

MULTIPLICAÇÃO IN VITRO DE CLONES HÍBRIDOS DE *Eucalyptus globulus*¹

Silvano Rodrigues Borges², Aloisio Xavier³, Leandro Silva de Oliveira⁴, Aline Pontes Lopes⁵ e Wagner Campos Otoni⁶

RESUMO – O presente estudo teve como objetivos avaliar a resposta de clones híbridos de *Eucalyptus globulus* nos meios de cultura MS e JADS durante a fase de multiplicação *in vitro*. Os explantes foram provenientes da fase de estabelecimento *in vitro* de 21 clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*, sendo 11 clones com três introduções *in vitro*, e de seis clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, sendo dois clones com três introduções. Os clones foram subcultivados mensalmente nos meios de cultura MS e JADS, com 0,5 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético). Concluiu-se que: houve tendência de maiores taxas de multiplicação no meio MS; a maioria dos clones se estabeleceu na fase de multiplicação *in vitro*, enquanto alguns clones se mostraram recalcitrantes nesta fase da micropropagação; a taxa de multiplicação apresentou tendência de aumento nos primeiros subcultivos e posterior queda para a maioria dos clones.

Palavras-chave: Meio de cultura, Propagação *in vitro* e Micropropagação.

IN VITRO MULTIPLICATION OF HYBRID CLONES OF *Eucalyptus globulus*

ABSTRACT – The present study aimed to evaluate the response of hybrid *Eucalyptus globulus* clones in MS and JADS culture media during the *in vitro* multiplication phase. The explants were originated from the *in vitro* establishment phase of 21 *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* clones, being 11 clones with three *in vitro* introductions, and of six *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* clones, being two clones with three introductions. The clones were subcultivated monthly in MS and JADS culture media, with 0.5 mg L⁻¹ of BAP (6-benzylaminopurine) and 0.01 mg L⁻¹ of NAA (naphthaleneacetic acid). It was concluded that: the MS culture medium was superior in terms of the multiplication rate; most of the clones were established in the *in vitro* multiplication phase, whereas some clones appeared recalcitrant in this phase of the micropropagation; the multiplication rate presented a tendency to increase in the first subcultures with a subsequent fall for most of the clones.

Keywords: Culture medium, *In vitro* propagation and Micropropagation.

1. INTRODUÇÃO

Recentemente tem crescido o interesse da indústria de papel e celulose pelo *Eucalyptus globulus*, sobretudo pelos significativos ganhos em qualidade da madeira (CARDOSO, 2002; XAVIER et al., 2007; ASSIS e MAFIA, 2007). Os plantios da espécie têm-se restringido a regiões de clima temperado devido às suas exigências edafoclimáticas (ELDRIDGE et al., 1993). Nas regiões tropicais, a hibridação com outras espécies do gênero tem sido a alternativa encontrada para melhorar a adaptação ambiental da espécie e

aproveitar as características tecnológicas da madeira, além de maior facilidade de propagação vegetativa, entre outras vantagens (ALFENAS et al., 2004).

O *Eucalyptus globulus* é reconhecidamente recalcitrante ao enraizamento de estacas, especialmente no que envolve material adulto, dificultando o aproveitamento dos benefícios da clonagem (ALFENAS et al., 2004; ASSIS e MAFIA, 2007). Dessa forma, técnicas alternativas como a propagação *in vitro*, visando ao rejuvenescimento clonal, podem viabilizar a propagação vegetativa da espécie e seus híbridos.

¹ Recebido em 31.08.2009 e aceito para publicação em 16.12.2010.

² Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. E-mail: <borgesilvano@yahoo.com.br>.

³ Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. E-mail: <xavier@ufv.br>.

⁴ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. E-mail: <leandrooliveira@yahoo.com.br>.

⁵ Graduando em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. E-mail: <alinepopes@gmail.com>.

⁶ Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. E-mail: <wotoni@ufv.br>.

As técnicas de propagação *in vitro* têm sido largamente difundidas e com aplicações comprovadas na área florestal (XAVIER et al., 2009), onde grande parte dos estudos sobre *Eucalyptus* tem sido direcionada para a otimização da clonagem de árvores adultas (DEL PONTE et al., 2001). Especialmente em *Eucalyptus*, a micropropagação mediante proliferação de gemas axilares tem sido a mais utilizada, sendo mais simples do que os sistemas de micropropagação por embriogênese somática e organogênese, por se basear na proliferação de gemas pré-formadas (GOMES e CANHOTO, 2003; XAVIER et al., 2009).

O estado fisiológico da planta-matriz tem grande influência na morfogênese, no crescimento e nas taxas de multiplicação *in vitro*, o que pode ser melhorado com adequado pré-tratamento ambiental das plantas-matrizes, particularmente quanto à nutrição e ao controle fitossanitário. Da mesma forma, o tipo de explante e a época de coleta podem ser determinantes na resposta *in vitro* (HARTMANN, 2002; GEORGE e DEBERGH, 2008).

Os meios de cultura utilizados na micropropagação fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS et al., 1998). Na micropropagação de *Eucalyptus*, o meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) tem sido o mais utilizado (BENNETT et al., 1994; YANG et al., 1995; SHARMA e RAMAMURTHY, 2000; GRAÇA et al., 2001; NUGENT et al., 2001; SOBROSA e CORDER, 2003; WATT et al., 2003; BILLARD et al., 2005; GLOCKE, et al., 2006; BRONDANI et al., 2009). O meio JADS (CORREIA, 1993) também tem sido testado com sucesso em alguns trabalhos de micropropagação com as espécies do gênero (LIMA e GONÇALVES, 1998; SANTOS et al., 2004; ANDRADE et al., 2006; QUISEN, 2007; BRAVO et al., 2008).

