diferentes condições de cultivo (Mokotedi *et al.*, 2009).

## 1.9 Luz artificial

A iluminação LED (light-emitting diodes) possui uma série de vantagens comparada com a forma mais comum de iluminação. O seu tamanho reduzido, durabilidade, longa duração, temperatura de emissão baixa e a opção de escolher comprimentos de onda conforme a resposta da planta (Massa *et al.*, 2008), tudo isto torna o uso de LEDs uma opção interessante.

Outro dos aspetos deste tipo de iluminação, descrita por Morrow (2008), é o facto de esta iluminação poder ficar próxima dos tecidos das plantas pois possui uma radiação baixa.

Uma característica importante deste tipo de fonte luminosa é o facto de os díodos serem monocromáticos (Pinto, 2008), possibilitando assim escolher o comprimento de onda pretendido para cada planta, coisa que não acontece com lâmpadas fluorescentes e incandescentes que emitem luz num espectro mais amplo, reduzindo a sua eficácia.

Segundo Jeong *et al.*, (2018), vários estudos têm demonstrado o efeito da qualidade da luz na organogénese, embriogénese somática e produção de metabolitos. No entanto, a ação de um espectro específico varia na indução de rebentos, no enraizamento e no conteúdo dos metabolitos da mesma planta.

Alguns estudos em eucalipto têm demonstrado que a radiação pode afetar o enraizamento de diferentes maneiras. Radiações baixas parecem favorecer o enraizamento de rebentos de *E. globulus* em estufas (Wilson, 1998).

A combinação de LEDs azuis/vermelhos parece ser determinante também na redução da contaminação e da oxidação dos explantes (Souza *et al.*, 2018).

Segundo Ruedell *et al.*, (2013 a), a qualidade da radiação tem efeito na taxa de enraizamento para espécies recalcitrantes como o *E. globulus* e pouco efeito em espécies fáceis de enraizar como o *Eucalyptus grandis*.

Os efeitos distintos da luz e da auxina no desenvolvimento de raízes adventícias em *Eucalyptus* podem fornecer um sistema valioso para a caracterização das etapas adjacentes e a regulação da regeneração de raízes. A possibilidade de “desligar” e “ligar” o processo de enraizamento adventício pela manipulação da luz e das hormonas de enraizamento podem fornecer uma ferramenta para examinar o processo de enraizamento a níveis bioquímicos e moleculares em espécies lenhosas (Fett-Neto *et al.*, 2001).

## 1.10 Objetivos

Como referido anteriormente, existe a necessidade de clonar espécies e/ou híbridos de eucalipto para satisfazer a procura do mercado. Apesar do imenso trabalho que existe em volta deste género de plantas, a investigação da melhoria do enraizamento *in vitro* de eucalipto continuam a ser muito limitados.

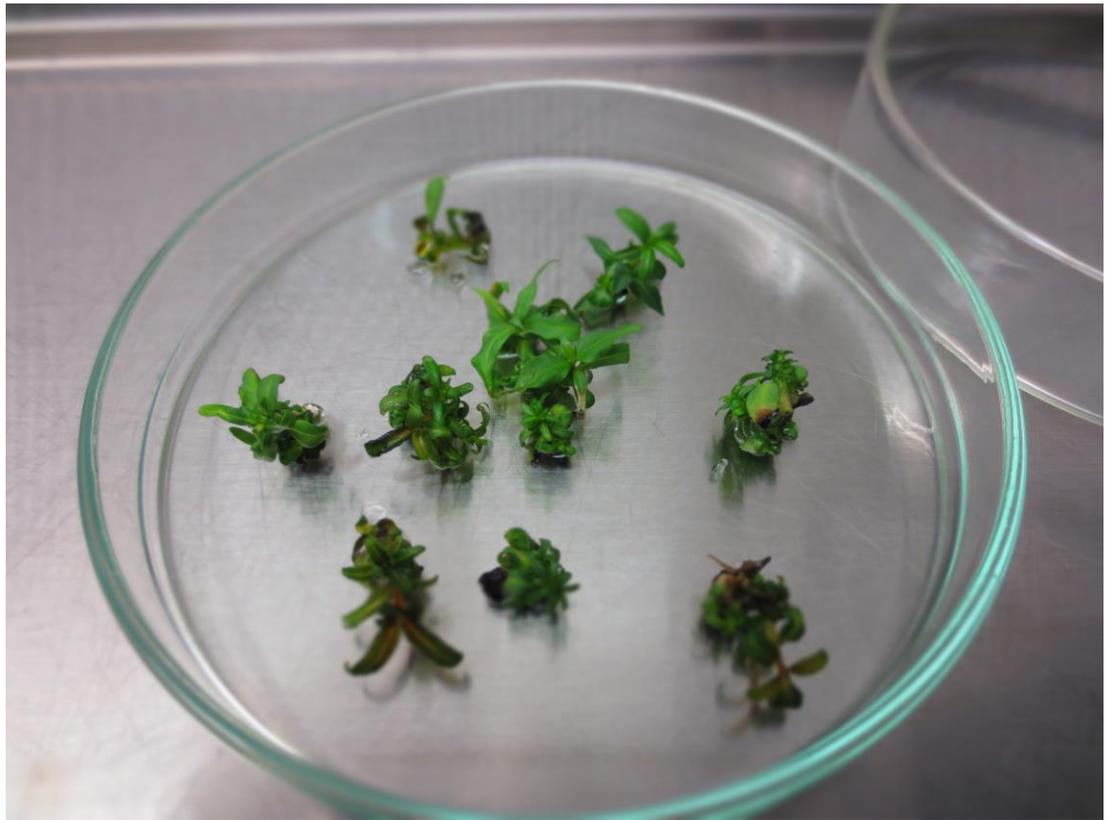
Contudo, a micropropagação *in vitro* revela ser uma mais-valia para as empresas, pois apesar do investimento inicial a nível de equipamento e mão-de-obra qualificada, permite testar um grande número de condições num ambiente controlado.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram micropropagar e avaliar plantas de diferentes genótipos de eucalipto com potencial para enraizamento *in vitro*. Foram avaliadas, em genótipos estabelecidos em meios diferentes e alguns após germinação – as taxas de sobrevivência, enraizamento, número de raízes principais, comprimento da raiz maior e comprimento aéreo da planta, sob diferentes fontes de iluminação. Foram realizados ensaios de enraizamento *in vitro* utilizando para tal iluminação LED e iluminação normal (luz branca) a fim de compreender o efeito que as mesmas poderiam ter nos diferentes parâmetros avaliados.



## 2. Materiais e Métodos

---





## 2.1 Material vegetal

Para a realização do trabalho experimental foi utilizado material vegetal estabelecido em cultura *in vitro* no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra no decorrer desta dissertação. Todo o material vegetal utilizado foi proveniente do RAIZ- Instituto da Floresta e do Papel situado na Herdade da Espirra, em Pegões. As plântulas são referentes a 8 genótipos distintos (Tabela 1): H.197.01; G09; 77000; BAR6; MFR7423 provenientes de plantas adultas e genótipos de *E. nitens* e *E. globulus* provenientes da germinação de sementes. Os genótipos H.197.01; 77000 e MFR723 são provenientes de plantas, tendo sido mantidas em vasos no exterior. Os genótipos G09 e BAR6 foram disponibilizados *in vitro*. As sementes de *E. globulus* e *E. nitens* também foram disponibilizadas pelo RAIZ.

Tabela 1 - Caracterização do material vegetal utilizado nos ensaios.

<b>Genótipo</b>	<b>Clones e Espécie</b>	<b>Origem</b>
<b>H.197.01</b>	<i>E.nitens x E.globulus</i>	Plantas adultas
<b>77000</b>	<i>E.grandis x E.globulus</i>	Plantas adultas
<b>MFR7423</b>	<i>E.urophylla x E.maidenii</i>	Plantas adultas
<b>BAR6</b>	<i>E.viminalis x E.saligna</i>	Plantas adultas
<b>G09</b>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Plantas adultas
<b><i>E. nitens</i></b>	<i>Eucalyptus nitens</i>	Seminal
<b><i>E. globulus</i></b>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Seminal

## 2.2 Iluminação LED

Para a iluminação LED foram utilizados seis módulos (Fig. 5) do modelo Philips GP LED Production DR/B/FR 120 LB (50-400  $\mu\text{mol/s/m}^2$ ) fornecidos pelo RAIZ, iluminação esta que é utilizada para a produção de plantas em larga escala em *vertical farming* e em câmaras de crescimento. São módulos que irradiam muito pouco calor e podem ser colocadas mais perto das culturas, permitindo assim uma maior eficiência sem a necessidade de arrefecimento adicional. Garantem ainda a distribuição uniforme da luz, dando a cada planta a mesma qualidade de iluminação, reduzindo o consumo energético até 60% em comparação com a iluminação fluorescente mais convencional. Os módulos são fáceis de instalar e são impermeáveis. As culturas foram colocadas a uma distância de 70cm da iluminação por ter sido esta a distância recomendada e utilizada pelo RAIZ.



Figura 5 - Módulos LED utilizados para os ensaios de enraizamento.

## 2.3 Avaliação do potencial de micropropagação dos genótipos de eucalipto

### 2.3.1 Germinação de sementes e estabelecimento *in vitro*

Para testar a taxa de germinação das sementes de *E. globulus* e *E. nitens* foram colocadas 40 sementes de cada genótipo a germinar e anotados os resultados após 15 dias de cultura. Previamente à germinação, as sementes de *E. globulus* e de *E. nitens* foram reidratadas durante 24h e sujeitas a três lavagens com água destilada, em seguida foram passadas por uma solução de etanol a 70%, durante 30 segundos. Após esta passagem por etanol foram sujeitas a desinfecção com uma solução de hipoclorito de sódio 2,5% (p/v) e 1 gota de Tween-20, deixando atuar durante 20 minutos com agitação mecânica. Finalmente, após passarem novamente por três lavagens com água destilada esterilizada, as sementes foram colocadas a germinar.

