



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE AGRONOMIA**

SAMUEL GUILHERME DOS SANTOS FAUSTO

**INTRODUÇÃO DE PLANTAS E INDUÇÃO DE CALOS A PARTIR DE
FOLHAS COTILEDONARES DE *Eucalyptus saligna*.**

LARANJEIRAS DO SUL

2021

SAMUEL GUILHERME DOS SANTOS FAUSTO

**INTRODUÇÃO DE PLANTAS E INDUÇÃO DE CALOS A PARTIR DE
FOLHAS COTILEDONARES DE *Eucalyptus saligna*.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia com ênfase em Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Roberson Dibax

LARANJEIRAS DO SUL- PR

2021

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Fausto, Samuel Guilherme dos Santos
INTRODUÇÃO DE PLANTAS E INDUÇÃO DE CALOS A PARTIR DE
FOLHAS COTILEDONARES DE *Eucalyptus saligna* / Samuel
Guilherme dos Santos Fausto. -- 2021.
23 f.

Orientador: Doutor Roberson Dibax

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Agronomia, Laranjeiras do Sul, PR, 2021.

1. Micropropagação de plantas. 2. Reguladores de
crescimento. 3. Calogênese. 4. *Eucalyptus saligna*. 5.
Organogênese indireta. I. Dibax, Roberson, orient. II.
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

SAMUEL GUILHERME DOS SANTOS FAUSTO

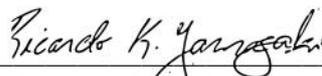
**INTRODUÇÃO DE PLANTAS E INDUÇÃO DE CALOS A PARTIR DE
FOLHAS COTILEDONARES DE *Eucalyptus saligna*.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia com ênfase em Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Este trabalho de conclusão foi defendido e aprovado pela banca em: 14/05/2021.



Prof. Dr. Roberson Dibax- UFFS
Orientador



Prof. Dr. Ricardo Key Yamazaki- UFFS
Avaliador



Eng. Agrônoma Jacqueline Romero Pereira – Mestranda UFPR
Avaliadora

Este trabalho de Conclusão de Curso foi redigido conforme as normas da Revista Brasileira de Agropecuária sustentável que constam no anexo A.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Efeito dos reguladores de crescimento ANA e BAP na calogênese em explantes de *Eucalyptus saligna*.....15
- Figura 2. Efeito dos reguladores de crescimento ANA e BAP na morte de explantes de *Eucalyptus saligna*.....17
- Figura 3 A. Explante do tratamento controle sem a adição de fitorreguladores, sem a formação de calos após 28 dias de cultivo.....18
- Figura 3 B. Explante aos 28 dias de cultivo na ausência de luz com a formação de calos na região do corte das folhas com a adição de ANA e BAP 0,5 mg L⁻¹ e 1 mg L⁻¹ respectivamente, e com coloração branca.....18
- Figura 3 C. Explante com calos bege claro aos 28 dias de cultivo sem a presença de luz, com suplementação de 1 mg L⁻¹ de ANA e 2 mg L⁻¹ de BAP.....18
- Figura 3 D. Explante com calos verde claro e bege escuro aos 56 dias de cultivo com a presença de luz com suplementação de 1 mg L⁻¹ de ANA e 2 mg L⁻¹ de BAP.....18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias de porcentagem na formação de calos nos explantes de *E. saligna* em meio de cultura MS contendo ANA e BAP por 56 dias.....23

Tabela 2. Formação de calos a partir de explantes foliares de *E. saligna* em meio de cultura MS contendo ANA e BAP avaliadas após 28 dias e a porcentagem de explantes mortos ou oxidados após 56 dias.....23

INTRODUÇÃO DE PLANTAS E INDUÇÃO DE CALOS A PARTIR DE FOLHAS COTILEDONARES DE *Eucalyptus saligna*.

O presente estudo teve como objetivo principal, a introdução *in vitro* de plantas de *Eucalyptus saligna* via sementes e posterior indução de calos a partir de explantes cotiledonares cultivados em meio de cultura Murashige e Skoog (MS) contendo diferentes combinações de concentrações de ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (BAP). O melhor resultado para a calogênese foi o tratamento contendo 0,25 e 0,5 mg L⁻¹ de ANA e BAP. Concluiu-se neste trabalho que o protocolo de assepsia foi eficiente bem como a calogênese, porém futuros estudos serão necessários para completar o protocolo de regeneração de plantas a partir da metodologia de formação de calos aqui presente.

