

# A Micropropagação de Eucalipto

Leonardo Ferreira Dutra<sup>(1)</sup>, Ivar Wendling<sup>(2)</sup>, Gilvano Ebling Brondani<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Embrapa Clima Temperado, Rodovia BR 392, Km 78, Caixa Postal 403, CEP 96.001-970, Pelotas-RS. E-mail: leo@cpact.embrapa.br;

<sup>(2)</sup> Embrapa Florestas, Estrada da Ribeira, Km 111, Caixa Postal 319, CEP 83.411-000, Colombo-PR. E-mail: ivar@cnpf.embrapa.br;

<sup>(3)</sup> Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP, Av. Pádua Dias, 11, Caixa Postal 9, CEP 13.418-900, Piracicaba-SP. E-mail: gebrondani@yahoo.com.br

**Resumo** - O eucalipto é o gênero florestal mais pesquisado em micropropagação, entretanto, são poucos os resultados efetivos obtidos com sua multiplicação contínua. A micropropagação inclui a desinfestação e cultivo dos explantes em meio nutritivo e condições assépticas, a multiplicação dos propágulos em sucessivos subcultivos e o enraizamento *in vitro* ou *ex vitro*. Como vantagens, possibilita: alto rendimento por planta matriz; obtenção de plantas isentas de viroses; produção de mudas em qualquer época do ano; produção intensiva de mudas sadias, em curto período de tempo e espaço reduzido; clonagem de plantas de difícil propagação vegetativa por métodos convencionais como estaquia e miniestaquia; e preservação de plantas matrizes sem riscos de infecção. Suas desvantagens incluem a dependência de um laboratório de cultura de tecidos, cuja manutenção implica em altos custos, além da exigência de mão-de-obra altamente especializada; elevada possibilidade de contaminação; variação de condições entre e dentro de clones; dificuldade de encontrar o meio adequado para a espécie desejada; e possibilidade de ocorrência de mutações, como resultado do uso de fitorreguladores. Embora tenha alto custo em comparação a outros métodos de clonagem, a micropropagação de eucalipto é estratégica para manter material vegetal superior *in vitro* ou para abastecer o microjardim clonal.

**Termos para indexação:** *Eucalyptus* spp., cultura de tecidos, cultivo *in vitro*, produção de mudas.

## The Eucalipt Micropropagation

**Abstract** - The *Eucalyptus* is the genus that has the highest number of researches in micropropagation. However, there are few effective results obtained with their continuous proliferation. Micropropagation includes disinfection and culture of explants in nutrient medium and aseptic conditions, multiplication in successive subcultures and *in vitro* or *ex vitro* rooting. As advantages, the micropropagation allows: high yield per donor plant, free-virus plants, production of saplings at any time of the year, intensive production of healthy saplings in a short period of time and in a limited space, cloning of plants difficult-to-propagate by conventional methods, such as cutting and minicutting, and donor plant preservation without risk of infection. Its disadvantages include the dependence on a tissue culture laboratory, which results in high maintenance costs, as well as the requirement of highly trained workers, high possibility of contamination, variation of conditions within and among clones, the difficulty of finding appropriate culture medium for the species desired and possibility of mutation as a result of the use of growth regulators. Despite having high cost when compared to other cloning methods, the species and hybrids of eucalypt micropropagation is strategic to maintain superior plant material *in vitro* or to supply the micro-clonal hedge.

**Index terms:** *Eucalyptus* spp., tissue culture, *in vitro* culture, production of plants.

### Introdução

O eucalipto é o gênero florestal que mais possui estudos de micropropagação. Os primeiros trabalhos relatados com o cultivo *in vitro* de eucalipto datam da década de 60 e somente no final dessa ocorreu o primeiro relato de sucesso na regeneração de plântulas de *Corymbia citriodora* (= *E. citriodora*), feito por Aneja

e Atal (1969). A partir desse momento, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com os mais variados objetivos e resultados obtidos.

