

## Meio de cultura, BAP e ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus globulus* Labill

Culture medium, BAP and NAA on *in vitro*  
multiplication of *Eucalyptus globulus* Labill clone

Germana Marcelino Cordeiro<sup>1</sup>, Gilvano Ebling Brondani<sup>2</sup>,  
Leandro Silva de Oliveira<sup>3</sup> e Marcílio de Almeida<sup>4</sup>

### Resumo

Dada a carência de estudos envolvendo a micropropagação de *Eucalyptus globulus* com fins de rejuvenescimento, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a multiplicação *in vitro* de gemas axilares de *E. globulus* sob a interação de diferentes meios de cultura (WPM, JADS e MS) e concentrações de BAP (0; 0,50 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0; 0,050 e 0,100 mg L<sup>-1</sup>). Após 84 dias, avaliou-se o número de gemas por explante. Os resultados demonstraram que a multiplicação *in vitro* de gemas de *E. globulus* é um processo extremamente regulado pela composição do meio e concentração de regulador vegetal. De modo geral, as melhores respostas, quanto a proliferação de gemas axilares, foram obtidas em meio nutritivo WPM suplementado com 0,7 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Além disso, houve variações entre genótipos.

**Palavras-chave:** micropropagação, rejuvenescimento, regulador vegetal, clonagem.

### Abstract

Given the lack of studies involving the micropropagation of *Eucalyptus globulus* with purpose of rejuvenation, the present study aimed to evaluate the *in vitro* multiplication of axillary buds of *E. globulus* under the interaction of different culture media (WPM, JADS and MS) and BAP (0; 0.50 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>) and NAA (0; 0.050 and 0.100 mg L<sup>-1</sup>) concentrations. After 84 days, we evaluated the number of buds per explant. The results showed that *in vitro* multiplication of *E. globulus* buds is a process highly regulated by media composition and concentration of the plant growth regulator. In general, the best results, as the proliferation of axillaries buds, were obtained in WPM culture media supplemented with 0.7 mg L<sup>-1</sup> BAP and 0.05 mg L<sup>-1</sup> NAA. In addition, there were variations among genotypes.

**Keywords:** micropropagation, reversion to juvenility, plant growth regulator, cloning.

### INTRODUÇÃO

O eucalipto é amplamente plantado no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste (PALUDZYSZYN FILHO et al., 2006). No entanto, as condições climáticas limitam a expansão nas regiões mais frias do Brasil, devido a ocorrência de temperaturas mais baixas e a geadas frequentes. Buscando contornar esse problema, o *Eucalyptus globulus* apresenta-se como alternativa para povoamento florestais destinados para finalidades industriais nessas regiões (XAVIER et al., 2007), além de ser uma espécie de grande interesse para a produção de papel e celulose

(ROSA, 2003; ALFENAS et al., 2004; XAVIER et al., 2007; BORGES et al., 2011).

Entretanto, o *E. globulus* é uma espécie considerada de difícil enraizamento adventício, dificultando a obtenção de mudas clonais. Desta forma, a micropropagação possibilita a reversão à juvenilidade de genótipos selecionados em programas de melhoramento genético, podendo obter elevada taxa de multiplicação aliado ao incremento do enraizamento (GONÇALVES, 1982; DUTRA et al., 2009; BORGES et al., 2011). O rejuvenescimento de *Eucalyptus* é obtido com sucessivos subcultivos do material vegetal na fase de multiplicação *in vitro* (ASSIS; MAFIA,

<sup>1</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas. USP – Universidade de São Paulo / ESALQ - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz - 13418-900, Piracicaba, SP. E-mail: [germanacordeiro@hotmail.com](mailto:germanacordeiro@hotmail.com)

<sup>2</sup>Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Florestal. UFMT - Universidade Federal de Mato Grosso - Faculdade de Engenharia Florestal - 78060-900 – Cuiabá, MT. E-mail: [gebrondani@yahoo.com.br](mailto:gebrondani@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Pós-doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais. Universidade Federal de Mato Grosso - Faculdade de Engenharia Florestal - 78060-900, Cuiabá, SP. E-mail: [leandrooliveiraufv@yahoo.com.br](mailto:leandrooliveiraufv@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Professor Assistente do Departamento de Ciências Biológicas. Universidade de São Paulo / ESALQ - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz - 13418-900, Piracicaba, SP. E-mail: [mdalmeida@usp.br](mailto:mdalmeida@usp.br)

2007). Uma das maiores exigências do uso desta fase tem sido ajustar e aperfeiçoar o processo de cultivo *in vitro*, em especial, a composição do meio, as combinações e concentrações de reguladores de crescimento.