A resposta de explantes em sistema de cultivo *in vitro* também depende do genótipo do material colocado em cultura (SOBROSA e CORDER, 2003; GEORGE e DEBERGH, 2008). Normalmente se observa variabilidade clonal no comportamento *in vitro*, com genótipos que se adaptam facilmente à condição *in vitro*, respondendo bem a vários meios de cultura, e clones que necessitam de ajustes específicos no meio de cultura (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivos avaliar o efeito dos meios de cultura MS e JADS na resposta de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*

e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* durante a fase de multiplicação *in vitro*, através da técnica de micropropagação pela proliferação de gemas axilares, visando ao rejuvenescimento clonal.

2. MATERIALE MÉTODOS

2.1. Material experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa – UFV, localizado no Município de Viçosa, Minas Gerais.

Os explantes utilizados na multiplicação *in vitro* foram provenientes da fase de estabelecimento *in vitro* de 21 clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e seis de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, oriundos da empresa CENIBRA S.A., localizada no Município de Belo Oriente, Minas Gerais. Os clones utilizados nos experimentos resultaram do programa de melhoramento genético da CENIBRA S.A. e foram gerados a partir de cruzamentos utilizando pólenes de *Eucalyptus globulus*, provenientes do Instituto Raiz, de Portugal. Como genitores femininos foram usadas matrizes superiores de *Eucalyptus grandis* ou *Eucalyptus urophylla* da própria empresa (Tabela 1).

Os clones foram selecionados em testes de progênie híbrida, avaliando-se as características silviculturais (DAP, altura, forma e outras) aos 3 anos de idade. Nessa idade foram produzidas mudas pelo processo de estaquia convencional para multiplicação do material vegetativo, as quais foram conduzidas como minicepas em minijardim clonal, sob sistema semi-hidropônico de canaletão de areia, no Viveiro de Pesquisas Florestais do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, de onde se coletaram os explantes para o estabelecimento *in vitro*.

As minicepas foram conduzidas em casa de vegetação com as laterais abertas e cobertas com plástico transparente de polietileno. As plantas receberam solução nutritiva por gotejamento, aplicada quatro vezes ao dia, numa vazão total diária de 4 L m⁻². A solução foi composta de nitrato de cálcio (0,920 g L⁻¹), cloreto de potássio (0,240 g L⁻¹), nitrato de potássio (0,140 g L⁻¹), monoamônio fosfato (96,000 mg L⁻¹), sulfato de magnésio (0,364 g L⁻¹), hidroferro (40,000 mg L⁻¹), ácido bórico (2,800 mg L⁻¹), sulfato de zinco (0,480 mg L⁻¹), sulfato

Tabela 1 – Clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* e seus genitores femininos e masculinos.

Table 1 – *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* and *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* clones and their female and male parents.

CLONES	GENITOR FEMININO <i>Eucalyptus urophylla</i>	GENITOR MASCULINO <i>Eucalyptus globulus</i>
C01	U03	G02
C02	U10	G07
C03	U02	G09
C04	U09	G07
C05	U01	G02
C06	U10	G04
C07	U09	G06
C08	U05	G06
C09	U04	G09
C10	U02	G02
C11	U04	G07
C12	U08	G09
C13	U07	G05
C14	U06	G10
C15	U05	G09
C16	U14	G07
C17	U13	G08
C18	U08	G03
C19	U12	G02
C20	U04	G03
C22	U11	G01
	<i>Eucalyptus grandis</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>
C23	M16	G07
C24	M16	G04
C26	M17	G07
C27	M19	G02
C29	M18	G02
C30	M18	G11

de manganês (1,120 mg L⁻¹), sulfato de cobre (0,100 mg L⁻¹) e molibdato de sódio (0,040 mg L⁻¹). A condutividade elétrica da solução nutritiva foi mantida em torno de 2,0 mS m⁻².

No estabelecimento *in vitro*, utilizaram-se como explantes segmentos nodais medindo de 3 a 4 cm de comprimento, que foram coletados e desinfestados com lavagem em água corrente, seguido de imersão em solução fungicida contendo 2,4 g L⁻¹ de Orthocide 500® (Captan 50% como p. a.), durante 15 min. Posteriormente, foram imersos em solução de álcool 70% (v/v) por 30 seg com agitação constante, dentro da câmara de fluxo laminar horizontal. Em seguida, foram imersos em solução de NaOCl 1% (v/v) Clarix®, acrescida de Tween 20 (3 gotas/100 mL de solução) durante 15 min. Finalmente, os segmentos nodais foram lavados em água desionizada autoclavada, cinco vezes, e os

explantes preparados e inoculados verticalmente, sob condições assépticas, em tubos de ensaio de 15 cm x 2,5 cm, contendo 10 mL de meio de cultura. Utilizou-se o meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), adicionado de 0,5 mg L⁻¹ de BAP (Sigma Co.), 0,1 mg L⁻¹ de ANA (Sigma Co.), 100 mg L⁻¹ de mioinositol (Sigma Co.), 800 mg L⁻¹ de PVP30 (Polivinilpirrolidona – Synth Ltda.), 30 g L⁻¹ de sacarose (Synth Ltda.) e 7 g L⁻¹ de ágar (Merck S.A.). Os meios de cultura foram preparados utilizando água deionizada e o pH, ajustado para 5,8 ± 0,05 com NaOH (0,1 mol/L) e HCl (0,1 mol/L), antes da autoclavagem e da adição do ágar. O meio de cultura foi autoclavado na temperatura de 121 °C e pressão de aproximadamente 1 kgf cm⁻², durante 15 min.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos durante sete dias no escuro, visando reduzir o processo de oxidação, em sala de cultura a 25 ± 2 °C, e,



posteriormente, mantidos por 23 dias em fotoperíodo de 16 h de luz e irradiância de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecidas por tubos fluorescentes branco-frios.