Palavras-chave: Organogênese. *In vitro*. Espécies florestais. *Eucalyptus*.

PLANT INTRODUCTION AND CALLUS INDUCTION FROM COTILEDONARY
LEAVES OF *Eucalyptus saligna*.

ABSTRACT

The present study was carried out in vitro plants introduction of *Eucalyptus saligna* from seeds and callus induction from cotyledonary leaves cultured on MS medium containing different combinations of ANA and BAP concentrations. The best result for callogenesis induction was MS medium containing 0,25 and 0,5 mg L⁻¹ ANA and BAP respectively. At conclusion in this research, the asepsis protocol was efficient as well as the callogenesis induction, however future studies will be necessary to complete the plant regeneration protocol using the callus formation methodology presented here.

Key-words: Organogenesis. *In vitro*. Forest species. *Eucalyptus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4. CONCLUSÕES	20
5. REFERÊNCIAS	20
6. ANEXO A	21

1. INTRODUÇÃO

O eucalipto é um dos representantes da família Myrtaceae e este gênero de plantas arbóreas nativas da Austrália e Nova Guiné está representado por cerca de 100 gêneros e cerca de 3000 espécies. Para o cultivo, regiões de clima subtropical e temperado são preferenciais, porém devido a adaptabilidade de espécies, podem ser amplamente cultivados nas condições tropicais do Brasil. A altura das árvores de eucalipto pode variar de 25 a 30 metros e vigorosa ramificação contendo folhas alternas e frutos secos, (JOLY, 1998).

De acordo com o relatório IBA (Indústria Brasileira de Árvores) 2020, o Brasil possuía em 2019 uma área total de árvores plantadas de 9,0 milhões de hectares, deste total as espécies mais cultivadas são de eucalipto com 77% desse total, o que representou 6,97 milhões de hectares, e logo em seguida o pinus com 18% do total e 1,64 milhão de hectares. Ainda segundo a IBA 2020, atualmente o Brasil segue como segundo maior produtor de celulose do mundo, totalizando 19,7 milhões de toneladas fabricadas, sendo 75% destinados à exportação, representando assim uma atividade de grande importância econômica para o país. Ainda de acordo com o IBA espécie *Eucalyptus saligna* é extremamente importante para indústria de base florestal, por sua adaptabilidade já estabelecida no Brasil, permitindo reflorestamentos e utilizações da madeira para os mais diferentes fins.

Com relação ao cultivo *in vitro* desta espécie, poucos trabalhos foram publicados até o presente. Os primeiros registros científicos foram desenvolvidos por Fantini Júnior e Graça (1990) e Le Roux e Van Staden (1991). Nestes dois trabalhos, explantes *in vitro* foram utilizados para a micropropagação, porém, informações relacionadas à organogênese indireta de gemas somente foram publicados em 2010 por Dibax et. al. Estes pesquisadores desenvolveram um protocolo de regeneração de plantas a partir de

explantes foliares, micropropagação e aclimatização de plantas da espécie. Este trabalho também serviu de base para estudos que finalizaram a primeira publicação de um protocolo de transformação genética mediada por *Agrobacterium* para esta espécie.

Diante deste contexto, otimizações nos protocolos de regeneração de plantas via organogênese indireta permitem valiosas informações do comportamento *in vitro* dos genótipos escolhidos para posteriores estudos de melhoramento genético utilizando a biotecnologia de plantas.

O presente estudo teve como objetivo principal, a introdução *in vitro* de plantas de *Eucalyptus saligna* via sementes e posterior indução de calos a partir de explantes cotiledonares cultivados em meio de cultura MS contendo diferentes combinações de concentrações de ANA (ácido naftaleno acético) e BAP (6-benzilaminopurina). Análises morfológicas dos calos induzidos e avaliação da potencialidade organogênica foram desenvolvidos para disponibilizar informações adicionais para o direcionamento da escolha da melhor concentração dos reguladores utilizados nesta etapa do protocolo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento de cultura de tecidos *in vitro* foi conduzido nos laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), localizada no município de Laranjeiras do Sul, durante o período de setembro de 2020 até abril de 2021.