A germinação das sementes foi feita de duas formas distintas:

- Em caixas de Petri com algodão e papel de filtro, previamente humedecidos com água destilada esterilizada (Fig. 6).
- Em tubos de ensaio (15x2,2cm) com 12,5mL/tubo de meio E (*Eucalyptus* modificado) e Fossard (modificado), suplementado com glucose a 1% (p/v). Antes da adição de 8g/L de agar, o pH foi ajustado a 5,8, usando KOH ou HCL e, ulteriormente, os meios foram autoclavados a 121 °C durante 20 minutos.

Nos dois casos, as sementes foram colocadas a germinar no escuro a 25 °C até ao início da germinação, quando era observável a emergência da radícula e do par de cotilédones (aproximadamente duas semanas), e as taxas de germinação foram registadas. Após esta etapa, todas as sementes que germinaram em placa foram transferidas individualmente para tubos de ensaio com 12,5mL/tubo de meio E modificado (para o caso das sementes de *E. nitens*) e meio Fossard modificado (para o caso das sementes de *E. globulus*) suplementados com glucose e 0,25 mg/L BA (6-benzilaminopurina) e o pH ajustado a 5,8. As plântulas provenientes destas sementes foram colocadas a crescer em câmara de crescimento a 23 °C, com um fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro.

A taxa de germinação das sementes de *E. globulus* e *E. nitens* foi calculada através da seguinte equação:

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de sementes germinadas}}{\text{Total das sementes}} * 100\%$$

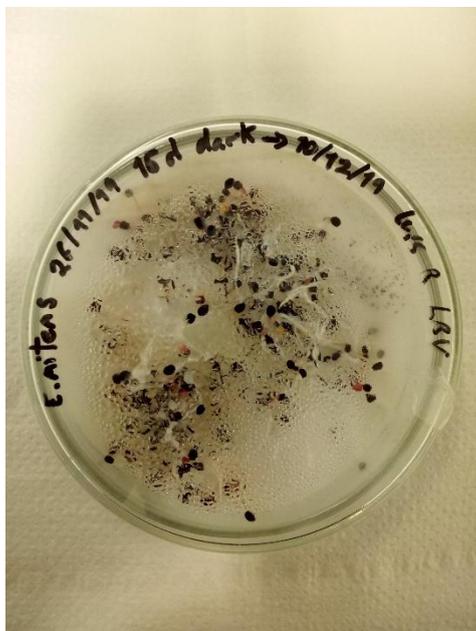


Figura 6 - Germinação de semente de *E. nitens* em caixa de Petri, no escuro, após 15 dias de cultura.

### 2.3.2 Estabelecimento *in vitro* e micropropagação

O material vegetal foi recolhido das plantas-mãe (Fig. 7) que se encontravam na estufa do DCV (Departamento de Ciências da Vida), tendo sido obtidos explantes com cerca de 3 cm de comprimento (foram selecionados ápices e segmentos nodais menos lenhificados, de preferência ápice e nó do primeiro par de folhas) que foram transferidos para o laboratório para tratamento ulterior.



Figura 7 - Plantas-mãe (35 plantas) dos diferentes genótipos utilizados nos ensaios.

Procedeu-se à remoção das folhas e os explantes foram recolhidos para um frasco com água destilada onde foram agitados manualmente durante 3 lavagens. Depois de lavados, ficaram em agitação mecânica numa solução de lixívia comercial 10% (p/v) e água destilada durante 15 minutos (Fig. 8). Os explantes foram novamente lavados, com água esterilizada, numa câmara de fluxo laminar. Numa caixa de Petri foram removidos os tecidos oxidados durante o processo, nomeadamente a base do ápice ou do nó que fica em contacto com o meio de cultura (Fig. 8). Foi colocado um explante por tubo de ensaio com meio de cultura de multiplicação, com repicagem semanal inicialmente devido à oxidação dos explantes e do meio de cultura (escurecimento da zona basal do explante e escurecimento do meio de cultura na proximidade do explante), após esta fase inicial a repicagem foi menos frequente.

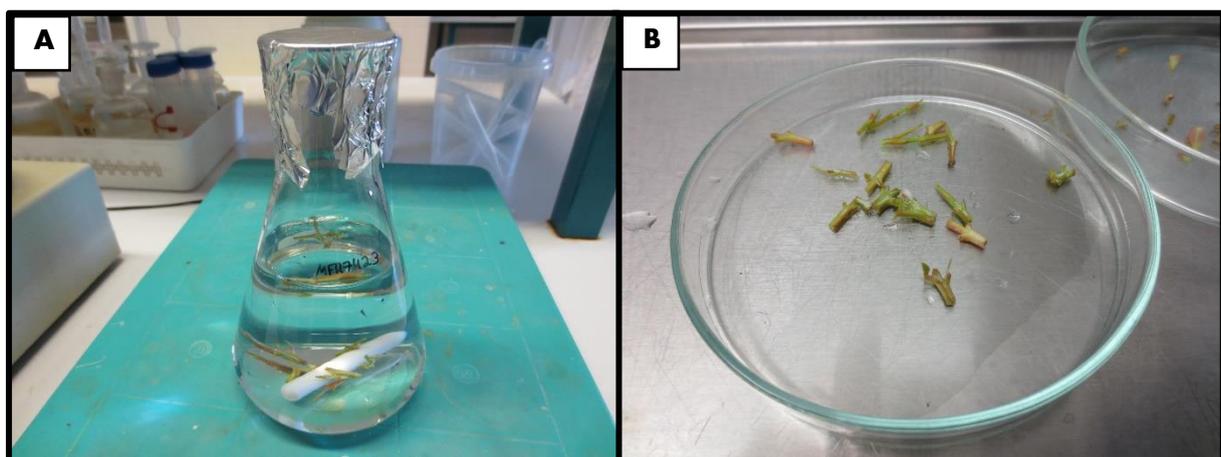


Figura 8 - Processo de esterilização dos explantes de eucalipto para o estabelecimento *in vitro*. A) Explantes pertencentes ao genótipo *E. urophylla* x *E. maidenii* (MFR7423) desinfectados com lixívia comercial a 10%; B) Explantes do genótipo *E. urophylla* x *E. maidenii* (MFR7423) em caixa de Petri já com os tecidos oxidados removidos.

### 2.3.3 Multiplicação

Após a fase de estabelecimento os explantes começam a formar um grupo de pequenos rebentos, sendo que se podem subdividir em aglomerados mais pequenos. Mais uma vez, durante a repicagem, os tecidos oxidados foram removidos, bem como rebentos vitrificados ou intumescidos. A repicagem em fase de multiplicação dos rebentos ocorreu de 3 em 3 semanas e foram colocados a crescer num fitoclima à temperatura de 23 °C com um fotoperíodo de 16h/8h. Foram utilizados dois meios de cultura, Fossard (modificado) e *Eucalyptus* (modificado), com composição química estabelecida pelo RAIZ, consoante a resposta preferencial de cada genótipo (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 - Composição química do meio Fossard modificado utilizado para a cultura de tecidos.

<b>Macronutrientes</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>	<b>Micronutrientes</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>
Cloreto cálcio - CaCl <sub>2</sub>	220	Ácido bórico - H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1
Nitrato amónio - NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	800	Sulfato de manganês - MnSO <sub>4</sub>	7,7
Sulfato de magnésio - MgSO <sub>4</sub>	180	Sulfato de zinco - ZnSO <sub>4</sub>	3,3
Nitrato potássio - KNO <sub>3</sub>	1010	Sulfato de cobre - CuSO <sub>4</sub>	0,2
Fosfato monosódico - NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136	Molibdato de sódio - Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,021
Cloreto cálcio - CaCl <sub>2</sub>	220	Cloreto de cobalto - CoCl <sub>2</sub>	0,065
Nitrato amónio - NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	800		
Sulfato de magnésio - MgSO <sub>4</sub>	180		
<b>Fonte de ferro</b>	<b>Concentração (g/L)</b>	<b>Vitaminas</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>

Na <sub>2</sub> EDTA	0,037	Ácido nicotínico	5,0
Sulfato de ferro - FeSO <sub>4</sub>	0,028	Piridoxina.HCl	1,0
		Tiamina.HCl	13,0
		Biotina	0,2
		Ácido ascórbico	1,0
		L-cisteína	1,5
		Glicina	3,8
		Riboflavina	3,0
		Cloreto de Colina	1,4
<b>Outros componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>		
Mio-inositol	0,1		
Glucose	25,0		
Agar	8,0		

Tabela 3 - Composição química do meio *Eucalyptus* modificado utilizado para a cultura de tecidos.

<b>Macronutrientes</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>	<b>Micronutrientes</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>
Cloreto cálcio - CaCl <sub>2</sub>	222	Ácido bórico - H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,0
Nitrato amónio - NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	800	Sulfato de manganês - MnSO <sub>4</sub>	8,5
Sulfato de magnésio - MgSO <sub>4</sub>	370	Sulfato de zinco - ZnSO <sub>4</sub>	6,0
Nitrato potássio - KNO <sub>3</sub>	1011	Sulfato de cobre - CuSO <sub>4</sub>	0,025
Fosfato monossódico - NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	138	Molibdato de sódio - Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,25

Sulfato de sódio – Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	209	Cloreto de cobalto - CoCl <sub>2</sub>	0,025
<b>Fonte de ferro</b>	<b>Concentração (g/L)</b>	<b>Vitaminas</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>
Na <sub>2</sub> EDTA	0,037	Ácido nicotínico	5,0
Sulfato de ferro - FeSO <sub>4</sub>	0,028	Piridoxina.HCl	1,2
		Tiamina.HCl	14,0
		Biotina*	0,24
		Ácido ascórbico	0,18
		L-cisteína*	19,0
		Glicina	3,8
		Riboflavina*	5,8
		Pantotenato de cálcio	0,24
		Cloreto de Colina	1,4
<b>Outros componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>		
Mio-inositol	0,1		
Glucose	25,0		
Agar	8,0		

### 2.3.4 Enraizamento

Para os ensaios de enraizamento foram utilizados os rebentos obtidos por meio de multiplicação com BA, sem necessidade de passar pela fase de alongamento. Foram selecionados para enraizar rebentos pouco alongados e que não apresentavam vitrificação ou intumescimento. Após a transferência para o meio de enraizamento com 3,0 mg/L de ácido 3-indolbutírico (IBA), os explantes foram mantidos no escuro à temperatura de 23 °C durante aproximadamente 10 a 15 dias, sucedendo a incubação a 24,5 °C com um fotoperíodo de 16h de luz e 8h de escuro e uma intensidade luminosa superior à fase de multiplicação.