Sabe-se que o meio de cultura deve promover condições adequadas ao crescimento e desenvolvimento *in vitro* do tecido vegetal. Os meios de cultura se baseiam nas exigências nutricionais das plantas, sendo adequados às necessidades de cada espécie e etapas *in vitro* (SANTOS-SEREJO et al., 2006; FICK, 2007). De acordo com Brondani et al. (2009), dentre os meios de cultura mais utilizados para a micropropagação de *Eucalyptus*, destacam-se o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), JADS (CORREIA et al., 1995) e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980).

Quanto ao uso de reguladores vegetais, para a fase de multiplicação de gemas de *Eucalyptus*, as auxinas e citocininas são os mais utilizados, com destaque ao BAP (benzilaminopurina) e ao ANA (ácido naftalenoacético), acrescidos aos meios de cultura nas mais variadas combinações (BRONDANI et al., 2009; DEL PONTE et al., 2001; DUTRA et al., 2009; GEORGE et al., 2008; HARTMANN et al., 2011; BRONDANI et al., 2012).

A multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus* tem sido descrita na literatura (BISHT et al., 1999; JOSHI et al., 2003; GLOCKE et al., 2006; ALMEIDA et al., 2007; BRONDANI et al., 2009; BRONDANI et al., 2012). Entretanto, há necessidade de maiores estudos, para algumas espécies do gênero, envolvendo a micropropagação clonal dessa espécie com fins de rejuvenescimento *in vitro*. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a multiplicação *in vitro* de gemas axilares de *E. globulus* sob a interação de diferentes meios de cultura e reguladores vegetais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta das brotações e preparo dos explantes

As minicepas dos clones de *Eucalyptus globulus* (USP 01; USP 24 e USP 33) propagadas por estaquia, regatados a campo com 11 anos de idade, foram pulverizadas com fungicida CERCONIL 500 WP® a 0,2 g L<sup>-1</sup> (p/v) aos 7 e 14 dias previamente a coleta das brotações. As brotações utilizadas foram provenientes da segunda coleta, as quais foram mantidas úmidas até a retirada das folhas. Em laboratório, realizou-se o preparo dos explantes (segmento nodal) com

a remoção das folhas e lavagem superficial com água deionizada.

### Estabelecimento *in vitro*

Segmentos nodais da porção mediana da brotação, contendo um par de gemas axilares, com as folhas removidas (tamanho médio de 1,5 cm) foram lavados em água corrente durante 10 minutos. Posteriormente, os explantes foram imersos em solução hidroalcoólica 70% (água:álcool, v/v) por 10 segundos, enxaguados com água deionizada e autoclavada e, submetidos em solução de fungicida CERCONIL 500 WP® a 0,2 g L<sup>-1</sup> (p/v) acrescida de duas gotas de Tween 20 (0,05% v/v) durante 10 minutos. Os explantes foram enxaguados novamente com água deionizada e desinfestados em solução de cloro ativo (NaOCl) 1,0% (v/v) acrescida de duas gotas de Tween 20 (0,05% v/v) durante 5 minutos. Ao final do tratamento, foram enxaguados três vezes com água deionizada e autoclavada e inoculados no meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), isento de reguladores vegetais, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 5 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,8, previamente autoclavado a temperatura de 121 °C (~ 1,0 kgf cm<sup>-2</sup>) durante 20 minutos.

Os explantes foram cultivados por 30 dias em sala de crescimento com as condições controladas de temperatura (23± 2 °C), fotoperíodo (16 horas) e radiação fotossinteticamente ativa (40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Transcorrido este período os explantes que não apresentaram contaminação fúngica, bacteriana e/ou oxidação, contendo de uma a três gemas foram utilizadas no experimento de multiplicação.

### Multiplicação de gemas

A multiplicação *in vitro* das gemas foi realizada inoculando as brotações axilares em três diferentes meios de cultura: MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) e JADS (CORREIA et al., 1995), os quais foram suplementados com diferentes concentrações de benzilaminopurina (BAP) (0; 0,50 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) combinadas com concentrações de ácido naftalenoacético (ANA) (0; 0,050 e 0,100 mg L<sup>-1</sup>). A cada 21 dias foram realizados os subcultivos dos explantes para novo meio de cultura, mantendo-se os tratamentos, durante 10 subcultivos. O número de gemas induzidas por explante foi avaliado aos 84 dias após a inoculação em meio de multiplicação. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casu-

alizado em arranjo fatorial (3x3x3x3), com três clones, três meios de cultura, três concentrações de BAP combinadas com três concentrações de ANA, contendo cinco repetições de um explante.

O meio de cultura foi preparado com água deionizada, adicionando-se 5 g L<sup>-1</sup> de ágar e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 com HCl (0,1M) e NaOH (0,1M) previamente à adição do ágar ao meio nutritivo, e então autoclavado a temperatura de 121 °C (~ 1,0 kgf cm<sup>-2</sup>) durante 20 minutos. Os explantes foram subcultivados em tubos de ensaio de 10 x 2 cm, contendo 7 mL de meio de cultura e mantidos em sala de incubação com condições controladas de temperatura 23 °C (± 2 °C), fotoperíodo (16 horas) e radiação fotossinteticamente ativa de 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. O BAP e ANA foram adicionados ao meio de cultura antes da autoclavagem.