As culturas *in vitro* foram conduzidas em uma estufa incubadora BOD da marca NOVAINSTRUMENTS®, sob luz branca fria, em um fotoperíodo controlado de 16h e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

O meio de cultura base utilizado para os experimentos foi o MS (Murashige & Skoog 1962) com vitaminas e compostos orgânicos do mesmo meio, da marca Caisson®,

7 g L⁻¹ de ágar, 20 g L⁻¹ de sacarose, e pH ajustado à 5,8 e autoclavado durante 20 minutos a 120 °C e 1,5 atm.

De modo que não ocorresse nenhum tipo de contaminação do material vegetal, todas as etapas que exigiam manipulação estéril foram conduzidas em uma capela de fluxo laminar. Os meios de cultura foram vertidos em placas de petri descartáveis de 90x15 mm, lacradas com plástico filme.

A introdução do material vegetal *in vitro*, para dar início foi necessário começar com a obtenção das plantas de *Eucalyptus saligna*, fazendo a germinação das sementes (que foram obtidas por meio do IPEF, Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais) no meio base. Para essa etapa foi realizada a seleção das sementes por tamanho para homogeneizar as amostras, utilizando uma peneira de 1mm de malha.

A desinfestação das sementes foi realizada utilizando um pré-tratamento com Etanol 70% durante 3 min e enxágue triplo com água destilada autoclavada, e posteriormente um tratamento com solução desinfetante com cloro ativo 2% durante 30 min, e novamente enxágue triplo com água destilada autoclavada.

Para a germinação o meio de cultura escolhido foi o meio base MS, as sementes foram semeadas *in vitro* nas placas de petri vertidas com o meio de cultura, de forma que fiquem dispostas por toda a placa e foram incubadas em BOD por 14 dias no escuro, e 14 dias sob fotoperíodo de 16h e temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para a obtenção dos explantes, foram utilizadas folhas cotiledonares de plântulas de 28 dias, foram realizados cortes na base do pecíolo para retirada das folhas das plântulas e cada uma delas foi cortada ao meio. Em seguida, cada explante foi isolado com a face adaxial em contato com o meio de cultura para indução de calos.

Os tratamentos comparados foram os seguintes:

Tratamento 1- tratamento de controle sem fitorreguladores.

Tratamento 2- 0,125 mg L⁻¹ de ANA e 0,25 mg L⁻¹ de BAP.

Tratamento 3- 0,25 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP.

Tratamento 4- 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 1 mg L⁻¹ de BAP.

Tratamento 5- 1 mg L⁻¹ de ANA e 2 mg L⁻¹ de BAP.

Os explantes foram incubados na ausência de luz durante 28 dias, e depois mais 28 dias sob condições de fotoperíodo controlado de 16h e temperatura de 25 ± 2°C.

Para a variável porcentagem de explantes formando calos, a avaliação foi realizada aos 28 dias, e em seguida os explantes foram transferidos para o mesmo meio de cultura respectivo aos tratamentos, após um novo período de 28 dias foram avaliadas visualmente a evolução da formação de calos e a porcentagem de explantes oxidados ou mortos.

Após a confirmação da homogeneidade das variâncias, realizou-se a análise de variância para detectar se havia diferenças significativas entre as médias dos tratamentos ao nível de 1% e 5% de probabilidade. O teste de Tukey ao nível de 0,01% de significância foi utilizado para a comparação das médias dos tratamentos. O programa estatístico utilizado foi o Sisvar®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o resultado da análise de variância (Anova), foi observado uma interação significativa entre as variáveis analisadas (porcentagem de explantes formando calos e porcentagem de explantes mortos após 56 dias de cultivo).

Para a variável porcentagem de explantes formando calos o teste de Tukey ao nível de significância de 0,01% demonstrou diferenças estatísticas entre os tratamentos comparados. No tratamento controle onde não foram utilizados reguladores de crescimento e no tratamento contendo 0,125 mg L⁻¹ de ANA e 0,25 mg L⁻¹ de BAP proporcionaram as porcentagens mais baixas de formação de calos nos explantes, onde foram observadas ausência de formação de calos e 40 % de explantes formando calos, respectivamente. Nos demais tratamentos onde as concentrações de ANA e BAP variaram de 0,25 a 1 mg L⁻¹ e 0,5 a 2 mg L⁻¹ respectivamente, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos e a maior porcentagem de formação de calos nos explantes foi de 84% quando foram utilizadas as concentrações de 1 mg L⁻¹ de ANA e 2 mg L⁻¹ de BAP, conforme apresentado na tabela 2.