Em 11 clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, foram usadas brotações provenientes de três introduções *in vitro* (realizadas aos 30, 90 e 150 dias após a primeira poda das minicepas em condições de viveiro). Nos demais clones, 10 de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e quatro de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, utilizaram-se brotações provenientes de apenas uma introdução *in vitro*.

2.2. Multiplicação *in vitro*

Para a iniciação da fase de multiplicação, as brotações produzidas na fase de estabelecimento *in vitro* foram preparadas e inoculadas, sob condições assépticas, em tubos de ensaio de 15 cm x 2,5 cm contendo 10 mL do meio de cultura. Foram usados os meios de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e JADS (CORREIA, 1993) adicionados de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, 100 mg L^{-1} de mioinositol, 800 mg L^{-1} de PVP30, 30 g L^{-1} de sacarose e 7 g L^{-1} de ágar. Quanto ao ajuste de pH e à autoclavagem, esses foram realizados conforme descrito para a fase de estabelecimento *in vitro*.

A cada 30 dias, procedeu-se o subcultivo dos explantes para novo meio de cultura de igual composição, isolando tufo de brotações padronizados com duas a três brotações maiores do que 2 mm e com bom vigor vegetativo.

Tabela 2 – Número médio de tufo de brotações por explante dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* na primeira introdução *in vitro* nos meios de cultura MS e JADS em sucessivos subcultivos, após 30 dias em cultura.

Table 2 – Mean number of shoot bunches by explant of the *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* and *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* clones at the first *in vitro* introduction on the MS and JADS culture media during successive subcultures, after 30 days in culture.

		<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. globulus</i>										
MEIO	CLONE	NÚMERO MÉDIO DE TUFO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE/SUBCULTIVO										
		SUB 1	SUB 2	SUB 3	SUB 4	SUB 5	SUB 6	SUB 7	SUB 8	SUB 9	MÉDIA	
MS	C16	1,2 (0,4)*	3,0 (0,6)	3,1 (0,4)	2,7 (0,3)	4,5 (0,6)	4,7 (0,4)	4,5 (0,5)	3,4 (0,3)	3,6 (0,3)	3,7 (0,2)	
	C04	3,0 (0,6)	1,7 (0,3)	3,4 (0,3)	2,9 (0,3)	3,1 (0,3)	4,2 (0,4)	3,2 (0,3)	2,8 (0,2)	3,2 (0,3)	3,1 (0,1)	
	C08	2,0 (1,2)	1,5 (0,3)	2,5 (1,0)	1,4 (0,4)	2,6 (0,3)	5,3 (0,5)	4,1 (0,4)	3,1 (0,3)	1,9 (0,2)	3,0 (0,2)	
	C17	1,2 (0,4)	1,3 (0,3)	1,8 (0,4)	4,0 (0,6)	1,9 (0,3)	2,2 (0,2)	4,0 (0,3)	5,0 (0,4)	2,8 (0,2)	3,0 (0,2)	
	C01	1,0 (0,3)	1,8 (0,4)	1,2 (0,3)	5,1 (0,5)	2,5 (0,2)	4,1 (0,4)	3,5 (0,4)	2,2 (0,4)	2,4 (0,2)	2,8 (0,2)	
	C13	1,8 (0,5)	1,6 (0,3)	2,9 (0,4)	3,3 (0,3)	2,6 (0,3)	4,1 (0,3)	2,9 (0,3)	2,3 (0,2)	1,9 (0,2)	2,8 (0,1)	
	C18	0,8 (0,3)	2,2 (0,5)	1,6 (0,4)	1,1 (0,1)	1,6 (0,3)	2,7 (0,3)	1,9 (0,2)	2,1 (0,2)	2,1 (0,3)	1,8 (0,1)	
	C11	0,8 (0,3)	2,3 (0,3)	0,8 (0,2)	0,4 (0,2)	0,0	-	-	-	-	0,8 (0,2)	
	C20	1,0 (0,0)	1,0 (0,0)	0,7 (0,3)	1,0 (0,0)	0,0	-	-	-	-	0,7 (0,1)	
	C12	0,3 (0,3)	1,0 (0,0)	0,0	-	-	-	-	-	-	0,4 (0,2)	
	JADS	C16	1,5 (0,5)	2,0 (0,4)	2,8 (0,4)	3,8 (0,5)	5,8 (0,5)	4,0 (0,4)	5,7 (0,3)	4,6 (0,4)	4,1 (0,2)	4,3 (0,2)
		C13	2,0 (0,4)	1,4 (0,2)	4,0 (0,6)	3,3 (0,2)	2,5 (0,2)	2,9 (0,2)	4,2 (0,3)	2,8 (0,2)	1,9 (0,1)	2,9 (0,1)

Continua ...
Continued ...

Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de cultura a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h de luz e irradiância de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecidas por tubos fluorescentes branco-frios.

2.3. Condução e avaliações experimentais

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, utilizando 20 repetições compostas de um explante (tufo de brotação) por repetição. Nos clones com três introduções *in vitro*, testaram-se dois meios de cultura (MS e JADS) ao longo de nove, sete e cinco subcultivos para a primeira, segunda e terceira introduções *in vitro*, respectivamente. Nos clones com apenas uma introdução *in vitro*, foram testados dois meios de cultura (MS e JADS) ao longo de cinco subcultivos.

Após 30 dias em cultura, foi avaliada a taxa de multiplicação (número de tufo de brotações produzidos por explante) em cada subcultivo, sendo os dados analisados por meio das médias e do erro-padrão.

3. RESULTADOS

Com base nos resultados, observaram-se respostas diferenciadas na maioria dos clones à taxa de multiplicação ao longo dos subcultivos, bem como pequenas diferenças entre meios de cultura e entre introduções *in vitro* em alguns clones (Tabelas 2, 3 e 4). Esses resultados também foram observados nos clones com apenas uma introdução *in vitro* (Tabela 5).

Tabela 2 – Cont.

Table 2 – Cont.