No final dos ensaios de enraizamento foram avaliados os seguintes parâmetros: taxa sobrevivência, taxa de enraizamento, número de raízes principais, comprimento da raiz maior e comprimento aéreo da planta.

### 2.4 Avaliação dos parâmetros morfológicos

Inicialmente foi avaliado, através da taxa de sobrevivência, qual o meio preferencial de cada genótipo estudado. Para o efeito, para os genótipos que se desconhecia o meio preferencial, foram estabelecidos rebentos em dois meios com composições diferentes e com a utilização de 1 ou 2 reguladores de crescimento (meio Fossard modificado com BA ou BA+IBA e meio *Eucalyptus* com BA ou BA+IBA, perfazendo quatro meios diferentes no total) (Tabela 4). A taxa de sobrevivência foi avaliada ao fim de 3 semanas de estabelecimento e foi determinada, através da seguinte equação:

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de plantas vivas}}{\text{Total de plantas}} * 100\%$$

Tabela 4 - Composição dos meios testados em relação aos reguladores de crescimento.

Meio	Referência	Reguladores de crescimento (mg/L)
FS-BA	Fossard modificado	0,25 BA
FS-BA+IBA	Fossard modificado	0,25 BA+0,1 IBA
Eu-BA	<i>Eucalyptus</i> modificado	0,25 BA
Eu-BA+IBA	<i>Eucalyptus</i> modificado	0,25 BA+0,1 IBA

Para a avaliação do enraizamento dos rebentos, os mesmos foram colocados no mesmo meio de multiplicação mencionado na secção 2.2.3 mas suplementado com 3,0 mg/l de IBA. Foram ainda avaliados os números de raízes principais, o comprimento da raiz maior de cada planta e o comprimento aéreo da planta. Os critérios de contagem foram realizados após as taxas de enraizamento terem sido calculadas com a aplicação da seguinte equação:

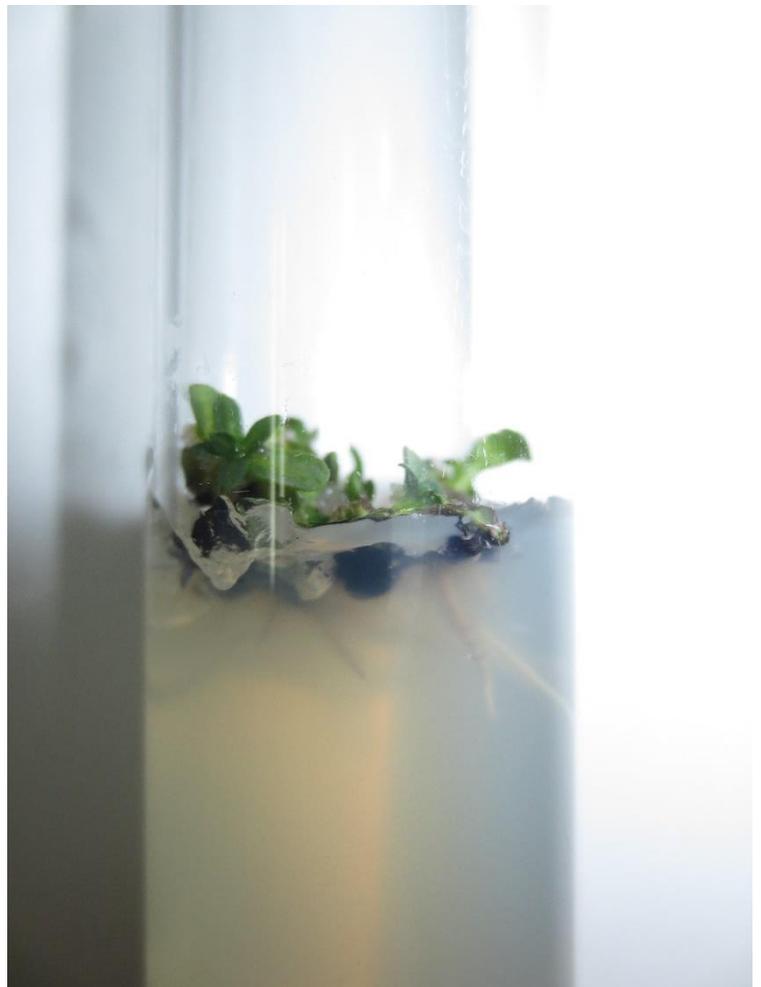
$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ de plantas enraizadas}}{\text{Total de rebentos colocados a enraizar}} * 100\%$$

## **2.5 Análise estatística**

Todos os dados foram registados, e os gráficos foram obtidos com recurso ao software Graphpad Prism 6 e foram aplicados testes ANOVA. Para a comparação de duas médias foi utilizado o teste t de Student.

# 3. Resultados e Discussão

---





### 3.1 Germinação de sementes e estabelecimento *in vitro* de plantas de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens*

Os resultados para a germinação de sementes de *E. globulus* e *E. nitens* proporcionaram resultados bastante diferentes (Tabela 5) com o *E. globulus* a atingir uma taxa de germinação de 95% e o *E. nitens* uma taxa de 44%. Após a germinação, cada plântula foi colocada em tubos de ensaio, isoladamente. Numa fase ulterior, os explantes foram transferidos para meio de multiplicação e mais tarde utilizados para os ensaios de enraizamento.

Tabela 5 - Taxa de germinação das 80 sementes (40 de *Eucalyptus globulus* e 40 de *Eucalyptus nitens*) em tubos de ensaio. Resultados obtidos após 15 dias de cultura.

Espécie	Taxa de germinação (%)
<i>E. globulus</i>	95%
<i>E. nitens</i>	44%

### 3.2 Avaliação das taxas de sobrevivência e enraizamento de plantas de diferentes origens

Com o intuito de avaliar e escolher o meio de cultura preferencial para cada clone estudado, foi calculada a taxa de sobrevivência de explantes dos genótipos H.197.01; 77000 e MFR7423, provenientes de material adulto, ao fim de 3 semanas de estabelecimento. Para os genótipos G09, BAR6, *E. globulus* e *E. nitens* utilizados neste trabalho já se conhecia previamente, através de indicações do RAIZ, qual o meio mais indicado para o seu estabelecimento e cultura. Os explantes destes clones foram micropropagados com relativo sucesso (Figs. 9 e 10) e foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes meios de cultura utilizados para o ensaio. Na figura 9, podemos observar que o meio preferencial para os três genótipos (H.197.01, 77000 e MFR7423) foi o meio *Eucalyptus* modificado suplementado apenas com 0,25 mg/l de BA (Eu-BA), com taxas de sobrevivência  $\geq 90\%$ . Os maiores problemas encontrados foram o considerável número de contaminações por fungos e bactérias e a elevada libertação de fenóis por parte dos explantes, podendo eventualmente levar à oxidação e potenciando a necrose dos tecidos.

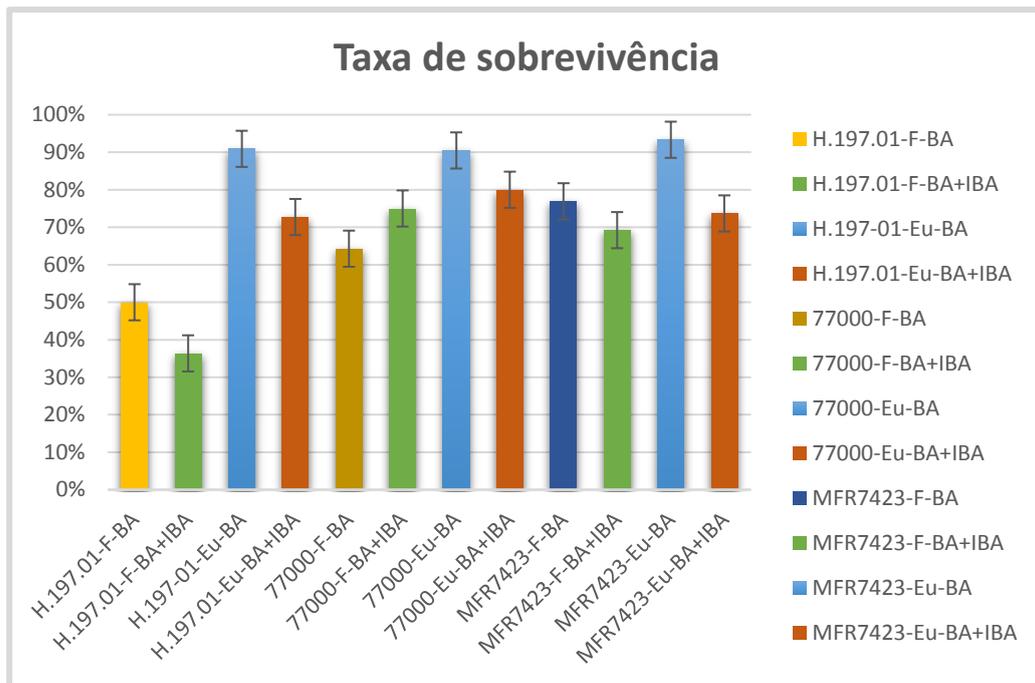


Figura 9 - Taxa de sobrevivência dos genótipos estudados para a escolha do meio de cultura preferencial.