Resultados semelhantes foram observados por Oberschelp (2014), onde os melhores resultados na indução de calos, foram obtidos com dosagens de 0,1 mg L⁻¹ de ANA e 0,5 mg L⁻¹ de BAP ou 0,5 mg L⁻¹ de ANA e 0,1 mg L⁻¹ de BAP, o que está de acordo com o presente trabalho atestando que a interação de ANA com BAP é positiva para os explantes.

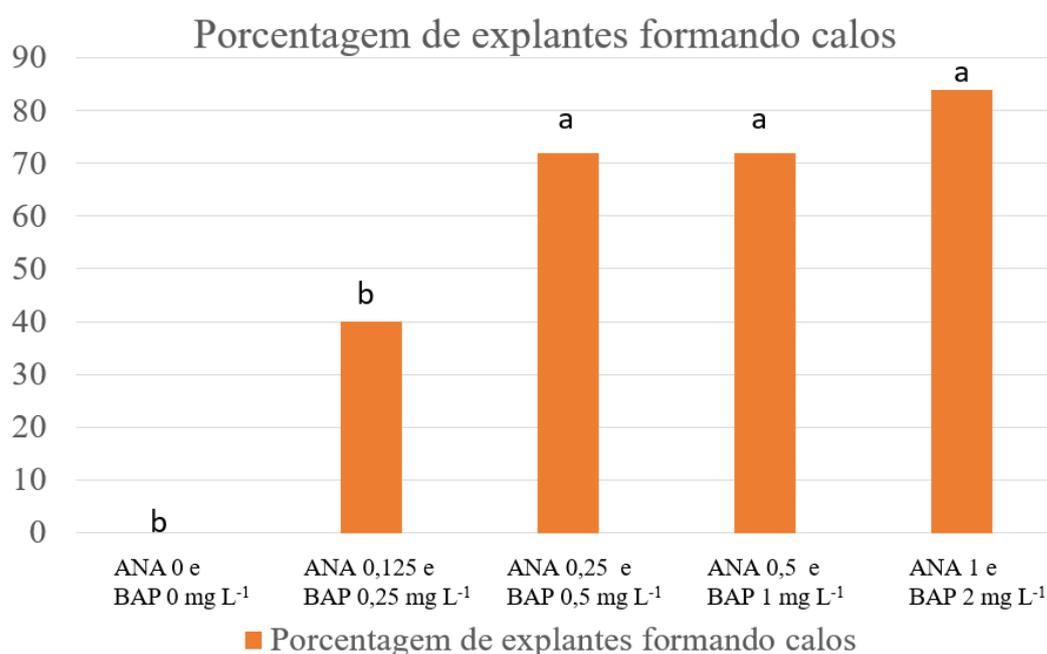


Figura 1. Efeito dos reguladores de crescimento ANA e BAP na calogênese em explantes de *Eucalyptus saligna*, após 56 dias de cultivo em meio MS. Medias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,01% de probabilidade.

A calogênese teve início aos 14 dias após o isolamento dos explantes e aos 28 dias de cultivo foi observado que o local predominante da origem dos calos foi a região do corte das folhas, como observado na figura 1. De acordo com RAVEN et al. (2001), as auxinas e carboidratos apresentam um movimento polarizado e unidirecional no sentido da base das folhas, informação esta que justifica os resultados aqui observados. Ainda com relação a este fato, a polaridade nos explantes tende a direcionar estas substâncias para a região do local do corte, favorecendo desta forma um maior potencial de divisões celulares mitóticas essenciais para a calogênese.

Em relação à textura, foram observados calos friáveis, ou seja, contendo células pouco agregadas, que muitas vezes chegaram a recobrir os explantes. Calos compactos também foram observados, e neste caso foram representados por células fortemente agregadas, as quais formaram estruturas coesas e de diferentes formatos (Figura 3). De uma forma geral foram observados nesta pesquisa, calos friáveis com maior frequência. Quanto a coloração, os calos apresentaram predominância de coloração variando entre branco do bege-claro ao bege-escuro quando cultivados na ausência de luz nos primeiros 28 dias. Após o início do cultivo na presença de luz, colorações avermelhadas e verdes foram então observadas, o que pode ser explicado devido à biossíntese de antocianinas e ativação dos cloroplastos sob efeito da luz.