#### Análise estatística dos dados

Os dados mensurados do experimento foram submetidos ao teste de Hartley ( $P < 0,05$ ) e, em seguida, realizada análise de variância (ANOVA,  $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ ). De acordo com a significância, os dados dos fatores qualitativos foram comparados pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) e, os dados dos fatores quantitativos foram submetidos à análise de regressão polinomial ( $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ ). Os pacotes SOC (EMBRAPA, 1990) e R (R Development Core Team, 2012) foram utilizados para a análise estatística dos dados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A interação entre o clone, meio e concentrações de BAP e ANA foi significativa pela análise de variância (Tabela 1). O clone USP 01 apresentou número médio de 6 gemas (Fig. 1A), 5 gemas (Fig. 1B) e 4 gemas por explante (Fig. 1C) quando cultivado nos meios WPM, JADS e MS, respectivamente. O clone USP 24 apresentou 13 gemas induzidas por explante quando cultivado em meio nutritivo WPM (Fig. 2A), 23 gemas em meio JADS (Fig. 2B) e 4 gemas em MS (Fig. 2C). Finalmente, o clone USP 33 apresentou 20 gemas por explante em WPM (Fig. 3A), aproximadamente 14 gemas em JADS (Fig. 3B) e 19 gemas em MS (Fig. 3C), sendo este, o clone que emitiu maior número de gemas em relação aos demais, quando considerado mesmo tempo de cultivo *in vitro* (84 dias), demonstrando ser um material mais responsivo durante a fase de multiplicação.

A multiplicação *in vitro* de *E. globulus* sob diferentes combinações de ANA e BAP, revelaram que as concentrações próximas a 0,7 mg L<sup>-1</sup> de BAP e

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância do número de gemas emitidas por explante de *E. globulus* cultivados *in vitro* em função do clone, meio de cultura e concentrações combinadas de reguladores de crescimento, aos 84 dias de cultivo *in vitro*.

**Table 1.** Summary of the analysis of variance of the number of buds per explant issued *E. globulus* grown *in vitro* according to clone, culture media and combined concentrations of growth regulators, after 84 days of *in vitro* culture.

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios NG <sup>(1)</sup> (gemas explante <sup>-1</sup> )
Clone (CLO)	2	77,6048**
Meio (MEI)	2	9,4294**
BAP	2	104,2812**
ANA	2	0,0109 <sup>ns</sup>
CLOxMEI	4	13,3404**
CLOxBAP	4	4,9932**
CLOxANA	4	0,8598 <sup>ns</sup>
MEIxBAP	4	2,4418**
MEIxANA	4	0,2427 <sup>ns</sup>
BAPxANA	4	0,3021 <sup>ns</sup>
CLOxMEIxBAP	8	3,7683**
CLOxMEIxANA	8	1,5312**
CLOxBAPxANA	8	0,6236 <sup>ns</sup>
MEIxBAPxANA	8	0,9331*
CLOxMEIxBAPxANA	16	1,4266**
Resíduo	329	0,4544
Média	-	8,26
CVexp.(%)	-	26,32