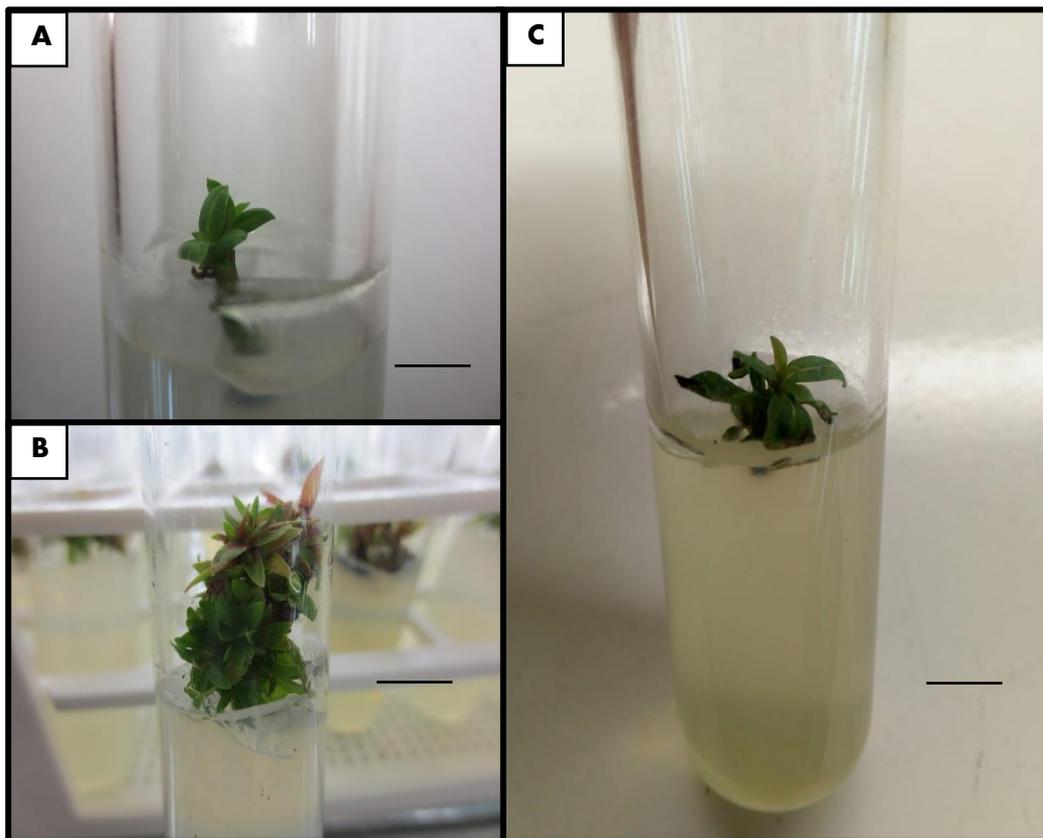


Figura 10 - Aspecto dos explantes em fase de multiplicação de alguns genótipos. A) explante do genótipo *E. grandis* x *E. globulus* (77000) em meio *Eucalyptus*; B) explantes do genótipo *E. viminalis* x *E. saligna* (BAR6) em meio *Eucalyptus*; C) explante do genótipo *E. urophylla* x *E. maidenii* (MFR7423) em meio *Eucalyptus*. As barras correspondem a 1cm.

### 3.2.1 Ensaios de enraizamento

No enraizamento dos rebentos obtidos da proliferação de ápices e meristemas axilares em meio sólido, foram avaliados os parâmetros relativos às partes radiculares e aéreas dos mesmos. A taxa de enraizamento, o número de raízes formadas, o comprimento da raiz maior e o comprimento aéreo de cada explante foram avaliados para cada um dos ensaios propostos. Os ensaios consistiram no seguinte: **A)** indução do enraizamento *in vitro* com 39 plantas do genótipo *E. globulus* (G09), 31 plantas do genótipo *Eucalyptus viminalis* x *Eucalyptus saligna* (BAR6), 12 plantas do genótipo *E. nitens* x *E. globulus* (H.197.01), 8 plantas do genótipo *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus* (77000) e 28 plantas do genótipo *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus maidenii* (MFR7423) em meio de cultura preferencial de cada genótipo suplementado com 3 mg/l de IBA, passando por um período de escuro para enraizar (10-15 dias) e deixadas a crescer sob luz LED durante duas semanas, antes da aplicação dos critérios de contagem; **B)** ensaio de enraizamento em que foram utilizadas 30 plantas de cada genótipo, com os macronutrientes do meio de cultura reduzidos a metade, glucose a 1,5% (p/v) e 1,0 mg/l de IBA e foi feita a separação de 15 plantas que foram mantidas no escuro durante 10 a 15 dias e as outras 15 plantas ficaram sob luz LED. Ao fim de 3 semanas, todas as plantas deste ensaio foram transferidas para meio igual mas sem hormonas de crescimento. As que inicialmente estiveram mantidas sob luz LED continuaram sob a ação desta iluminação e as que estavam no escuro foram transferidas para luz branca e um fotoperíodo de 16h luz/8h escuro durante 2 semanas, sendo a intensidade luminosa de 15-20  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Finalmente foram aplicados os mesmos critérios de contagem (nº de raízes, comprimento da raiz principal e comprimento aéreo).

No ensaio **C)** foi testado o enraizamento *in vitro* de plântulas originadas (material juvenil) de sementes de *E. globulus* (38 plântulas) e *E. nitens* (18 plântulas). Após a germinação no escuro foram eliminadas as radículas e transferidas para o meio de cultura preferencial de cada genótipo (meio Fossard modificado para *E. globulus* e meio *Eucalyptus* modificado para *E. nitens*). Destas plantas, 19 plantas de *E. globulus* e 9 plantas de *E. nitens* foram colocadas a crescer sob luz LED e outras 19 plantas de *E. globulus* e 9 plantas de *E. nitens* sob luz branca. Ao fim de duas semanas foi avaliado o comprimento aéreo das plantas e colocadas em meio de enraizamento no escuro durante 10-15 dias. Ao fim deste período foram transferidas novamente para a iluminação inicial e avaliados os critérios de contagem ao fim de 2 semanas (Figura 11).

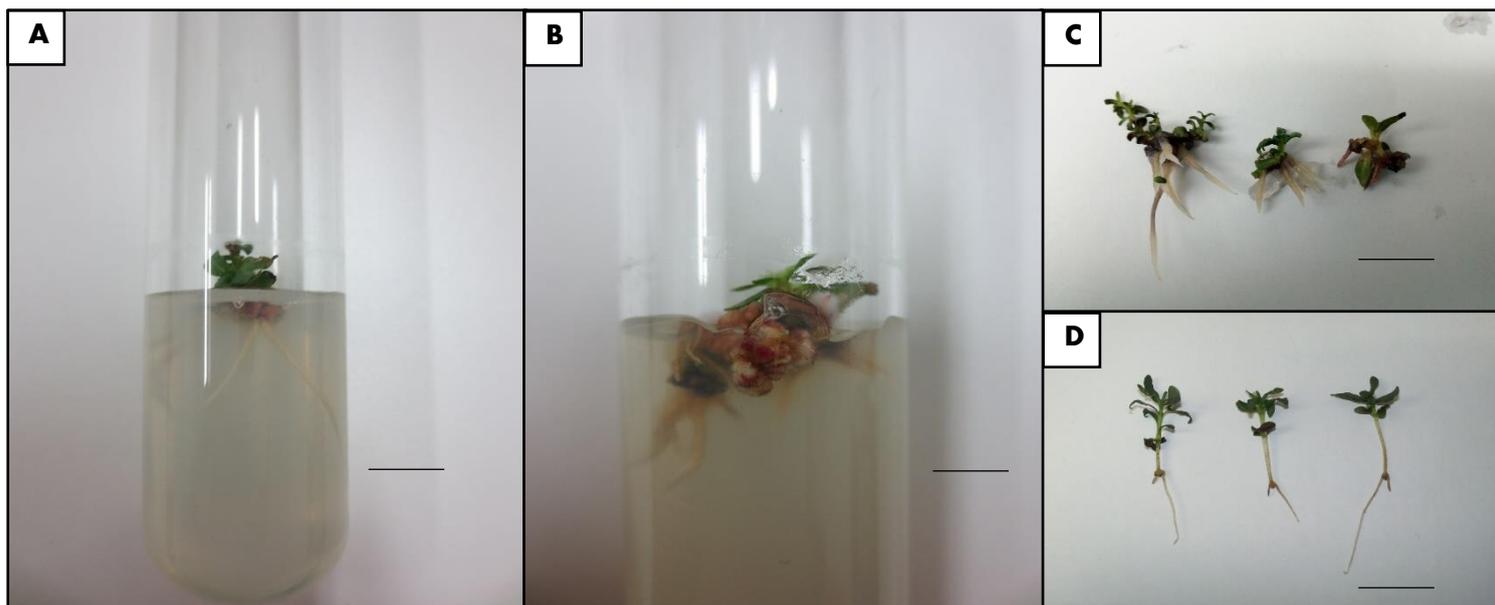


Figura 11 - Aspecto dos explantes onde são visíveis as raízes desenvolvidas após os diferentes ensaios de enraizamento. A) explante enraizado do genótipo *E. urophylla* x *E. maidenii* (MFR7423) em meio *Eucalyptus*; B) explante enraizado do genótipo *E. grandis* x *E. globulus* (77000) em meio *Eucalyptus*; C) explante enraizado do genótipo *E. nitens* em meio *Eucalyptus*; D) explante enraizado do genótipo *E. globulus* em meio Fossard. As barras correspondem a 1cm.

A taxa de enraizamento dos genótipos híbridos estudados para o ensaio A não foi elevada, sendo o genótipo *E. globulus* (G09) o que apresentou uma taxa mais elevada, atingindo os 62% para o meio Fossard modificado utilizado para este genótipo. O genótipo *E. grandis* x *E. globulus* (77000) registou a maior média de número de raízes formadas ( $3,2 \pm 1,31$ ) (Tabela 6) e a maior média do comprimento da > raiz ( $1,25 \pm 0,40$  cm), embora tenha registado a menor média do comprimento aéreo entre os genótipos avaliados ( $0,37 \pm 0,06$  cm), facto que se observou na Tabela 6 para os restantes genótipos que apresentavam um número médio de raízes maior. De salientar o vigor híbrido dos genótipos *E. nitens* x *E. globulus* (H.197.01) e *E. grandis* x *E. globulus* (77000) que apresentam as melhores médias para os parâmetros avaliados em comparação com o genótipo de *E. globulus* (G09) (Tabela 6, Figs. 12 e 13). Consegue-se também perceber que um maior número de raízes está relacionado com o tamanho da planta que para o caso destes genótipos faz o comprimento aéreo reduzir de tamanho.

Tabela 6 - Taxas de enraizamento e parâmetros avaliados para o ensaio A.