JADS	CLONE	1,5 (0,5)	2,0 (0,4)	2,8 (0,4)	3,8 (0,5)	5,8 (0,5)	4,0 (0,4)	5,7 (0,3)	4,6 (0,4)	4,1 (0,2)	4,3 (0,2)
	C16	1,5 (0,5)	2,0 (0,4)	2,8 (0,4)	3,8 (0,5)	5,8 (0,5)	4,0 (0,4)	5,7 (0,3)	4,6 (0,4)	4,1 (0,2)	4,3 (0,2)
	C13	2,0 (0,4)	1,4 (0,2)	4,0 (0,6)	3,3 (0,2)	2,5 (0,2)	2,9 (0,2)	4,2 (0,3)	2,8 (0,2)	1,9 (0,1)	2,9 (0,1)
	C08	2,0 (0,0)	1,5 (0,7)	3,4 (1,2)	1,2 (0,3)	2,6 (0,3)	4,8 (0,5)	3,6 (0,5)	3,1 (0,3)	1,8 (0,2)	2,8 (0,2)
	C01	1,0 (0,3)	2,1 (0,4)	1,3 (0,3)	3,3 (0,5)	2,8 (0,3)	2,0 (0,3)	3,2 (0,2)	3,3 (0,2)	2,2 (0,2)	2,5 (0,1)
	C04	3,0 (0,6)	1,7 (0,4)	1,5 (0,2)	2,5 (0,3)	2,7 (0,3)	3,4 (0,3)	2,2 (0,3)	2,9 (0,3)	2,0 (0,3)	2,4 (0,1)
	C17	1,4 (0,6)	1,7 (0,3)	2,3 (0,4)	2,9 (0,4)	2,1 (0,3)	2,0 (0,3)	2,2 (0,3)	3,1 (0,2)	2,0 (0,3)	2,3 (0,1)
	C11	1,3 (0,3)	1,5 (0,3)	1,0 (0,7)	1,2 (0,5)	1,8 (0,5)	0,7 (0,4)	1,4 (0,4)	3,2 (0,5)	2,7 (0,3)	1,9 (0,2)
	C18	0,8 (0,3)	1,2 (0,2)	1,6 (0,6)	1,1 (0,2)	1,5 (0,2)	1,3 (0,1)	1,7 (0,2)	2,3 (0,2)	2,1 (0,1)	1,6 (0,1)
	C20	1,0 (0,0)	1,0 (0,0)	1,0 (0,0)	1,7 (0,7)	0,0	-	-	-	-	0,9 (0,2)
	C12	0,2 (0,2)	1,0 (0,0)	0,0	-	-	-	-	-	-	0,3 (0,1)

Eucalyptus grandis x *E. globulus*

MEIO	CLONE	NÚMERO MÉDIO DE TUFOS DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE/SUBCULTIVO									
		SUB 1	SUB 2	SUB 3	SUB 4	SUB 5	SUB 6	SUB 7	SUB 8	SUB 9	MÉDIA
MS	C29	6,3 (1,5)	6,4 (1,6)	4,9 (0,6)	8,6 (0,5)	5,2 (0,6)	3,8 (0,4)	4,5 (0,6)	2,3 (0,3)	2,9 (0,3)	4,7 (0,2)
	C24	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0
JADS	C29	3,3 (0,9)	3,7 (0,8)	5,7 (0,7)	6,8 (0,6)	4,5 (0,7)	6,7 (1,0)	6,5 (0,4)	3,2 (0,3)	4,9 (0,4)	5,3 (0,2)
	C24	0,5 (0,3)	0,7 (0,7)	2,0 (0,0)	0,0	-	-	-	-	-	0,7 (0,2)

* Valores entre parênteses referem-se ao erro padrão da média; SUB = subcultivo.

Tabela 3 – Número médio de tufos de brotações por explante dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* na segunda introdução *in vitro* nos meios de cultura MS e JADS em sucessivos subcultivos, após 30 dias em cultura.

Table 3 – Mean number of shoot bunches by explant of the *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* and *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* clones at the second *in vitro* introduction on the MS and JADS culture media during successive subcultures, after 30 days in culture.