Em um trabalho com a mesma espécie, Dibax et al. (2010) relataram resultados semelhantes aos aqui apresentados. Estes mesmos autores descrevem que calogênese teve início aos 10 dias de cultivo e durante o período em que os explantes permaneceram no escuro, foi observado que os calos apresentaram coloração branca com aspecto brilhante e, após a transferência para a luz, os calos adquiriam colorações bege-clara, bege-escura

e avermelhadas, estando de acordo com as informações aqui descritas. Estes mesmos autores evidenciaram a organogênese indireta a partir de calos com a coloração verde, porém o meio regeneração foi composto por ANA e TDZ.

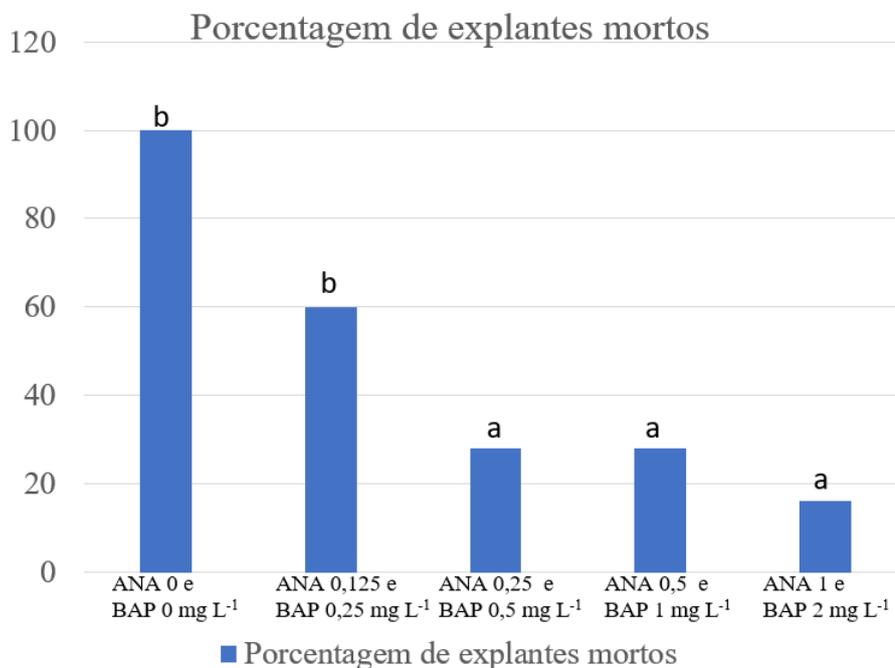


Figura 2. Efeito dos reguladores de crescimento ANA e BAP na morte de explantes de *Eucalyptus saligna*, após 56 dias de cultivo em meio MS. Medias seguidas de mesma letra na coluna não se diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,01% de probabilidade.

Com relação a porcentagem de explantes mortos, o teste de Tukey ao nível de significância de 0,01 % demonstrou diferenças estatísticas entre os tratamentos comparados (figura 2). O tratamento controle onde não foram utilizados reguladores de crescimento proporcionou mortalidade em todos os explantes analisados e no tratamento contendo 0,125 mg L⁻¹ de ANA e 0,25 mg L⁻¹ de BAP foi observado uma porcentagem de 60%, porém estes dois tratamentos não diferiram estatisticamente entre si. Nos demais tratamentos onde as concentrações de ANA e BAP variaram de 0,25 a 1 mg L⁻¹ e 0,5 a 2 mg L⁻¹ respectivamente, não foram observadas diferenças estatísticas entre estes tratamentos e a menor porcentagem de explantes mortos (16%) foi observada no tratamento contendo 1 mg L⁻¹ de ANA e 2 mg L⁻¹ de BAP, conforme apresentado na tabela

2. Resultados semelhantes foram observados para essa mesma espécie quando os explantes foliares foram cultivados em meio MS isento de fitorreguladores durante 60 dias de cultivo, o qual resultou na totalidade dos explantes mortos Dibax et al. (2010).