Segundo Chaperon (1987), existem três situações em que a micropropagação de eucalipto tem sido recomendada: 1) quando outras técnicas de propagação vegetativa não apresentam resultados satisfatórios para determinadas espécies; 2) quando a árvore selecionada

não pode ser rejuvenescida por meio da promoção de brotações basais; e 3) quando se deseja aumentar a taxa de propagação e abreviar o tempo para seu uso comercial.

Diversas espécies de eucalipto e híbridos interespecíficos já foram estudados *in vitro*, tais como: *E. alba*, *E. badjensis*, *E. bancroftii*, *E. benthamii*, *E. botryoides*, *E. bridgesiana*, *E. calophylla*, *E. camaldulensis*, *E. cladocalyx*, *E. cloeziana*, *E. coccifera*, *Corymbia citriodora* (= *E. citriodora*), *E. curtisii*, *E. dalrympleana*, *E. deglupta*, *E. delegatensis*, *E. diversicolor*, *E. dunnii*, *E. erythronema*, *E. ficifolia*, *E. gamphocephala*, *E. globulus*, *E. grandis*, *E. gunnii*, *E. henryi*, *E. impensa*, *E. laevopinea*, *E. leichow*, *E. macarthurii*, *E. macrorhyncha*, *E. maculata*, *E. marginata*, *E. megacarpa*, *E. melliodora*, *E. microcorys*, *E. microtheca*, *E. namely*, *E. nicholii*, *E. nitens*, *E. nova anglica*, *E. obtusiflora*, *E. occidentalis*, *E. oreades*, *E. paucliflora* (= *E. niphophila*), *E. pellitta*, *E. phylaxis*, *E. polybractea*, *E. radiata*, *E. regnans*, *E. resinifera*, *E. robusta*, *E. rubida*, *E. rudis*, *E. saligna*, *E. sargentii*, *E. sideroxyylon*, *E. smithii*, *E. stricklandii*, *E. stuartiana* (= *E. ovata*), *E. tereticornis*, *E. torelliana*, *E. urnigera*, *E. urophylla*, *E. viminalis*, *E. viridis*, *E. wandoo*, *E. youmanii*, *Eucalyptus x Trabutti*, *E. camaldulensis x E. tereticornis*, *E. dunnii x E. sp.*, *E. erythronema x E. stricklandii*, *E. grandis x E. camaldulensis*, *E. grandis x E. nitens*, *E. grandis x E. robusta*, *E. grandis x E. tereticornis*, *E. grandis x E. urophylla*, *E. gunnii x E. dalrympleana*, *E. gunnii x E. globulus*, *E. macarthurii x E. grandis*, *E. tereticornis x E. camaldulensis*, *E. tereticornis x E. grandis*, *E. torelliana x E. citriodora*, *E. urophylla x E. grandis*.

Entretanto, são poucos os resultados efetivos obtidos com a multiplicação contínua de espécies desse gênero. Assim, o uso da micropropagação na produção comercial de mudas de eucalipto ainda não se justifica técnica e economicamente, sendo indicada, principalmente, para o rejuvenescimento de clones selecionados em laboratório, para espécies e híbridos de alto valor comercial e de difícil enraizamento. Embora a micropropagação tenha se mostrado tecnicamente viável na clonagem de espécies recalcitrantes, não foi viável sob ponto de vista econômico para uso em larga escala (ASSIS; MAFIA, 2007).

Atualmente, as aplicações da propagação *in vitro* de eucalipto são: produção massal de genótipos selecionados, conservação de germoplasma e como veículo para pesquisas com genética molecular (WATT et al., 2003b).

## Objetivos da Micropropagação de Eucalipto

Um dos objetivos da micropropagação é a necessidade de clonar espécies ou híbridos que tenham altas taxas de crescimento, tolerância a baixas temperaturas e salinidade, resistência a pragas e doenças. Também pode haver interesse em micropropagar espécies com interesse horticultural, como *E. ficifolia*; para produção de óleo, no caso de *Corymbia citriodora* (= *E. citriodora*); e espécies raras ou com risco de extinção, como *E. carnabyi* (McCOMB; BENNETT, 1986).

Outra importante vantagem é o rejuvenescimento de árvores adultas selecionadas, visto que se tem comprovado que o potencial de enraizamento de propágulos de árvores adultas aumenta com os sucessivos subcultivos *in vitro*.