Clone	Meio de cultura	Enraizamento (%)	Nº de raízes	Comprimento da > raiz (cm)	Comprimento aéreo (cm)
G09	F mod	62	1,59±0,29	0,45±0,08	0,34±0,02
BAR6	F mod	29	0,48±0,16	0,14±0,05	0,47±0,02
H.197.01	E mod	50	1,58±0,54	1,02±0,34	0,50±0,03
77000	E mod	53	3,2±1,31	1,25±0,40	0,37±0,06
MFR7423	E mod	44	1,50±0,55	0,81±0,27	0,52±0,03

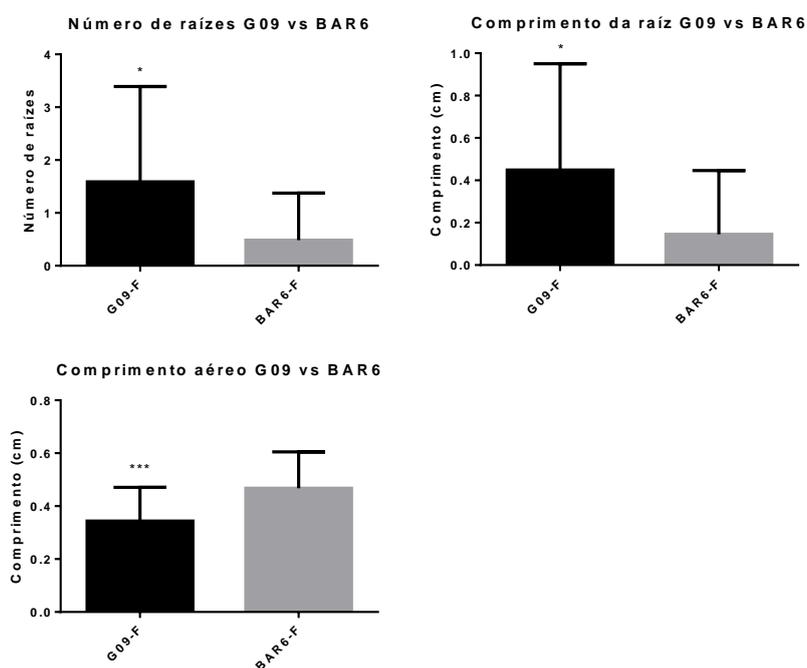


Figura 12 - Comparação dos parâmetros de enraizamento dos genótipos *E. globulus* (G09) e *E. viminalis* x *E. saligna* (BAR6) para o mesmo meio de cultura, relativos ao ensaio A (\*p <0,05, \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001).

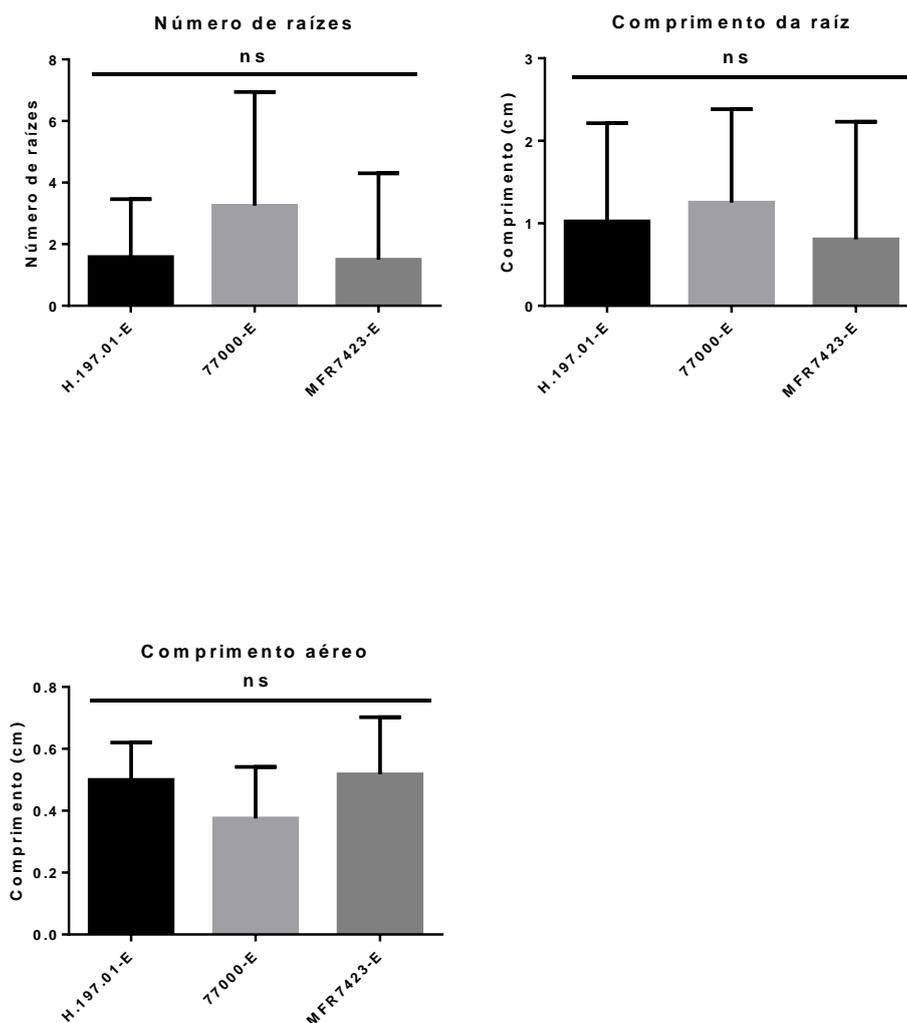


Figura 13 - Teste ANOVA relativo à avaliação dos parâmetros de enraizamento para os genótipos *E. nitens* x *E. globulus* (H.197.01), *E. grandis* x *E. globulus* (77000) e *E. urophylla* x *E. maidenii* (MFR7423) sob o mesmo meio de cultura para o ensaio A (\*p < 0.05, \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Em relação ao ensaio B, onde foram colocadas plantas a enraizar *in vitro* em duas condições de luminosidade distintas, podemos observar pelas tabelas 7 e 8 que um período de escuro em condições de enraizamento é muito importante para obter sucesso na estimulação de raízes adventícias tal como ocorreu com Fett-Neto *et. al* (2001), onde num período de escuro de 4 dias com 10 mg/L de IBA levou a obter taxas de enraizamento muito superiores aos protocolos com concentrações de auxinas inferiores e maior exposição à luz. Não ocorreu o enraizamento em nenhum dos clones colocados sob iluminação LED sem um período de escuro previamente, à exceção dos explantes de *E. globulus*, com uma taxa de enraizamento muito baixa (7%) que pode ter resultado da falta de auxina nas plantas inibindo assim o enraizamento de *E.*

*globulus* (Fett-Neto *et. al*, 2001). Mais uma vez o genótipo *E. nitens* x *E. globulus* (H.197.01) obteve um maior comprimento aéreo em comparação com as espécies que dão origem a este cruzamento (*E. globulus* e *E. nitens*) (Tabela 7).

Tabela 7 - Taxas de enraizamento e parâmetros avaliados para as plantas do ensaio B sob iluminação LED.

Clone	Meio de cultura	Enraizamento (%)	Comprimento aéreo (cm)
E.glo	F mod	7	0,63±0,12
G09	F mod	0	0,52±0,06
BAR6	F mod	0	0,54±0,06
E.nitens	E mod	0	0,69±0,07
H.197.01	E mod	0	0,75±0,05
77000	E mod	0	0,45±0,05
MFR7423	E mod	0	0,68±0,08

No caso das plantas que estiveram 10-15 dias no escuro antes de passarem para luz branca, podemos observar que os genótipos *E. globulus*, *E. nitens*, H.197.01 e MFR7423 apresentam taxas de enraizamento que variam desde os 14% (MFR7423) a 62% (*E. globulus*) (Tabela 8). Estas diferenças sugerem que diferentes genótipos apresentam diferentes capacidades de enraizamento (Tabela 8, Figs. 14 e 15). Para os restantes clones (G09, BAR6 e 77000) não se registou qualquer enraizamento pelo que apenas se avaliou o comprimento aéreo de cada planta (Tabela 8). De salientar nestes resultados que o genótipo H.197.01, que é um híbrido resultante do cruzamento entre um genótipo de *E. nitens* com um genótipo de *E. globulus* apresenta uma taxa de enraizamento muito próxima dos genótipos que dão origem ao seu cruzamento.

Tabela 8 - Taxas de enraizamento e parâmetros avaliados para as plantas do segundo ensaio sob luz branca.

Clone	Meio de cultura	Enraizamento (%)	Nº de raízes	Comprimento da > raiz (cm)	Comprimento aéreo (cm)
E.glo	F mod	62	1,23±0,32	1,17±0,34	0,51±0,08
G09	F mod	0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,63±0,04
BAR6	F mod	0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,85±0,05
E.nitens	E mod	53	1,00±0,32	1,27±0,46	0,69±0,09
H.197.01	E mod	54	1,15±0,35	0,45±0,14	0,44±0,06
77000	E mod	0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,41±0,05
MFR7423	E mod	14	0,14±0,09	0,08±0,07	0,41±0,03