<sup>ns</sup> valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

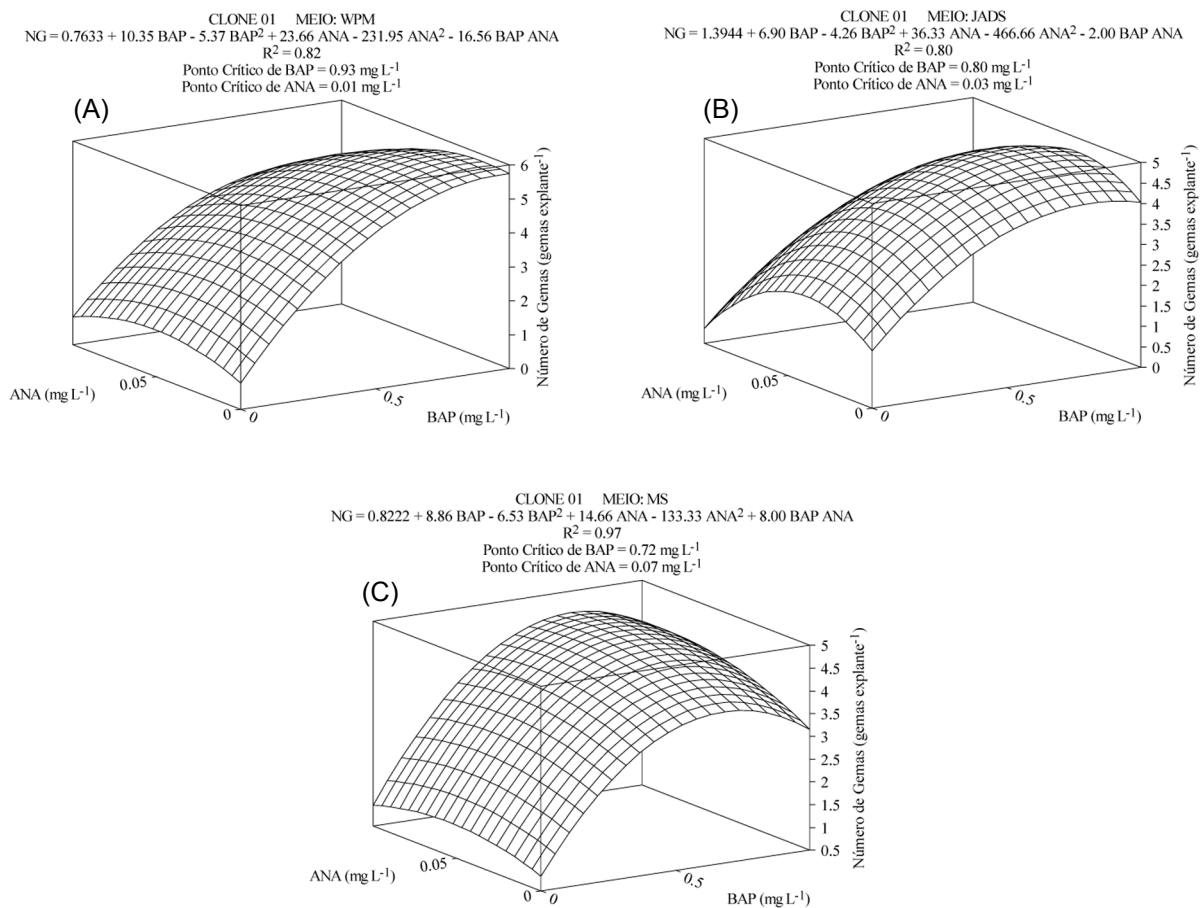
\* e \*\* valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F.

<sup>(1)</sup> dados transformados por  $n^{0.5}$  onde  $n$  = dado coletado.

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental, NG = número de gemas.

0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA no meio de cultura WPM, mostraram-se mais eficientes para a obtenção de gemas axilares em quantidade e qualidade adequadas. Em contrapartida, Bennett et al. (1994) ao trabalhar com segmentos nodais de árvores de 4-5 anos de idade de *E. globulus*, observaram decréscimos na média de gemas multiplicadas por explante nas concentrações de BAP acima de 2,5 μmol (0,56 mg L<sup>-1</sup>) em meio MS.

Graça et al. (2001), ao compararem o efeito de BAP e thidiazuron (TDZ) na multiplicação *in vitro* de brotações de *E. dunnii*, relataram que BAP apresentou efeito superior quanto à produção de brotações, e minimizou a formação de calos. Esse mesmo comportamento foi relatado por Andrade et al. (2006) na multiplicação de *E. grandis* sob o estímulo de BAP, observando que concentrações elevadas dessa citocinina promovem ação inibitória na multiplicação de *Eucalyptus* spp., corroborando ao observado por Del Ponte et al. (2001), Brondani et al. (2011) e Brondani et al. (2012), uma vez que, o efeito da concentração dos regula-



**Figura 1.** Valores médios do número de gemas (NG) por explante do clone USP 01 de *E. globulus* em relação aos meios de cultura (WPM, JADS e MS) e concentrações de BAP e ANA, aos 84 dias de cultivo *in vitro*. (A) Em meio de cultura WPM, (B) Em meio de cultura JADS e (C) Em meio de cultura MS.

**Figure 1.** Mean values for the number of buds (NG) for explants of clone 01 *E. globulus* regarding to the culture media (WPM, JADS and MS) and concentrations of BAP and NAA after 84 days of *in vitro* culture. (A) In culture media WPM, (B) culture media JADS and (C) in culture media MS.