Eucalyptus urophylla x *E. globulus*

MEIO	CLONE	NÚMERO MÉDIO DE TUFOS DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE/SUBCULTIVO									
		SUB 1	SUB 2	SUB 3	SUB 4	SUB 5	SUB 6	SUB 7			MÉDIA
MS	C16	1,6 (0,3)*	2,8 (0,7)	5,0 (0,9)	5,7 (0,5)	4,2 (0,6)	4,5 (0,3)	2,5 (0,2)			3,7 (0,2)
	C01	1,1 (0,1)	3,3 (0,4)	3,9 (0,5)	3,3 (0,3)	5,5 (0,4)	3,1 (0,3)	3,1 (0,2)			3,3 (0,2)
	C04	1,3 (0,3)	2,5 (1,0)	3,4 (0,6)	2,3 (0,2)	3,8 (0,5)	4,2 (0,4)	3,1 (0,3)			3,3 (0,2)
	C13	3,0 (0,5)	2,3 (0,3)	3,9 (0,3)	2,6 (0,3)	3,1 (0,3)	3,2 (0,2)	2,0 (0,2)			2,8 (0,1)
	C08	1,7 (0,3)	1,7 (0,7)	1,2 (1,0)	1,7 (0,2)	3,8 (0,4)	3,7 (0,2)	2,6 (0,2)			2,7 (0,2)
	C17	1,0 (0,0)	2,3 (1,2)	1,7 (0,4)	3,3 (0,3)	3,6 (0,4)	1,9 (0,2)	2,9 (0,2)			2,7 (0,2)
	C18	1,1 (0,1)	2,0 (0,6)	2,4 (0,2)	4,2 (0,4)	2,8 (0,4)	2,2 (0,2)	1,7 (0,2)			2,5 (0,1)
	C11	1,0 (0,0)	1,3 (0,8)	0,8 (0,6)	2,8 (1,5)	1,4 (0,2)	2,0 (0,4)	3,2 (0,3)			2,1 (0,2)
	C15	1,0 (0,3)	0,9 (0,3)	1,0 (0,4)	2,6 (0,4)	1,7 (0,2)	2,3 (0,2)	1,2 (0,1)			1,6 (0,1)
	C20	1,2 (0,2)	1,0 (0,2)	0,0	-	-	-	-			0,7 (0,2)
JADS	C16	1,2 (0,2)	2,8 (0,8)	3,3 (0,2)	4,3 (0,4)	5,9 (0,5)	5,7 (0,3)	2,6 (0,3)			3,7 (0,2)
	C11	1,5 (0,5)	2,8 (0,6)	1,8 (0,3)	2,7 (0,4)	2,0 (0,2)	3,3 (0,3)	3,9 (0,3)			2,7 (0,1)
	C01	1,3 (0,1)	2,8 (0,4)	2,2 (0,2)	3,3 (0,4)	3,3 (0,4)	2,7 (0,3)	2,4 (0,3)			2,6 (0,1)
	C04	1,7 (0,7)	2,8 (1,3)	1,7 (0,3)	2,9 (0,2)	2,4 (0,2)	2,9 (0,3)	3,0 (0,3)			2,6 (0,1)
	C08	1,0 (0,0)	1,7 (0,3)	2,3 (2,3)	1,7 (0,5)	4,5 (0,7)	3,5 (0,2)	1,2 (0,1)			2,5 (0,3)
	C13	1,5 (0,5)	1,2 (0,1)	3,1 (0,3)	1,7 (0,4)	2,3 (0,3)	2,6 (0,2)	1,6 (0,1)			2,1 (0,1)
	C18	1,3 (0,6)	1,4 (0,2)	1,7 (0,3)	1,6 (0,2)	1,3 (0,1)	2,1 (0,3)	1,9 (0,2)			1,7 (0,1)
	C20	1,0 (0,0)	1,4 (0,3)	1,1 (0,1)	1,5 (0,3)	1,1 (0,1)	1,4 (0,2)	1,0 (0,2)			1,2 (0,1)
	C17	1,0 (0,0)	1,3 (0,3)	1,5 (0,7)	0,0	-	-	-			1,0 (0,7)
	C15	0,7 (0,1)	0,0	-	-	-	-	-			0,4 (0,1)

Eucalyptus grandis x *E. globulus*

MEIO	CLONE	NÚMERO DE TUFOS DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE/SUBCULTIVO									
		SUB 1	SUB 2	SUB 3	SUB 4	SUB 5	SUB 6	SUB 7			MÉDIA
MS	C24	1,0 (0,0)	0,3 (0,3)	0,0	-	-	-	-			0,4 (0,2)
JADS	C24	1,0 (0,6)	1,0 (1,0)	0,0	-	-	-	-			0,7 (0,4)

* Valores entre parênteses referem-se ao erro padrão da média; SUB = subcultivo.



Tabela 4 – Número médio de tufos de brotações por explante de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* na terceira introdução *in vitro* nos meios de cultura MS e JADS em sucessivos subcultivos, após 30 dias em cultura.

Table 4 – Número médio de tufos de brotações por explante dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* com apenas uma introdução *in vitro*, nos meios de cultura MS e JADS em sucessivos subcultivos, após 30 dias em cultura.

<i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. globulus</i>							
MEIO	CLONE	NÚMERO DE TUFO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE/SUBCULTIVO					
		SUB 1	SUB 2	SUB 3	SUB 4	SUB 5	MÉDIA
MS	C16	3,5 (0,9)*	4,3 (0,6)	3,7 (0,7)	3,7 (0,3)	3,8 (0,3)	3,8 (0,2)
	C01	2,1 (0,3)	2,5 (0,4)	5,0 (0,5)	5,0 (0,5)	3,7 (0,3)	3,6 (0,2)
	C11	1,0 (0,0)	2,0 (1,0)	3,4 (1,0)	2,8 (0,4)	4,0 (0,4)	3,2 (0,3)
	C08	1,9 (0,2)	4,6 (0,4)	4,1 (0,4)	2,4 (0,2)	2,8 (0,2)	3,1 (0,2)
	C13	2,5 (0,5)	2,1 (0,2)	4,1 (0,4)	3,0 (0,2)	2,4 (0,2)	2,8 (0,2)
	C12	1,1 (0,1)	2,6 (0,6)	4,4 (0,6)	2,2 (0,3)	3,2 (0,3)	2,7 (0,2)
	C18	1,3 (0,1)	1,9 (0,2)	3,5 (0,3)	5,4 (0,4)	1,3 (0,1)	2,7 (0,2)
	C17	1,2 (0,1)	1,7 (0,2)	4,2 (0,5)	3,8 (0,2)	2,0 (0,2)	2,6 (0,2)
	C15	2,4 (0,3)	2,5 (0,2)	3,8 (0,5)	2,4 (0,2)	1,9 (0,2)	2,6 (0,2)
	C04	1,0 (0,0)	2,3 (0,3)	2,3 (0,3)	2,0 (0,2)	3,7 (0,4)	2,6 (0,3)
JADS	C20	1,0 (0,0)	0,7 (0,2)	0,0	-	-	0,6 (0,1)
	C08	1,7 (0,2)	2,8 (0,3)	4,9 (0,6)	3,0 (0,3)	2,9 (0,2)	3,0 (0,2)
	C17	1,3 (0,1)	2,0 (0,3)	3,0 (0,3)	4,2 (0,3)	2,6 (0,2)	2,6 (0,2)
	C13	1,5 (0,3)	1,6 (0,1)	4,6 (0,4)	2,7 (0,3)	2,3 (0,2)	2,6 (0,2)
	C12	1,0 (0,1)	1,0 (0,3)	3,7 (0,4)	2,0 (0,3)	3,2 (0,3)	2,1 (0,2)
	C18	1,2 (0,1)	1,4 (0,2)	3,3 (0,3)	2,2 (0,3)	1,4 (0,1)	1,9 (0,1)
	C15	1,4 (0,2)	1,3 (0,2)	1,8 (0,3)	1,5 (0,2)	1,1 (0,2)	1,4 (0,1)
	C20	1,0 (0,2)	1,4 (0,4)	1,1 (0,2)	1,3 (0,2)	1,1 (0,2)	1,2 (0,1)
C11	0,8 (0,3)	0,3 (0,3)	0,0	-	-	0,4 (0,2)	
<i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. globulus</i>							
MEIO	CLONE	NÚMERO DE TUFO DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE/SUBCULTIVO					
		SUB 1	SUB 2	SUB 3	SUB 4	SUB 5	MÉDIA
MS	C29	2,3 (0,6)	5,9 (1,0)	5,5 (0,4)	4,3 (0,5)	5,1 (0,5)	4,9 (0,3)
	C24	0,3 (0,2)	0,0	-	-	-	0,2 (0,1)
JADS	C29	1,4 (0,2)	5,7 (0,4)	4,7 (0,6)	5,4 (0,7)	6,1 (0,6)	5,0 (0,3)
	C24	0,5 (0,3)	0,0	-	-	-	0,3 (0,2)