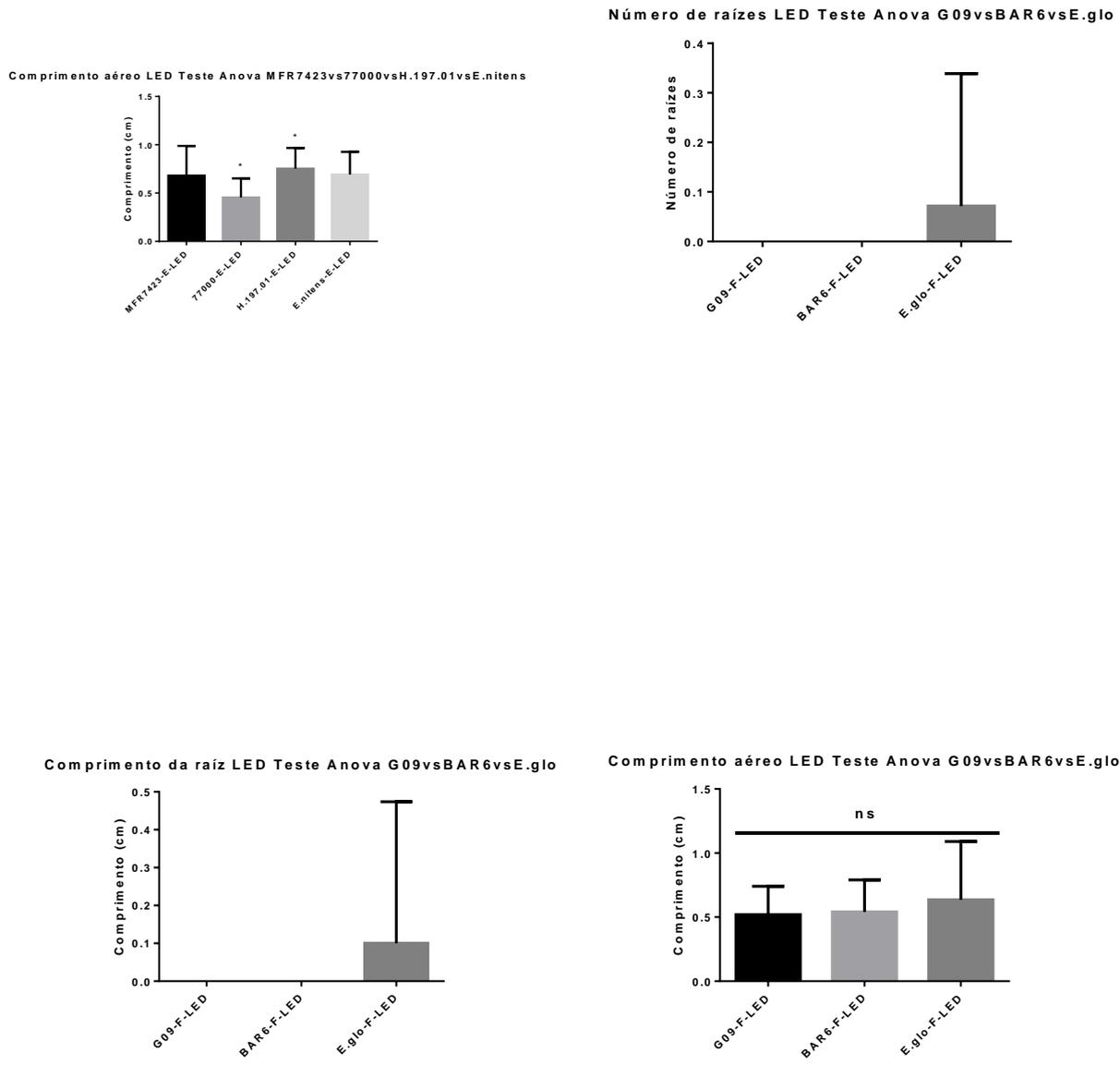
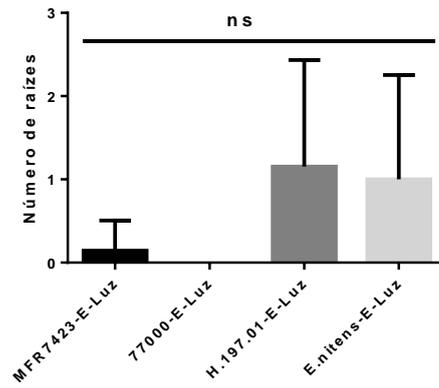
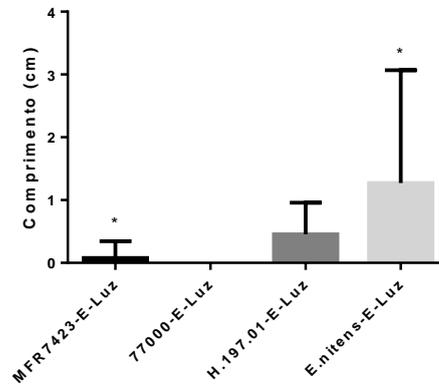


Figura 14 - Teste ANOVA realizado para avaliação dos parâmetros de enraizamento relativos ao ensaio B sob iluminação LED (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001).

Número de raízes Luz normal Teste Anova MFR7423vs77000vsH.197.01vsE.nitens



Comprimento da raiz Luz normal Teste Anova MFR7423vs77000vsH.197.01vsE.nitens



Comprimento aéreo Luz normal Teste Anova MFR7423vs77000vsH.197.01vsE.nitens

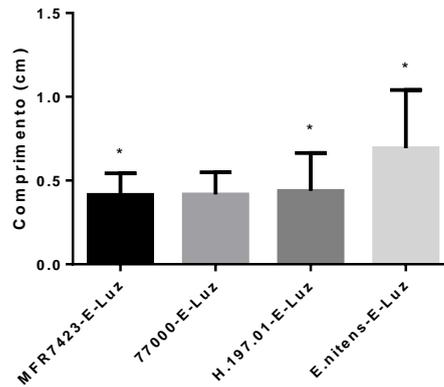


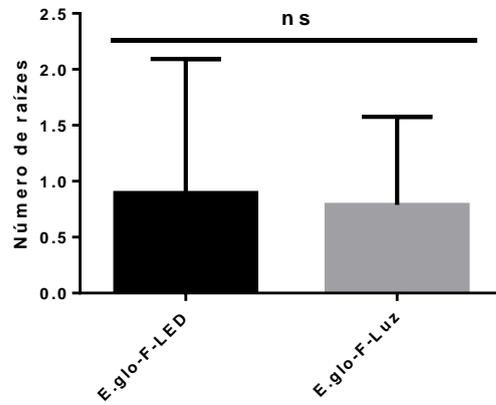
Figura 15 - Teste ANOVA realizado para avaliação dos parâmetros de enraizamento relativos ao ensaio B sob luz branca (\*p <0.05, \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001).

Finalmente, no último ensaio realizado (C), com as mesmas condições que o anterior, foram avaliados os parâmetros já pré-estabelecidos. Para o caso das plantas a crescer sob luz LED podemos observar que as plantas do clone *E. globulus* apresentaram maior taxa de enraizamento (42%), no entanto, as plantas de *E. nitens* apresentaram as melhores médias para os restantes parâmetros (número de raízes, comprimento da > raiz e comprimento aéreo) (Tabela 9). Para as plantas que passaram por um período de escuro e foram colocadas a crescer sob iluminação normal, observamos que apenas *E. globulus* teve sucesso no enraizamento (58%) com um número médio de raízes de  $0,79 \pm 0,18$  (Tabela 9). No entanto, na comparação entre as duas condições de iluminação para cada genótipo não foram encontradas diferenças significativas (Figs. 16 e 17).

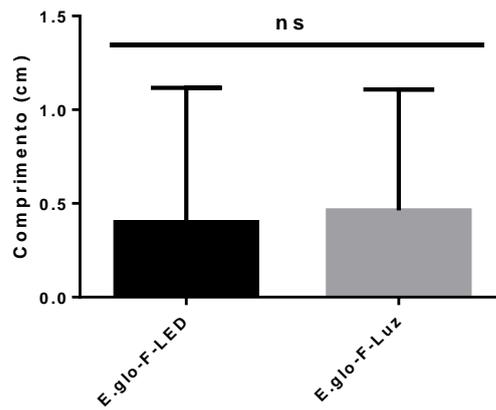
Tabela 9 - Taxas de enraizamento e parâmetros avaliados para as plantas do ensaio C sob iluminação LED e luz branca.

Clone	Meio de cultura	Enraizamento (%)	Nº de raízes	Comprimento da > raiz (cm)	Comprimento aéreo (cm)
E.glo-LED	F mod	42	$0,89 \pm 0,27$	$0,40 \pm 0,16$	$0,50 \pm 0,05$
E.nitens-LED	E mod	22	$0,90 \pm 0,59$	$0,41 \pm 0,30$	$0,71 \pm 0,08$
E. glo-Luz normal	F mod	58	$0,79 \pm 0,18$	$0,46 \pm 0,15$	$0,52 \pm 0,05$
E.nitens-Luz normal	E mod	0	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	$0,50 \pm 0,06$

**Número de raízes E.glo LEDvsLuz normal**



**Comprimento da raiz E.glo LEDvsLuz normal**



**Comprimento aéreo E.glo LEDvsLuz normal**

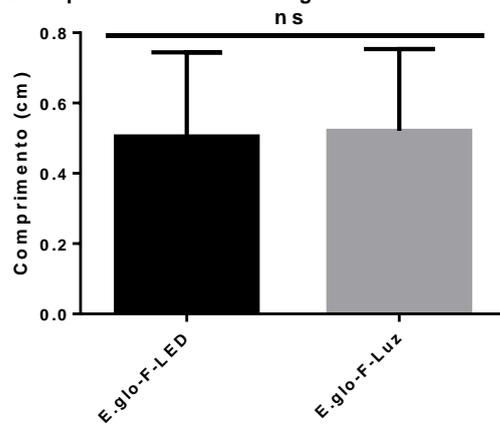
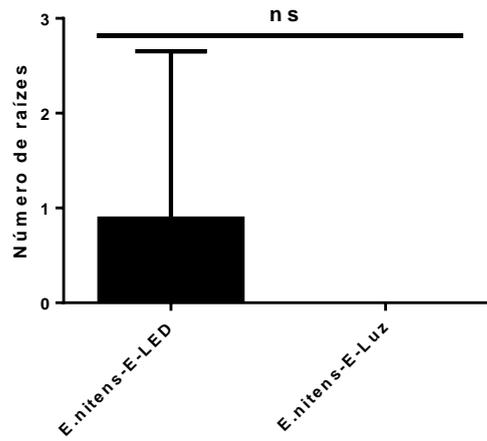
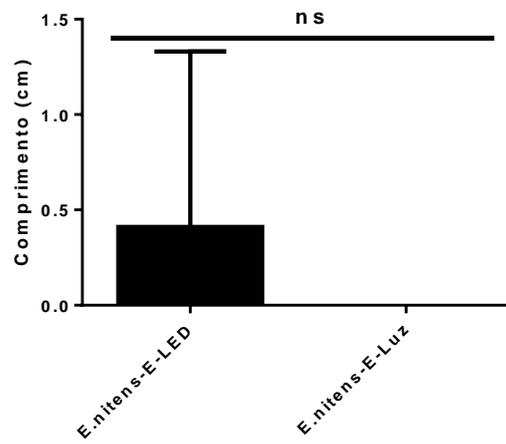


Figura 16 - Avaliação dos parâmetros de enraizamento de *E. globulus* para o ensaio C comparando dois tipos de iluminação (LED e luz normal) (\*p <0,05, \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001).