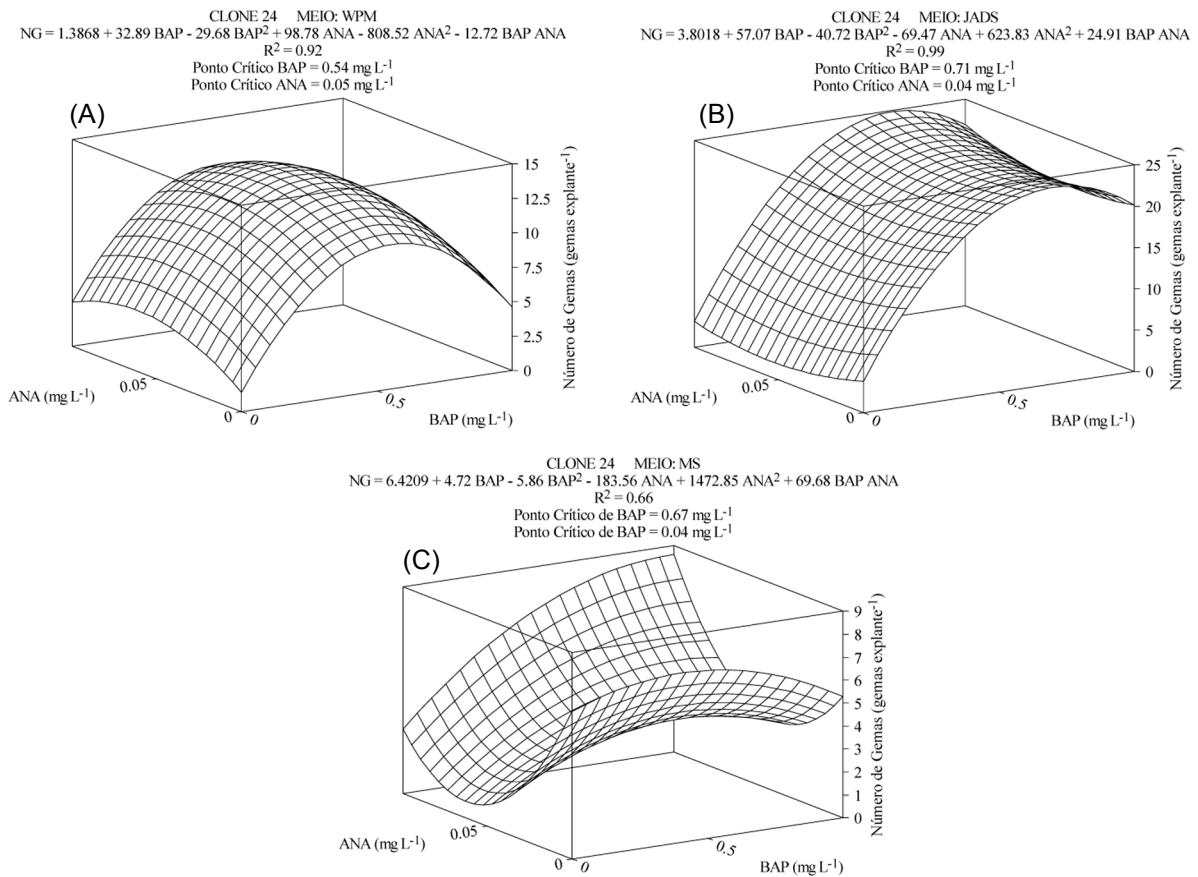
dores de crescimento varia de acordo com a espécie (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Pode-se observar que a presença de ANA promoveu resultados positivos quanto a produção de brotações ao interagir em determinadas concentrações com o BAP. Esse comportamento está de acordo com as observações de George (1993), segundo o qual o balanço entre citocininas e auxinas regula a fase de proliferação de gemas axilares. Joshi et al. (2003) verificaram de 20 a 25 gemas por explante aos 150 dias em meio MS na concentração de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP combinado com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA para *E. terebinthifolia* x *E. grandis*. Resultados semelhantes foram obtidos por Bisht et al. (1999) para *E. terebinthifolia* x *E. camaldulensis*, onde a maior taxa de multiplicação para todos os clones ocorreu nas combinações de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, aos 120 dias de cultivo em meio MS.

Dessa forma, pode-se inferir que as citocininas são indispensáveis para a quebra de dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares, sendo a sua concentração e