* Valores entre parênteses referem-se ao erro padrão da média; SUB = subcultivo.

Devido à produção insuficiente de brotações na fase de estabelecimento *in vitro*, os clones C15 na primeira introdução *in vitro*, os clones C12 e C29 na segunda introdução e C01, C04 e C16 no meio de cultura JADS na terceira introdução não foram estabelecidos na fase de multiplicação *in vitro*. No entanto, nas introduções em que houve produção suficiente de brotações na fase de estabelecimento esses clones foram avaliados na fase de multiplicação.

O clone C29 foi o que apresentou as maiores taxas de multiplicação, tanto no meio de cultura JADS quanto no meio MS (5,3 e 4,9, respectivamente). Entretanto, esse clone não se estabeleceu na segunda introdução *in vitro*, devido ao baixo vigor e número de brotações produzidas na fase de estabelecimento nessa introdução.

Alguns clones se mostraram recalcitrantes em relação aos demais durante a fase de multiplicação em pelo menos uma das introduções *in vitro*, sendo descartados após alguns subcultivos (clones C11, C12, C15, C20 e C24). Ressalta-se que o clone C20 não se estabeleceu no meio de cultura MS e o clone C24 em nenhum dos dois meios. Esses clones apresentavam-se sem vigor e necróticos, o que limitou seu cultivo.

De modo geral, no meio de cultura MS foi observado que as brotações apresentavam-se mais alongadas e com folhas maiores do que no meio JADS. Também foi observada no meio MS a ocorrência, em baixa frequência, de alguns explantes hiper-hídricos em certos clones, não sendo verificado esse comportamento no meio JADS.

Tabela 5 – Número médio de tufos de brotações por explante dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* com apenas uma introdução *in vitro* nos meios de cultura MS e JADS em sucessivos subcultivos, após 30 dias em cultura.

Table 5 – Mean number of shoot bunches by explant of the *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* and *Eucalyptus grandis* x *E. globulus* clones with only one *in vitro* introduction on the MS and JADS culture media during successive subcultures, after 30 days in culture.