Para esta mesma variável, Oliveira (2013) descreve resultados semelhantes com relação ao uso de concentrações baixas de fitorreguladores. Neste estudo a autora descreve que organogênese *in vitro* a partir de explantes de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, cultivados meio de cultura JADS, suplementação com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, resultou uma porcentagem de 88% dos explantes mortos em 30 dias de cultivo.

Resultados similares aos aqui presente também foram observados por Oberschelp (2014), no qual estudou a propagação *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* Maiden, em meio de EDM (*Eucalyptus Dunnii* Medium). Nos tratamentos que não receberam suplementação com doses de ANA e BAP foram constatadas elevadas porcentagens de oxidação, também foi constatado que nos tratamentos de maior concentração de ANA também tiveram altos níveis de oxidação.

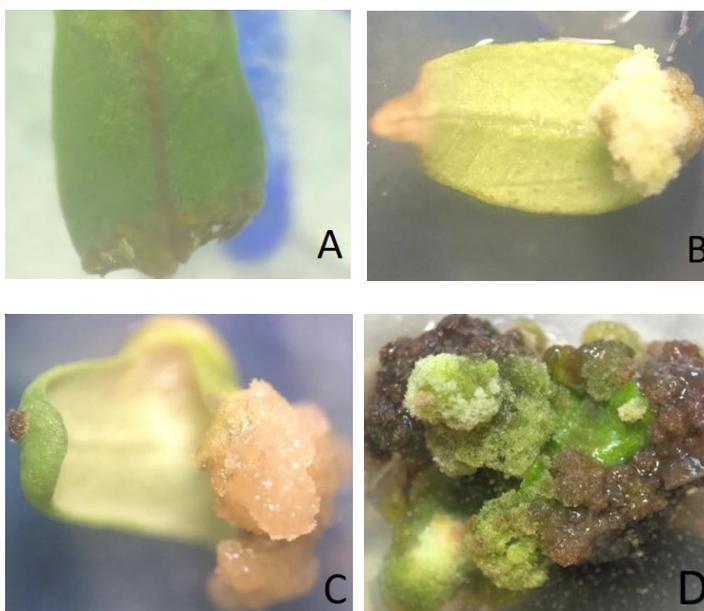


Figura 3- Calogênese a partir de folhas cotiledonares de *E. saligna* cultivadas em meio MS contendo concentrações de ANA e BAP. (A) Explante do tratamento controle sem a adição de fitorreguladores, sem a formação de calos após 28 dias de cultivo. (B) Explante aos 28 dias de cultivo na ausência de luz com a formação

de calos na região do corte das folhas com a adição de ANA e BAP $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e 1 mg L^{-1} respectivamente, e com coloração branca. (C) Explante com calos bege claro aos 28 dias de cultivo sem a presença de luz, com suplementação de 1 mg L^{-1} de ANA e 2 mg L^{-1} de BAP. (D) Explante com calos verde claro e bege escuro aos 56 dias de cultivo com a presença de luz com suplementação de 1 mg L^{-1} de ANA e 2 mg L^{-1} de BAP.

De acordo com Oberschelp (2014), a formação de calos observadas nos cotilédones cultivados em meio de cultura EDM (*Eucalyptus Dunii* Medium) suplementados com ANA e BAP apresentaram uma tendência ao aumento nos seus níveis com o incremento das dosagens de ANA e BAP. A combinação de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP apresentou os maiores níveis de regeneração de calos (77,78%) estando de acordo com os resultados aqui presente.

Em outro trabalho Dibax et al. (2005) estudaram a regeneração e a formação de calos a partir de explantes cotiledonares de *Eucalyptus camaldulensis*, e os melhores resultados foram observados para a calogênese quando os explantes foram cultivados em meio MS contendo $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e 1 BAP mg L^{-1} , após 14 dias de cultivo no escuro estando de acordo com os resultados aqui presente.