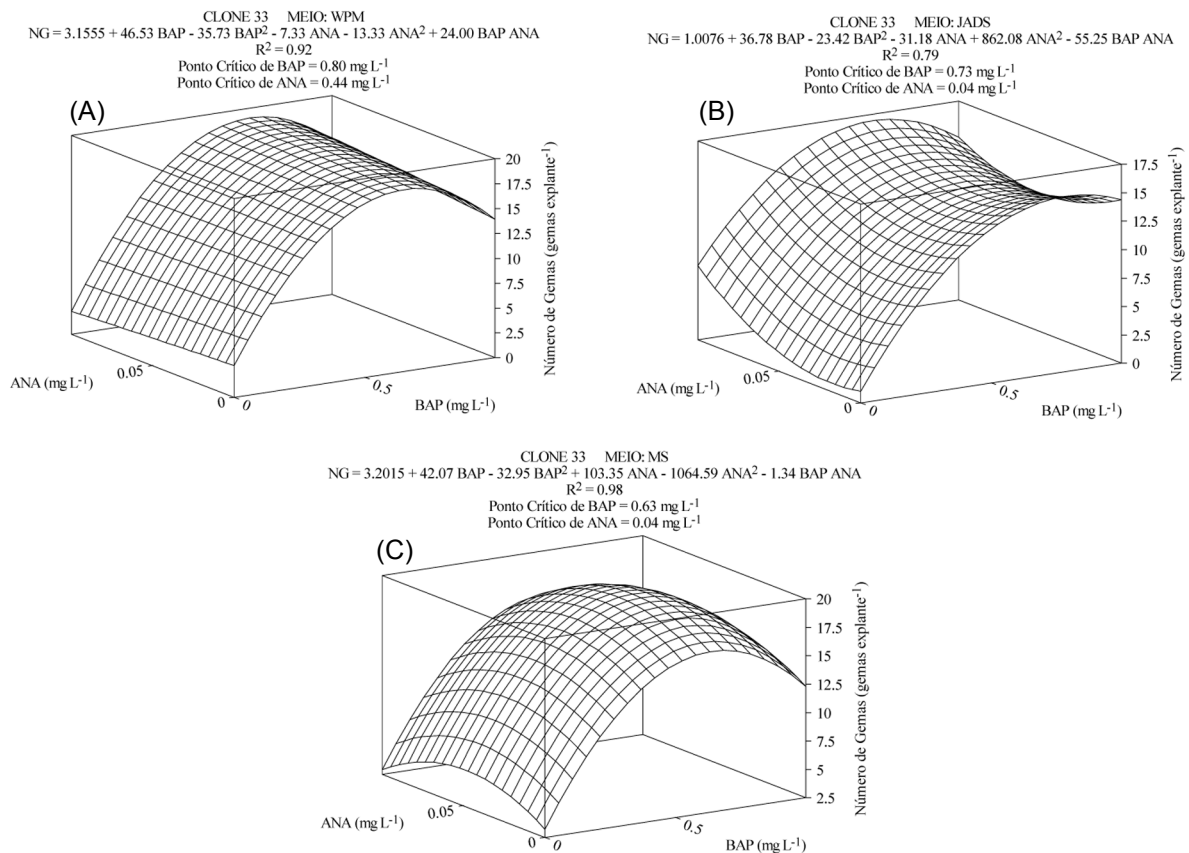
a combinação com as auxinas os fatores que mais influenciaram o sucesso da multiplicação *in vitro* de *E. globulus*, que também foi afetada de maneira diferenciada pelos meios de cultura.

A clorose de folhas dos clones USP 01 e USP 24 foi mais característica em meio nutritivo MS, independente da combinação de regulador de crescimento avaliada. Este fato não foi verificado nas folhas dos clones de *E. globulus* quando cultivados nos meios WPM e JADS, os quais corresponderam as melhores características morfológicas (Fig. 4), tanto em termos de formação de gemas, quanto em relação ao padrão de desenvolvimento de folhas, apresentando epiderme, mesofilo, xilema e floema com crescimento ao longo do tempo. A insuficiência na quantidade de um determinado elemento químico essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta, ou combinações que o tornem pouco disponível, provocará distúrbios no metabolismo, que podem ser evidenciados externamente por meio da redução do crescimento, clorose foliar ou outras anomalias (HARTMANN et al., 2011).