Número de raízes *E.nitens* LED vs Luz normal



Comprimento da raiz *E.nitens* LED vs Luz normal



Comprimento aéreo *E.nitens* LED vs Luz normal

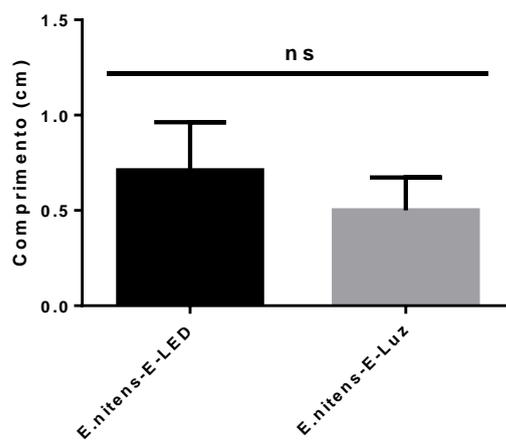


Figura 17 - Avaliação dos parâmetros de enraizamento de *E. nitens* para o ensaio C comparando dois tipos de iluminação (LED e luz normal) (\*p <0.05, \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001).

Uma compreensão detalhada dos fatores que limitam o sucesso do enraizamento adventício pode ser alcançada comparando os parâmetros fisiológicos entre espécies relacionadas ou clones da mesma espécie que apresentem diferentes capacidades de enraizamento. A diferença na capacidade de enraizamento de uma espécie pode estar relacionada com uma diferença no controlo da atividade da auxina (Fett-Neto *et al.*, 2001). Um aumento induzido pela luz na captação de auxina pode explicar os tempos médios de enraizamento mais longos em tratamentos de *E. globulus* suplementados com auxina e cultivados no escuro durante a fase de indução em relação aos rebentos tratados com IBA em luz.

Entre os critérios de enraizamento examinados para avaliar a capacidade de enraizamento do material vegetal, o comprimento da raiz pode parecer o menos relevante do ponto de vista prático. De facto, (Nourissier *et al.*, 2008) observaram que as raízes formadas em condições *in vitro* decompõem-se após transferência para condições *ex vitro*, dando origem a novas raízes, mais funcionais e principalmente decorrentes da parte proximal ou de emergência das raízes formadas *in vitro*. Nesse sentido, o número de raízes adventícias iniciadas *in vitro* pode aumentar a qualidade do sistema radicular desenvolvido após a transferência para condições *ex vitro*.

Uma relação entre a idade da planta dadora, capacidade de enraizamento e concentração de auxina foi observado em *E. globulus* (Aumond *et al.*, 2017).

A exposição a luz vermelho-longo de rebentos de *E. globulus* origina rebentos com competência de enraizamento significativamente melhorada, em comparação com a utilização de luz branca; as interações entre a qualidade da luz, o metabolismo dos hidratos de carbono e das auxinas pode ser parte dos mecanismos que resultam na redução da recalcitrância do enraizamento em eucalipto (Ruedell *et al.*, 2015).



## 4. Conclusão e perspectivas futuras

---





A possibilidade de utilizar técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, de espécies vegetais, tem vindo a revelar-se uma ferramenta muito útil para a compreensão de processos fisiológicos, seleção de génotipos de interesse e propagação de plantas em grande escala.

A contínua valorização do eucalipto como espécie florestal de interesse depende em grande parte do sucesso na sua propagação através de novas técnicas como a micropropagação.

O enraizamento e ulterior aclimatização das plantas são a última etapa da propagação *in vitro* e constituem, na maioria das vezes, um passo problemático que poderá originar consequências económicas consideráveis.

Através dos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que: as respostas aos diferentes meios de cultura foram visivelmente dependentes do génotipo, considerando a necessidade de melhor adaptação às condições *in vitro* ajustando as concentrações salinas de acordo com material genético utilizado; o sucesso na germinação de sementes de *E. globulus* e *E. nitens* corresponde aos resultados já publicados em outros estudos; no enraizamento *in vitro*, um período de escuro após indução definitivamente estimula a formação de raízes; de acordo com os resultados obtidos também a iluminação com luz LED não teve grande influência no enraizamento *in vitro*, pois o acréscimo de luz não afetou significativamente os vários parâmetros vegetativos (taxa de enraizamento, número de raízes, comprimento da raiz maior e comprimento aéreo do explante), sendo que se obteve melhores resultados com iluminação normal. No entanto, não quer dizer que a iluminação LED não tenha efeito no fenótipo e na constituição bioquímica das plantas.

No que diz respeito aos ensaios de enraizamento *in vitro*, considero que devem ser feitos alguns ajustes, nomeadamente testar diferentes variações de pH do meio de cultura, concentração de açúcares e a influência de compostos fenólicos pois na literatura disponível existem já trabalhos que verificaram a influência destes parâmetros no enraizamento *in vitro*.

Com a realização deste trabalho, levantaram-se algumas questões tais como compreender que comprimentos de onda serão mais benéficos para o enraizamento da planta e que influência poderá o meio de cultura utilizado ter no enraizamento, as quais abrem portas a novos trabalhos que visem melhorar o conhecimento da resposta ao enraizamento *in vitro* de eucalipto.

## 5. Referências bibliográficas

---





Alfenas, Acelino e Zauza, E. e Mafia, Reginaldo e Assis, Teotônio. (2009). Clonagem e doenças do eucalipto. 500p.

Almeida, Fernanda Daniele de; Xavier, Aloisio; Dias, José Maria Moreira e Paiva, Haroldo Nogueira. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. Rev. Árvore [online]. 2007, 31, n.3: 455-463

Alves, A. M., Pereira, J. S., Silva, J. M. N. A (2007). A Introdução e a expansão do eucalipto em Portugal. In: Alves, A. M. et.al. (Eds.) O Eucaliptal em Portugal: Impactes Ambientais e Investigação científica. ISA Press, Lisboa, pp.13-24.

Aumond Jr., M. L., de Araujo Jr., A. T., de Oliveira Junkes, C. F., de Almeida, M. R., Matsuura, H. N., de Costa, F., & Fett-Neto, A. G. (2017). Events associated with early age-related decline in adventitious rooting competence of *Eucalyptus globulus* Labill. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1734.

Beltrame, H.S. (2013). Micropropagação de clones híbridos de *Castanea sativa* x *C. crenata* e *C. sativa* x *C. mollissima* para posterior estudos de resistência a *Phytophthora cinamomi*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade de Coimbra. Coimbra, Coimbra, pp.13.

Borges, S. R. (2009). Micropropagacao e enraizamento de miniestacas de clones hibridos de *Eucalyptus globulus*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, pp. 9-12.

Borrvalho, N.M.G.; Almeida, M. H. & Potts, B. M. (2007). O melhoramento do eucalipto em Portugal. In: Monteiro, A.M. (Ed.) O eucaliptal em Portugal: impactes ambientais e investigação científica. ISA Press, Lisboa, pp. 62-110.

Brondani G.E., de Wit Ondas H., Baccarin F.J.B., Gonçalves A.N. e Almeida M. (2012) Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal microgarden. In *Vitro Cellular & Development Biology Plant* 48:478-487.

- Bunn E., Tan B. (2002) Microbial Contaminants in Plant Tissue Culture Propagation. In: Sivasithamparama K., Dixon K.W., Barrett R.L. (eds) Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity. Springer, Dordrecht, pp. 307-335. DOI: 10.1007/0-306-48099-9\_12
- Bunn, E., Senaratna, T., Sivasithamparam, K. e Dixon, K.W. (2005) In vitro propagation of *Eucalyptus phylacis* L. Johnson and K. Hill., a critically endangered relict from Western Australia. In Vitro Cellular & Development Biology Plant 41:812-815
- Canadas, M. J., & Novais, A. (2014). Proprietários florestais, gestão e territórios rurais. *Análise Social*, 49: 346–381.
- Canhoto, J.M. (2010). *Biotecnologia vegetal - da clonagem de plantas à transformação genética*. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, pp. 44-103.
- CELPA. (2016). *A Sustentabilidade das plantações de eucalipto em Portugal*. Brochura de Sustentabilidade, pp. 2-18
- CELPA (2018). *Boletim Estatístico da CELPA*. Associação da Indústria Papeleira, Lisboa, pp. 16-29
- Chawla, H.S. (2009). *Introduction to plant biotechnology*. 3<sup>rd</sup> Edition. Science Publishers, Inc Enfield, NH, USA.
- da Costa, C. T., de Almeida, M. R., Ruedell, C. M., Schwambach, J., Maraschin, F. S. e Fett-Neto, A. G. (2013). When stress and development go hand in hand: Main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science*, 4<sup>th</sup> May, 1–19. DOI: 10.3389/fpls.2013.00133
- Dutra, L. F., Wendling, I. e Brondani, G. E. (2010). A micropropagação de Eucalipto. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 0(58), pp. 49-59. DOI: 10.4336/2009.pfb.58.49
- Estratégia Nacional para Florestas [ENF].(2015). Resolução do Conselho de Ministros n.º 6-B/2015 de 4 de fevereiro. *Diário da República*: I série, nº 2

Evans J. 2009. Planted Forests, Uses Impacts and Sustainability. FAO., 2001. Global Forest Resources Assessment 2000. Main report. FAO Forestry Paper 140. FAO, Rome, Italy. 479p

Fett-Neto, Arthur e Fett, Janette e Goulart, L e Pasquali, Giancarlo e Termignoni, R e Ferreira, Alfredo. (2001). Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. *Tree physiology*. 21: 457-64. 10.1093/treephys/21.7.457.

Fogaça, C.M. e Fett-Neto, A. G. (2005). Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance. *Plant Growth Regulation*, 45: 1-10. DOI: 10.1007/s10725-004-6547-7

George, Edwin F.; Hall, Michael A.; De Klerk, Geert-Jan. *Plant propagation by tissue culture* 3rd Edition. The Netherland, The Back Ground Springer, 2008, pp. 1-22.