De acordo com a literatura a resposta morfogênica in vitro para o gênero *Eucalyptus*, é diferenciada de acordo com as espécies estudadas. Segundo Oliveira (2014), quando estudaram a organogênese indireta de *Eucalyptus benthamii* X *Eucalyptus dunnii*, as melhores respostas para calogênese foram observadas nos meios de cultura JADS e MS N/2 (com a metade da concentração de nitratos), sendo adicionados valores acima de 1 mg L^{-1} de TDZ (thidiazuron), sendo que a maior porcentagem de formação de calos (83,3%) foi observada no meio JADS com mg L^{-1} de TDZ e sem PVP-40 (polivinilpirrolidona). Ainda segundo Oliveira (2014), é perceptível que a adição de 1 mg L^{-1} de TDZ nos dois meios de cultura foi importante para formação de calos na espécie *Eucalyptus benthamii* X *Eucalyptus dunnii*.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

- A metodologia de assepsia permitiu a introdução *in vitro* de plantas da espécie;
- Foi possível a obtenção de calos utilizando o meio MS suplementado com 0,25 e 0,5 mg L⁻¹ de ANA e BAP apresenta-se com uma excelente alternativa devido a possibilidade de reduzir gastos com reguladores;
- Futuros estudos são necessários para estudar a regeneração de gemas a partir da metodologia de formação de calos e assim finalizar o protocolo de regeneração de plantas de *Eucalyptus saligna* a partir de folhas cotiledonares.

5. REFERÊNCIAS

- DIBAX, R.; EISFELD, C. de L.; CUQUEL, F. L.; KOEHLER, H. S.; QUOIRIN, M. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis*. *Scientia Agricola*, v. 62, p. 406-412, n. 4, 2005.
- DIBAX, R.; DESCHAMPS, C.; BESPALHOK, JC.; VIERIA, LGE.; MOLINARI, HBC.; DE CAMPOS, MKF.; QUOIRIN, M. Transformação Genética de *Eucalyptus saligna* com o gene *P5CSF129A* via *Agrobacterium tumefaciens*. *Biologia Plantarum*, v. 54, n. 1, p. 6-12, 2010.
- FANTINI JUNIOR, M. e GRAÇA, M. E. C. Propagação *in vitro* de *Eucalyptus saligna*. In: 6o Congresso Florestal Brasileiro, Campos do Jordão. Anais. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, p. 373-378, 1990.
- IBA. Relatório Anual Indústria Brasileira de Árvores. 2020.
In: <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-iba-2020.pdf> (acessado em 05 de Maio de 2021).
- JOLY, A. B. Introdução à Taxonomia Vegetal. São Paulo. Ed. Nacional, 12 ed. p. 504 - 505, 1998.
- LE ROUX, J. J.; VAN STADEN, J. Micropropagation of *Eucalyptus* species. *Journal of Horticultural Science*, Bangalore, v.26, n.5, p.199-200, 1991.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia. Plantarum*, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OBERSCHELP, G.P.J. Propagação *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* Maiden: desenvolvimento de um novo meio basal e estimação de parâmetros genéticos para

características morfofisiológicas. Tese (Doutorado em Agronomia). Piracicaba, SP: ESALQ, 2014. 160p.

OLIVEIRA, C. Organogênese *in vitro* e transformação genética de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* via *Agrobacterium tumefaciens*. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Curitiba, PR: UFPR, 2013. 101p.

OLIVEIRA, C. Y.; GOMES A, L.; DEGENHARDT, G. J.; BESPALHOK F, J. C.; DIBAX, R.; QUOIRIN, M. Organogênese indireta a partir de explantes foliares e multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus benthamii* X *Eucalyptus dunnii*. Ciência Florestal, Santa Maria, v. 24, n. 2, p. 347-355, abr.-jun., 2014.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. E; EICHORN, S.E. *In: Regulando o crescimento vegetal: Os hormônios vegetais*. Biologia Vegetal. 6o Ed. Guanabara Koogan. 2001. 780p.

6. ANEXO A

Normas da Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável:

1. Características técnicas:

- O editor de texto aceito é o Word 6.0 ou superior;
- Fonte: Times New Roman, tamanho 12, com exceção do interior de figuras e tabelas que deverão utilizar tamanho 10;
- Espaçamento do corpo do texto: duplo;
- Espaçamento do resumo, palavras-chave, abstract, keywords e interior de figuras e tabelas: 1,0 linha;
- Alinhamento do texto: justificado;
- Os parágrafos devem iniciar a 1,0 cm da margem esquerda.
- Alinhamento das referências bibliográficas: à esquerda;
- Margens: 2,5 cm (superior, inferior e direita) e 3,5 cm (esquerda).