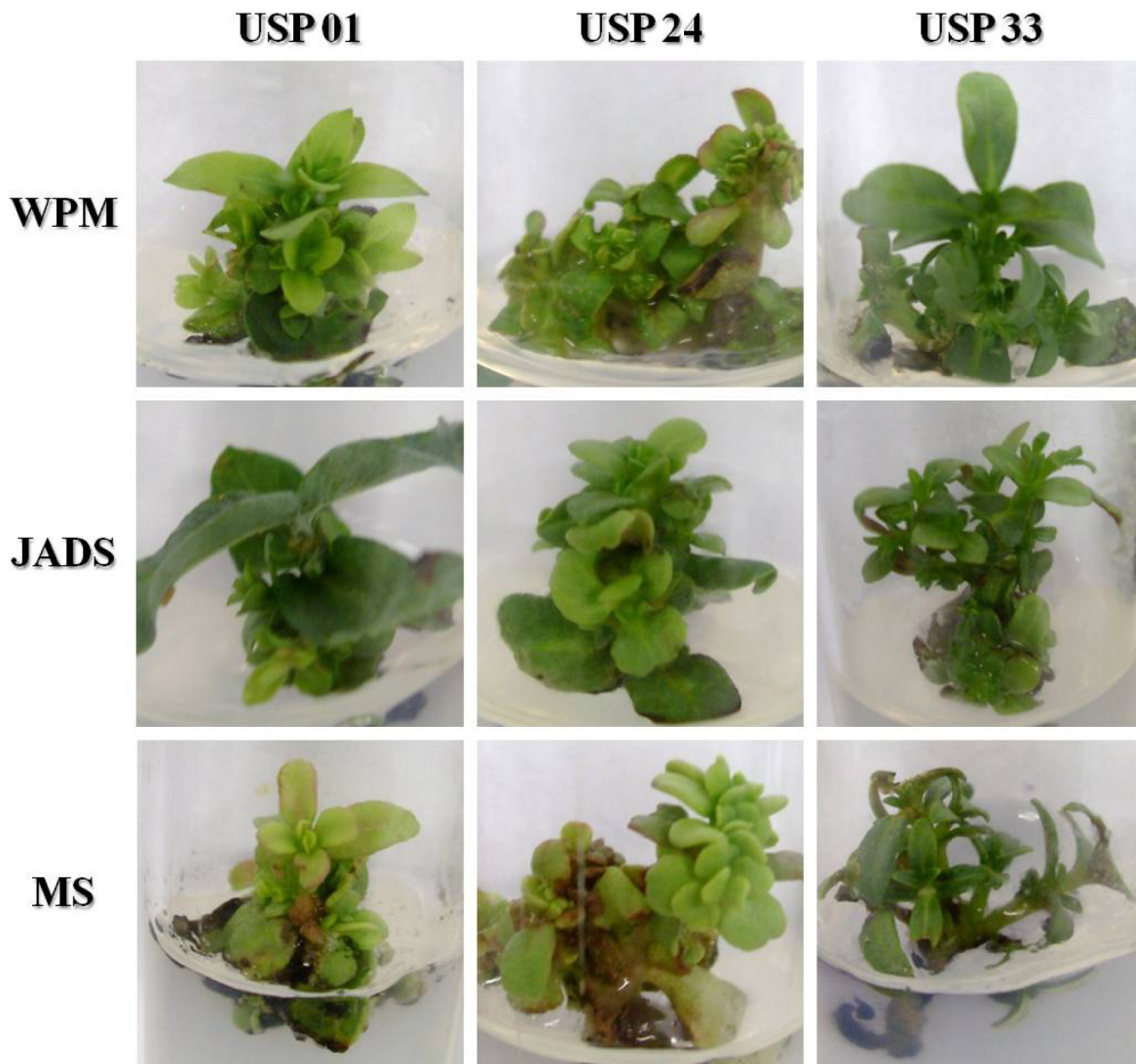
**Figura 2.** Valores médios do número de gemas (NG) por explante do clone USP 24 de *E. globulus* em relação aos meios de cultura (WPM, JADS e MS) e concentrações de BAP e ANA, aos 84 dias de cultivo *in vitro*. (A) Em meio de cultura WPM, (B) Em meio de cultura JADS e (C) Em meio de cultura MS.

**Figure 2.** Mean values for the number of buds (NG) for explants of clone 24 *E. globulus* regarding to the culture media (WPM, JADS and MS) and concentrations of BAP and NAA after 84 days of *in vitro* culture. (A) In culture media WPM, (B) culture media JADS and (C) in culture media MS.



**Figura 3.** Valores médios do número de gemas (NG) por explante do clone USP 33 de *E. globulus* em relação aos meios de cultura (WPM, JADS e MS) e concentrações de BAP e ANA, aos 84 dias de cultivo *in vitro*. (A) Em meio de cultura WPM, (B) Em meio de cultura JADS e (C) Em meio de cultura MS.

**Figure 3.** Mean values for the number of buds (NG) for explants of clone 33 *E. globulus* regarding to the culture media (WPM, JADS and MS) and concentrations of BAP and NAA after 84 days of *in vitro* culture. (A) In culture media WPM, (B) culture media JADS and (C) in culture media MS.



**Figura 4.** Microcepas dos três clones avaliados de *Eucalyptus globulus* cultivadas em diferentes meios de cultura. Observa-se clorose de folhas dos clones USP 01 e USP 24 mais característica em meio nutritivo MS.

**Figure 4.** Microstumps of the three clones of *Eucalyptus globulus* grown in different culture media. Observed chlorose of leaves in USP 01 and USP 24 clones most characteristic in the media MS.

Cabe salientar que a elevada presença de microrganismos endófitos pode ter ocasionado a competição por nutrientes retardando o crescimento e emissão das gemas axilares quando se utilizou o meio nutritivo JADS, exceto para o clone USP 24. Até o momento não se sabe qual o fator ou fatores que desencadeiam a manifestação bacteriana no meio de cultura, levanta-se apenas a hipótese, que esses endófitos permanecem latentes *in vitro*, sem causar sintomas nas microplantas e posteriormente passam a competir por nutrientes minerais e carboidratos do meio de cultura, comprometendo a multiplicação e o desenvolvimento das plantas (BATAGIN-PIOTTO, 2013).

De acordo com as características avaliadas e pela análise das equações ajustadas, observou-se respostas diferenciadas quanto a multiplicação *in vitro* dos clones nos diferentes meios de cultura. Assim, evidenciou-se maior especificidade

dos genótipos quanto aos meios de cultura, relação que não foi acentuada para os reguladores de crescimento. A resposta ao tipo e composição do meio de cultura varia não somente de acordo com a espécie, mas entre genótipos de uma mesma espécie e até entre explantes de um mesmo genótipo, que apresentam demandas específicas (SOUZA et al., 2006; BRONDANI et al., 2012). Correia et al. (1995) verificaram a importância da especificidade do meio de cultura para cada material genético, quando se deseja a proliferação de gemas com uniformidade e vigor.