Gutierrez-Poch, M. Is There a Southern European Model? Development Of the pulp and paper industry in Italy, Spain And Portugal (1800–2010). In: Lamberg, J.---A., Ojala, J., Peltoniemi, M., Särkkä, T. (Eds.). *The Evolution of global paper industry 1800-2050: A Comparative analysis*. Springer, Dordrecht, Holanda, 2012. pp. 211-242

Pison, G. (2019) "The population of the world (2019)", *Population & Societies*, 2019/8 (No 569), p. 1-8. DOI: 10.3917/popsoc.569.0001.

Gomes, F. e Canhoto, J. M. (2003). Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (shining gum). *In Vitro Cellular & Development Biology Plant*, 39: 316–321.

Gomes, F. e Canhoto, J.M. (2009) Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *In Vitro Cellular & Development Biology Plant*, 45: 72-82.

Goodger, J.Q.D., & Woodrow, I.E. (2008). Selection gains for essential oil traits using micropropagation of *Eucalyptus polybractea*. *Forest Ecology and Management*, 25:3652–3658. DOI: 10.1016/j.foreco.2008.03.006

Higashi, E.N. e Silveira, R.L.V. de A. (2000). Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. Circular Técnica IPEF 192:1–14.

Iglesias-Trabad, G., Carbaeira-Tenreiro, R. e Folgueiia-Lozano J (2009) *Eucalyptus universalis*. Global cultivated eucalypt forest map. Version 1.2 In: GIT Forestry Consulting's Eucalyptologies: Information resources on *Eucalyptus* cultivation worldwide URL: <http://git-forestry-blog.blogspot.com/2008/09/eucalyptus-global-map-2008-cultivated.html>

ICNF (2013). 6ª Revisão do Inventário Florestal Nacional [IFN6] – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental. Resultados preliminares. Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, Lisboa.

Jeong, B.R. (2018). Impact of light quality and sucrose on adventitious shoot regeneration and bioactive compound accumulation in *Ajuga multiflora* Bunge. *Scientia Horticulturae*. 236:222-228. 10.1016/j.scienta.2018.03.056.

Jordan, G.J., Potts, B. M., Kirkpatrick, J.B. e Gardiner, C. (1993). Variation in the *Eucalyptus globulus* complex revisited. *Australian Journal of Botany*, 43: 763-785.

Jürgensen, C., Kollert, W. & Lebedys, A. (2014). Assessment of industrial roundwood production from planted forests. *Planted Forests and Trees Working Paper Series*. Working Paper FP/48/E, (48), 30.

Kirkpatrick, J. B. (1975). Natural distribution of *Eucalyptus globulus* Labill. *Australian Geographer*, 13: 22–35. DOI: 10.1080/00049187508702675

Le Roux, J. J., & Van Staden, J. (1991). Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* - a review. *Tree Physiology*, 9: 435–477. DOI: 10.1093/treephys/9.4.435

Madeira, M., Cortez, N., Azevedo, A., Magalhães, C., Ribeiro, C., & Fabião, A. (2007). As plantações de eucalipto e o solo. *O Eucaliptal Em Portugal: Impactes Ambientais e Investigação Científica*, (June), 138–173. URL: [http://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/1307/1/REP-Fabiao%20A.Madeira\\_et\\_al\\_2007.pdf](http://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/1307/1/REP-Fabiao%20A.Madeira_et_al_2007.pdf)

- McClelland, M.T., Smith, M.A.L. e Carothers, Z.B. (1990). The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23: 115–123. DOI: 10.1007/BF00035831
- Mendonça, E.G., Batista, T.R., Stein, V.C. *et al.* In vitro serial subculture to improve rooting of *Eucalyptus urophylla*. *New Forests* 51, 801–816 (2020). DOI: 10.1007/s11056-019-09761-6
- Mokotedi, M.E.O., Watt, M.P., & Pammenter, N.W. (2009). Analysis of differences in field performance of vegetatively and seed-propagated *Eucalyptus* varieties I: Survival and leaf gas exchange. *Southern Forests* 71: 267–271. DOI: 10.2989/SF.2009.71.4.3.1030
- Mullin, T. J. e Park, Y. S. (1994). Genetic parameters and age-age correlations in a clonally replicated test of black spruce after 10 years. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 2330–2341. DOI: 10.1139/x94-301
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology* 25:135-166.
- Myburg A.A., Potts B.M., Marques C.M.P., Kirst M., Gion J.-M., Grattapaglia D. & J. Grima-Pettenati. 2006. “*Eucalyptus*”. In: Kole C.R., Ed. *Genome Mapping & Molecular Breeding in plants*. Vol. 7: Forest Trees. Springer, Heidelberg, Berlin, New York, Tokyo
- Nourissier, S; Monteuis, O., 2008. In vitro rooting of two *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* mature clones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44.4: 263-272.
- Padayachee, K., Watt, M., Edwards, N. e Mycock, D. (2009) Cryopreservation as a tool for the conservation of *Eucalyptus* genetic variability: concepts and challenges. *Southern For*, 71:165-170.
- Pandey, A., Belwal, T., Tamta, S., Bhatt, I.D., & Rawal, R. S. (2019). Phenolic compounds, antioxidant capacity and antimutagenic activity in different growth stages of in vitro raised plants of *Origanum vulgare* L. *Molecular Biology Reports* 46: 2231–2241. DOI: 10.1007/s11033-019-04678-x
- Pereira, J. S. (2007). Uma espécie altamente produtiva. In: Silva, J.S. (Ed.). *Pinhais e eucaliptais - a floresta cultivada*. Coleção árvores e florestas de Portugal, vol.4. (pp.157-183).

Pereira, J. S. (2014). O futuro da floresta em Portugal. Fundação Francisco Manuel dos Santos, Lisboa.

Pessoa, F., Lidon, F. & Reboredo, F. 2014. Drought Effects on Portuguese Forest Cover – Chapter 3, 367–96 pp. Em Forest Context and Policies in Portugal-Present and Future Challenges. World Forests, Vol. 19. Editado por Reboredo, F. Suíça: Springer International Publishing, 239pp

Pinto, Glória, Araújo, C., Santos, C., & Neves, L. (2013). Plant regeneration by somatic embryogenesis in *Eucalyptus* spp.: Current status and future perspectives. Southern Forests 75, 59–69. DOI: 10.2989/20702620.2013.785115

Pinto, G., (2016). In Vitro Culture of Eucalyptus: where do we stand? In Park Y et al. (Eds.), Vegetative Propagation of Forest Trees. National Institute of Forest Sciences, Korea pp. 507–532.

Poke, F.S., Vaillancourt, R.E., Potts B.M. e Reid, J.B. (2005) Genomic research in *Eucalyptus*. Genetica 125:79-101.

Pop, T.I., Pamfil, D., & Bellini, C. (2011). Auxin control in the formation of adventitious roots. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 39: 307–316. DOI: 10.15835/nbha3916101

Potts, B.M. e Dungey H.S. (2004) Interspecific hybridization of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists. New For. 27:115-138.

Radich, M. C. (1994). Uma exótica em Portugal. Ler História 25: 11-26.

Radich, M. C. & Baptista, F. O. (2005) Floresta e sociedade: um percurso (1875- 2005). Silva Lusitana 13: 143-157.

Ruedell, Carolina e Almeida, Márcia e Schwambach, Joséli e Fronza, Carina e Fett-Neto, Arthur. (2013). Pre and post-severance effects of light quality on carbohydrate dynamics and microcutting adventitious rooting of two *Eucalyptus* species of contrasting recalcitrance. Plant Growth Regulation.

69: 235-245. DOI: 10.1007/s10725-012-9766-3. (a)

Ruedell, Carolina Michels; De Almeida, Márcia Rodrigues; Fett-Neto, Arthur Germano. (2015) Concerted transcription of auxin and carbohydrate homeostasis-related genes underlies improved adventitious rooting of microcuttings derived from far-red treated *Eucalyptus globulus* Labill mother plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 97: 11-19.

Sarmiento, E., V. Dores, and G. Nogueira. 2013. A Competividade e a Diversificação da Fileira Florestal Portuguesa. *Notas Económicas*, pp. 4-5.

Shanthi, K., *et al.* (2015). Micropropagation of *Eucalyptus camaldulensis* for the production of rejuvenated stock plants for microcuttings propagation and genetic fidelity assessment. *New Forests*, 46: 357–371. DOI: 10.1007/s11056-014-9465-1

Silva, J. S., Sequeira, E., Catry, F. & Aguiar, C. (2007). Os contras. In: Silva, J.S. (Eds.). *Pinhais e eucaliptais - a floresta cultivada*. Coleção árvores e florestas de Portugal, vol.4. Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento, Lisboa, pp. 221-259.

Soares, J.; Leal, L., Canaveira, P.; Goes, F. & Fialho, A. (2007). Porquê cultivar o eucalipto?. In: Silva, Joaquim Sande (Eds.). *Pinhais e eucaliptais - a floresta cultivada*. Coleção árvores e florestas de Portugal, vol.4 (pp. 185-219). Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento, Lisboa.

Souza, Denys Matheus Santana Costa *et al.*, 2018. Light Quality in the *in vitro* introduction of *Corymbia* hybrid clones. *Rev. Árvore*. 42, n.6. DOI: 10.1590/1806-90882018000600004

Stevens, M. E., & Pijut, P. M. (2017). Origin of adventitious roots in black walnut (*Juglans nigra*) softwood cuttings rooted under optimized conditions in a fog chamber. *New Forests* 48: 685–697. DOI: 10.1007/s11056-017-9592-6

Thorpe, T.A. (2007). History of plant tissue culture. *Mol. Biotechnol.* 37: 169–180

Trigiano, Robert N.; Gray, Dennis J. (Ed.). *Plant development and biotechnology*. CRC press, 2004.

Wendling, I., Trueman, S.J. e Xavier, A. (2014). Maturation and related aspects in clonal forestry-part II:

Reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. *New Forests*, 45: 473–486. DOI: 10.1007/s11056-014-9415-y

Wilson P.J. (1998) Environmental preferences of *Eucalyptus globulus* stem cuttings in one nursery. *N Zeal J For Sci* 28:304–315

Zerche, S. e Druege, U. (2009). Nitrogen content determines adventitious rooting in *Euphorbia pulcherrima* under adequate light independently of pre-rooting carbohydrate depletion of cuttings. *Scientia Horticultura*, 121: 340–347. DOI: 10.1016/j.scienta.2009.02.012