2. Características específicas:

Título (até 25 palavras), Autores (até oito), Resumo (até 300 palavras), Palavras-chave (máximo seis), Title, Abstract, Keywords, Introdução (até 600 palavras), Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão(ões), Agradecimentos (opcional) e Literatura Citada, centralizado (exceto Resumo, Palavras-chave, Abstract e Keywords), negrito (exceto Autores) e com iniciais em maiúsculas. Em caso de aceite após correção os nomes dos autores devem ser centralizados, abaixo do título, por extenso e com letras maiúsculas/minúsculas, seguidos de numeração arábica sobrescrita e notas de rodapé, com o endereço e instituição dos autores; fonte financiadora e dados de e-mail do autor para correspondência.

As referências bibliográficas deverão ser apresentadas em ordem alfabética no final do artigo, de acordo com a norma NBR-6023 (ABNT);

Os autores devem ser citados no texto em ordem cronológica conforme exemplos a seguir: Silva (2008); Silva & Silva (2009); Silva et al. (2010). Em final de frase, usar: (Silva, 2008; Silva & Silva, 2009; Silva et al., 2010).

A “Literatura Citada” deve ser listada por ordem alfabética, e utilizar o itálico ao invés de negrito conforme os exemplos a seguir:

a) Artigos de periódicos:

LANA, R.P.; GOES, R.H.T.B.; MOREIRA, L.M. et al. Application of Lineweaver-Burk data transformation to explain animal and plant performance as a function of nutrient supply. *Livestock Production Science*, v.98, p.219-224, 2005.

RUSSELL, J.B.; COOK, G.M. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiological Reviews*, v.59, n.1, p.48-62, 1995.

b) Livros:

MEADOWS, D.H.; MEADOWS, D.L.; RANDERS, J. et al. The limits of growth. A report for the Club of Rome's project on the predicament of mankind. New York: Universe Books, 1972. 205p.

c) Capítulos de livros:

BUMB, B.L. World nitrogen supply and demand: an overview. In: BACON, P.E. (Ed.) *Nitrogen fertilization in the environment*. New York: Marcel Dekker inc., 1995. p.1- 40.

d) Trabalhos em anais de congresso:

GUIMARÃES, G.; LANA, R.P.; FIALHO, C.A. et al. Análise econômica de uso de concentrados para vacas em lactação. In: ZOOTEC, 2009. Anais... Águas de Lindóia: ABZ, 2009. CD-ROM. (Gestão do agronegócio e economia).

LANA, R.P.; GUIMARÃES, G.; GUIMARÃES, A.V. et al. Factors affecting milk production in Brazil. *Journal of Dairy Science*, v.92, E-Suppl. 1, p.427, 2009.

e) Teses e dissertações:

GOES, R.H.T.B. Desempenho de novilhos recriados a pasto, recebendo diferentes níveis e frequência de suplementação, durante o outono, na região amazônica. Tese (Doutorado em Zootecnia). Viçosa, MG: UFV, 2004. 77p.

PAIVA, V.R. Níveis de proteína bruta em dietas para vacas leiteiras da raça Holandesa em confinamento. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Viçosa, MG: UFV, 2009. 42p.

f) Internet:

AARON, S. Some statistics on limited natural resources. 2005.

In: [Http://scotaaron.com/resources2.html](http://scotaaron.com/resources2.html) (acessado em 31 de Julho de 2006).

ANEXO B

Tabela 1- Resultados do teste de Tukey para a comparação das médias de porcentagem na formação de calos nos explantes de *E. saligna* em meio de cultura MS contendo ANA e BAP por 56 dias.

Fator de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio
Tratamento (ANA + BAP)	4	5824,00 **
Erro	20	424,00
Coef. De variação (%)	38,42%	

Tabela 2- Formação de calos a partir de explantes foliares de *E. saligna* em meio de cultura MS contendo ANA e BAP avaliadas após 28 dias e a porcentagem de explantes mortos ou oxidados após 56 dias.

Tratamento mg L ⁻¹		Porcentagem de explantes formando calos (%)	Porcentagem de explantes mortos ou oxidados (%)
ANA	BAP		
0	0	0 B	100 B
0,125	0,25	40 B	60 B
0,25	0,5	72 A	28 A
0,5	1	72 A	28 A
1	2	84 A	16 A