Eucalyptus urophylla x E. globulus								
MEIO	CLONE	NÚMERO DE TUFSOS DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE/SUBCULTIVO					MÉDIA	
		SUB 1	SUB 2	SUB 3	SUB 4	SUB 5		
MS	C03	6,5 (0,5)*	2,6 (0,3)	2,5 (0,3)	5,6 (0,3)	4,5 (0,2)	4,3 (0,2)	
	C09	2,1 (0,3)	3,5 (0,5)	6,0 (0,5)	4,0 (0,4)	3,6 (0,3)	3,8 (0,2)	
	C14	2,8 (0,3)	4,0 (0,3)	3,4 (0,3)	3,1 (0,5)	2,9 (0,3)	3,2 (0,2)	
	C10	2,3 (0,3)	2,3 (0,3)	4,7 (0,3)	3,8 (0,4)	2,2 (0,2)	3,1 (0,2)	
	C05	1,4 (0,2)	2,1 (0,4)	4,8 (0,5)	3,0 (0,4)	3,4 (0,3)	2,9 (0,2)	
	C02	1,8 (0,2)	3,6 (0,3)	3,7 (0,4)	3,3 (0,4)	1,1 (0,1)	2,7 (0,2)	
	C06	1,4 (0,2)	3,0 (0,3)	4,5 (0,5)	2,3 (0,2)	2,1 (0,2)	2,6 (0,2)	
	C19	1,0 (0,3)	0,8 (0,2)	1,3 (0,3)	2,8 (0,8)	2,9 (0,2)	2,1 (0,2)	
	C22	3,7 (1,2)	1,8 (0,4)	1,6 (0,2)	1,6 (0,2)	1,3 (0,2)	1,7 (0,1)	
	C07	0,8 (0,3)	1,5 (0,3)	1,2 (0,1)	1,4 (0,3)	2,1 (0,3)	1,6 (0,1)	
	JADS	C03	3,6 (0,4)	1,8 (0,5)	2,8 (0,3)	5,7 (0,4)	3,7 (0,3)	3,5 (0,2)
		C02	2,1 (0,2)	4,1 (0,5)	3,2 (0,3)	4,5 (0,5)	2,2 (0,3)	3,3 (0,2)
C19		1,0 (0,0)	1,2 (0,2)	1,2 (0,2)	4,3 (1,2)	3,7 (0,4)	2,9 (0,3)	
C14		1,3 (0,1)	2,1 (0,3)	2,3 (0,3)	4,1 (0,4)	3,2 (0,3)	2,6 (0,2)	
C06		1,4 (0,3)	2,3 (0,3)	3,9 (0,4)	2,9 (0,5)	2,7 (0,4)	2,6 (0,2)	
C09		1,4 (0,2)	0,9 (0,1)	2,0 (0,3)	4,2 (0,5)	3,8 (0,5)	2,4 (0,2)	
C05		1,1 (0,1)	1,1 (0,3)	3,6 (0,8)	2,6 (0,3)	3,8 (0,5)	2,4 (0,2)	
C10		1,3 (0,2)	0,5 (0,2)	2,2 (0,3)	3,3 (0,7)	2,4 (0,3)	1,8 (0,2)	
C07		1,0 (0,0)	1,0 (0,0)	1,3 (0,3)	2,0 (0,6)	1,3 (0,3)	1,3 (0,1)	
C22		2,0 (0,0)	1,0 (0,6)	2,0 (0,0)	1,5 (0,3)	0,3 (0,2)	1,2 (0,2)	
Eucalyptus grandis x E. globulus								
MEIO	CLONE	NÚMERO DE TUFSOS DE BROTAÇÕES POR EXPLANTE/SUBCULTIVO					MÉDIA	
		SUB 1	SUB 2	SUB 3	SUB 4	SUB 5		
MS	C26	2,0 (0,4)	5,0 (0,6)	3,8 (0,3)	5,8 (0,3)	4,5 (0,3)	4,6 (0,2)	
	C23	0,9 (0,5)	2,8 (0,7)	4,7 (0,4)	3,7 (0,4)	2,5 (0,2)	3,2 (0,2)	
	C30	1,5 (0,2)	2,6 (0,3)	4,7 (0,5)	3,6 (0,3)	2,3 (0,2)	2,9 (0,2)	
	C27	1,0 (0,2)	2,6 (0,4)	1,7 (0,3)	1,6 (0,2)	1,5 (0,2)	1,6 (0,1)	
	JADS	C26	1,3 (0,3)	1,0 (0,3)	3,2 (0,7)	5,9 (0,6)	5,3 (0,4)	4,5 (0,4)
C30		1,2 (0,2)	2,0 (0,2)	4,3 (0,5)	3,8 (0,4)	2,5 (0,3)	2,8 (0,2)	
C23		1,1 (0,3)	1,7 (0,3)	4,2 (0,7)	2,0 (0,3)	2,1 (0,2)	2,3 (0,2)	
C27		1,1 (0,1)	1,0 (0,3)	1,4 (0,3)	1,6 (0,3)	2,1 (0,3)	1,6 (0,1)	

* Valores entre parênteses referem-se ao erro padrão da média; SUB = subcultivo.

No meio JADS, foi observada tendência de escurecimento do meio na maioria dos clones, evidenciando a oxidação de compostos fenólicos liberados pelo explante no meio de cultura, principalmente após 20 dias em cultura. No meio MS, esse escurecimento foi baixo, ocorrendo somente em alguns explantes.

Foi observado, visualmente, que nos 12 primeiros dias após a inoculação, em cada subcultivo, os explantes apresentavam crescimento lento, iniciando o processo

de proliferação das gemas axilares a partir desse período. A proliferação era rápida até o 20º dia em cultura, quando, então, o crescimento se estabilizava.

4. DISCUSSÃO

Ao comparar as três introduções *in vitro*, observou-se tendência de melhores resultados na taxa de multiplicação na terceira introdução na maioria dos clones, principalmente no meio de cultura MS. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a planta-matriz tem grande

influência no posterior comportamento das culturas *in vitro*. Assim, essa tendência observada nos resultados pode estar relacionada à qualidade fisiológica das minicepas no momento da coleta dos explantes.

Os meios de cultura MS e JADS, em média, tiveram efeitos aproximados, com tendência de melhores resultados no meio MS, principalmente na segunda e terceira introduções *in vitro*.

Em explantes juvenis de *Eucalyptus grandis*, Andrade et al. (2006) observaram, aos 21 dias, a produção média de sete brotações por explante em meio JADS com a exposição dos explantes por 1 h em 200 mg L⁻¹ de BAP, antes da inoculação no meio. Correia (1993) obteve alta produção de brotações na multiplicação de *Eucalyptus grandis* em meio JADS, sendo os resultados superiores aos encontrados neste estudo para o mesmo meio de cultura, demonstrando que ajustes devem ser feitos para aumentar as taxas de multiplicação.

Em *Eucalyptus tereticornis*, Sharma e Ramamurthy (2000) verificaram bons resultados de proliferação de gemas em meio MS. Da mesma forma, Joshi et al. (2003) obtiveram de 20 a 25 gemas por explante, aos 150 dias em meio MS, em *Eucalyptus tereticornis* x *E. grandis*. Brondani et al. (2009), trabalhando com a multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunii* em meio MS, obtiveram estimativas médias de até 13 gemas por explante.

De modo geral, cada clone respondeu de forma específica ao meio de cultura, observando-se diferenças no “ranking” dos clones do meio MS para o meio JADS, exceto no clone C16, que foi superior aos demais, tanto no meio MS quanto no meio JADS, nas três introduções. Nos clones com apenas uma introdução *in vitro*, essa mudança no “ranking” também ocorreu, exceto no clone C03 de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*, assim como nos clones C26 e C27 de *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*.

Variações entre genótipos também têm sido obtidas em alguns trabalhos quanto às taxas de multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus* (CORREIA, 1993; BENNETT et al., 1994; SOBROSA e CORDER, 2003; BRONDANI et al., 2009), demonstrando ser esse fator que exerce grande influência na resposta *in vitro*.