Portanto, os resultados obtidos demonstram a eficiência do protocolo de multiplicação *in vitro* dos clones de *E. globulus*. Posteriormente, maiores estudos ajustando as relações nutricionais dos meios de cultura às necessidades específicas de cada clone permitirão aprimorar ainda mais a técnica de micropropagação.

## CONCLUSÕES

A multiplicação *in vitro* de *E. globulus* é um processo extremamente regulado pela composição do meio e concentração de regulador vegetal, em que as melhores respostas foram obtidas em meio nutritivo WPM suplementado com 0,7 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA. Além disso, houve variações entre genótipos, sendo o clone 33 superior aos demais quanto ao número de brotações.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 2004. 442 p.
- ALMEIDA, F. D.; XAVIER, A.; DIAS, J. M. M.; PAIVA, H. N. Eficiência das auxinas (AIB e ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 455-463, 2007.
- ANDRADE, W. F.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1715-1719, 2006.
- ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**. Viçosa: [s.n.], 2007. p. 93-121.
- BATAGIN-PIOTTO, K. D. **Avaliação da atuação da manifestação bacteriana no desenvolvimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage**. 2013. 157 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- BENNETT, I. J.; McCOMB, J. A.; TONKIN, C. M.; McDAVID, D. A. J. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. *Annals of Botany*, London, v. 74, n. 1, p. 53-58, 1994.
- BISHT, P.; SHARMA, V. K.; JOSHI, I.; KAPOOR, M. L. Micropropagation of newly produced F1 hybrid of *Eucalyptus* (*E. tereticornis* Sm. x *E. camaldulensis* Dehn. Southern Form). *Silvae Genetica*, Frankfurt, v. 48, n. 2, p. 104-108, 1999.
- BORGES, S. R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; MELO, L. A.; ROSADO, A. M. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 35, n. 3, p. 425-434, 2011.
- BRONDANI, G. E.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F.; WENDLING, I.; HORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.
- BRONDANI, G. E.; GROSSI, F.; DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; HANSEL, F. A. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, v. 33, n. 4, p. 655-663, 2011.
- BRONDANI, G. E.; WIT ONDAS, H. W.; BACCARIN, F. J. B.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, Columbia v. 48, n. 5, p. 478-487, 2012.
- CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. Y. Z.; RIBEIRO, M. C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. *IPEF*, Piracicaba, n. 48/49, p.107-116, 1995.
- DEL PONTE, E. M.; MATTEI, V. L.; PETERS, J. A.; ASSIS, T. F. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2001.
- DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, n. 58, p. 49-59, 2009.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Programa SOC - software científico: versão 2.1**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 1990.

- FICK, T. A. **Estabelecimento *in vitro* e propagação de *Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel (louro-pardo)**. 2007. 61 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. 2.ed., Edington: Exegetics, 1993. v.1.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; De KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Netherlands: Springer, 2008. v. 1, 501 p.
- GLOCKE, P.; DELAPORTE, K.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* cv. 'urubrae gem'. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 42, p. 139-143, 2006.
- GONÇALVES, A. N. **Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophilla* S. T. Blake *in vitro***. 1982. 97 p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1982.
- GRAÇA, M. E. C.; KALIL FILHO, A. N.; MEDEIROS, A. C. S.; TAVARES, F. R. Efeitos das citocininas benzilamino purina e thidiazuron na multiplicação "*in vitro*" de brotações de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 43, p. 107-112, 2001.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/SPI: CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 8.ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2011. 915 p.
- JOSHI, I.; BISHT, P.; SHARMA, V. K.; UNIYAL, D. P. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *E. grandis* Hill ex. Maiden). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 52, n. 3/4, p. 110-113, 2003.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society**, Ashville, v. 30, p. 412-427, 1980.
- MURASHIGE T., SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kopenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T.; FERREIRA, C. A. **Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná**. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2006. 45 p. (Documentos, 129).
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **An introduction to R**. Notes on R: a programming environment for data analysis and graphics. Version 2.15.1. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 18 out. 2012
- ROSA, C. A. B. **Influência do teor de lignina da madeira de *Eucalyptus globulus* na produção e na qualidade de celulose Kraft**. 2003. 140 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.
- SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOARES, T. L.; SILVA, K. M. Meios nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUSA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**, Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 79-98.
- SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; FARIA, G. A.; NETO, H. P. S.; SANTOS SEREJO, J. S.; SILVA, K. M.; COSTA, M. A. P. C.; SOARES, T. L.; JUNGHANS, T. G.; ALMEIDA, W. B. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 38-52.
- XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (Ed.) **Biotecnologia florestal**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2007. p. 55-74.

Recebido em 29/07/2013

Aceito para publicação em 25/04/2014