Assim como neste estudo, Brondani et al. (2009) também observaram recalitrância na fase de multiplicação *in vitro* de um clone de *Eucalyptus benthamii* x

E. dunii. Isso evidencia a necessidade de ajustes nos protocolos de multiplicação *in vitro* para determinados genótipos que não se adaptaram às condições de cultivo.

Segundo Whitehouse et al. (2002), a hiper-hidricidade é frequentemente relatada na micropropagação de espécies lenhosas, podendo reduzir as taxas de multiplicação e a qualidade das brotações e levar a necrose dos tecidos. No entanto, neste estudo, a hiper-hidricidade não afetou decisivamente a taxa de multiplicação dos clones, exceto o C29, a partir do sexto subcultivo na primeira introdução *in vitro*, onde a hiper-hidricidade ocorreu com maior frequência.

A taxa de multiplicação mostrou tendência de aumento com os sucessivos subcultivos, porém decaindo, posteriormente, na maioria dos clones nas três introduções *in vitro*, assim como nos clones com apenas uma introdução. Bennet et al. (1994) observaram que clones de *Eucalyptus globulus* apresentaram bom crescimento inicial em meio de cultura contendo BAP, mas esse crescimento declinou após o terceiro ou quarto subcultivo. Quando aqueles autores usaram BAP e cinetina no meio de cultura, em subcultivos alternados, houve melhoria na taxa de multiplicação *in vitro* dos clones. Neste estudo, os subcultivos contínuos na mesma composição do meio de cultura podem ter sido uma das causas do declínio na taxa de multiplicação devido à falta de ajuste dos meios em alguns clones. Assim, a alternância dos subcultivos em meio de cultura com diferentes tipos ou doses de reguladores ou, mesmo, a alternância entre meios com diferentes composições salinas (JADS e MS) poderiam melhorar ou manter as taxas de multiplicação dos clones, sendo esse ponto merecedor de maiores estudos para ajustes na micropropagação dos híbridos de *Eucalyptus globulus*.

5. CONCLUSÕES

Os meios de cultura MS e JADS apresentaram-se adequados à multiplicação *in vitro* dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus* e *Eucalyptus grandis* x *E. globulus*, com tendência de melhores resultados do meio MS na segunda e terceira introduções *in vitro*.

A taxa de multiplicação variou entre subcultivos, apresentando tendência de aumento inicial e posterior queda da maioria dos clones e introduções *in vitro*.

A resposta à multiplicação *in vitro* variou entre genótipos, com clones que se adaptaram às condições de cultivo e outros que se mostraram recalcitrantes nessa fase da micropropagação.

6. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsas de estudo; e à empresa Celulose Nipo-Brasileira S.A. (CENIBRA), pelo apoio financeiro e pela disponibilização de material genético (clones).

7. REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 442p.
- ANDRADE, W. F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.12, p.1715-1719, 2006.
- ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**. Viçosa, MG: Suprema, 2007. p.93-121.
- BENNETT, I. J. et al. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. **Annals of Botany**, v.74, p.53-58, 1994.
- BILLARD, C. E.; LALLANA, V. H. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. **Ciencia, Docencia y Tecnología**, v.16, n.30, p.199-216, 2005.
- BRAVO, C. D. V. et al. Controle genético da regeneração *in vitro* em progênies de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2181-2185, 2008.
- BRONDANI, G. E. et al. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cabbage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Revista Árvore**, v.33, n.1, p.11-19, 2009.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v.1. p.183-260.
- CARDOSO, G. V. **Otimização do cozimento kraft para produção de celulose a partir de madeiras de *Eucalyptus globulus* com diferentes teores de lignina**. 2002. 147f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.
- CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação *Eucalyptus* spp. *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido**.: 1993. 113f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba, 1993.
- DEL PONTE, E. M. et al. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, v.25, n.1, p.1-8, 2001.
- ELDRIDGE, K. et al. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Clarendon Press, 1993. 288p.
- GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G.-J. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1. p.29-64.
- GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining gum). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, New York, v. 39, n. 3, p. 316-321, 2003.
- GLOCKE, P. et al. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* cv. ‘Urrbrae Gem’. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.42, n.2, p.139-143, 2006.
- GRAÇA, M. E. C. et al. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron na multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maid. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n.43, p.107-112, 2001.



- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v.1. p.183-260.
- HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 7.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880p.
- JOSHI, I. et al.. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). **Silvae Genetica**, v.52, n.3-4, p.110-113, 2003.
- LIMA, M. M.; GONÇALVES, A. N. Efeito do Thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus tereticornis*. **Scientia Forestalis**, n.53, p.49-56, 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- NUGENT, G. et al. Adventitious bud induction in *Eucalyptus globulus* Labill. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.37, n.3, p.388-391, 2001.
- QUISEN, R. C. **Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens***. 2007. 125f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- SANTOS, D. C. et al. **Alongamento *in vitro* de *Eucalyptus urophylla***. Colombo: CNPF/EMBRAPA, 2004. 4p. (Comunicado Técnico, 120)
- SHARMA, S. K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 5, p. 511-518, 2000.
- SOBROSA, R. C.; CORDER, M. P. M. Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas e raízes adventícias em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden *in vitro*. **Floresta e Ambiente**, v.10, n.1, p.58-68, 2003.
- WATT, M. P. et al. *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.75, n.3, p.233-240, 2003.
- WHITEHOUSE, A. B.; MARKS, T. R.; EDWARDS, G. A. Control of hyperhydricity in *Eucalyptus* axillary shoot cultures grown in liquid medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, n.3, p.245-252, 2002.
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 272p.
- XAVIER, A. A. et al. Resistência de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens* à ferrugem (*Puccinia psidii*). **Revista Árvore**, v.31, n.4, p.731-735, 2007.
- YANG, J.-C.; CHUNG, J.-D.; CHEN, Z.-Z. Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* and comparison of growth between micropropagated plantlets and rooted cuttings. **Plant Cell Reports**, v.15, n.3-4, p.170-173, 1995.