O rejuvenescimento ou revigoramento de tecidos adultos pode ser obtido via micropropagação por sucessivos subcultivos *in vitro* (GONÇALVES, 1982; BONGA; VON ADERKAS, 1992; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Assis e Mafia (2007) relatam que o subcultivo sucessivo de tecidos adultos melhora o enraizamento. Complementam, ainda, que a micropropagação promove a homogeneização fisiológica dos tecidos, seja em potencial de enraizamento ou qualidade do sistema radicular.

O aumento do número de subcultivos no cultivo *in vitro* de eucalipto restaura as características juvenis, como o maior potencial de enraizamento (CHAPERON, 1987; XAVIER; COMÉRIO, 1996, 1997; ASSIS, 1996). De acordo com Alfenas et al. (2004), o rejuvenescimento ou pelo menos o restabelecimento da competência ao enraizamento é obtido, geralmente, após 10-12 subcultivos. Semelhante recomendação foi feita por Xavier et al. (2007), para os quais um mínimo de 12 subcultivos devem ser feitos, quando o objetivo é o rejuvenescimento de clones de eucalipto selecionados na idade adulta e a melhoria do potencial de enraizamento.

Mesmo com suas limitações, a micropropagação de espécies e híbridos de eucalipto faz parte do processo de produção de mudas em algumas empresas florestais. Normalmente, as mudas obtidas por micropropagação são mantidas em condições *in vitro* por questões estratégicas, no caso de material vegetal superior, ou servem para abastecer o mini/microjardim clonal.

## O Processo de Micropropagação de Eucalipto em Etapas

As fontes de explantes para inoculação *in vitro* provêm de matrizes cultivadas em ambiente protegido, mini ou microjardim clonal, brotações epicórmicas de árvores adultas, brotações de árvores decepadas ou ainda de galhos podados.

As etapas da micropropagação seguem um procedimento padrão, no qual os explantes oriundos de material vegetal coletado no campo necessitam de limpeza e desinfestação prévia à inoculação no meio de cultura. Após o estabelecimento *in vitro*, os explantes são multiplicados, alongados, enraizados *in vitro* ou *ex vitro* e finalmente aclimatizados em ambiente *ex vitro*.

Os estágios da micropropagação incluem a seleção, desinfestação e cultivo dos explantes em meio nutritivo e condições assépticas; a multiplicação dos propágulos em sucessivos subcultivos; e o enraizamento das partes aéreas em meio de enraizamento com subsequente aclimatização em ambiente *ex vitro* (MURASHIGE, 1974).

### Desinfestação

O estabelecimento *in vitro* é uma etapa determinante no processo de micropropagação, principalmente se os explantes são oriundos de plantas no campo, em função de altas taxas de contaminação dos tecidos (ALFENAS et al., 2004). Para esses autores, uma alternativa é a associação com a enxertia, pois os enxertos podem ser mantidos em ambientes protegidos, otimizando os pré-tratamentos, como a desinfestação.

A desinfestação superficial de explantes de eucalipto para cultura *in vitro* é relativamente fácil quando é utilizado material juvenil e retirado de plantas cultivadas em ambientes protegidos. Todavia, é mais difícil de obter material limpo e viável de brotações oriundas de árvores mantidas em condições de campo (McCOMB; BENNETT, 1986).

Os procedimentos de desinfestação podem variar em função do tipo e origem do explante, da época do ano e do ambiente onde são coletados os explantes. Para explantes oriundos de brotações originárias da decepta de árvores matrizes de *E. benthamii*, com 17 anos de idade, Hansel et al. (2005) recomendam a imersão em álcool 70 % (1 min) e NaClO 2 % (10 min) de segmentos nodais e em NaClO 2 % (5 min) para ápices caulinares.

Inúmeros procedimentos e produtos são utilizados para a desinfestação de explantes. Entre os mais

utilizados estão o etanol, normalmente utilizado a 70 %, e o hipoclorito de sódio, em diversas concentrações.

Brondani (2008) e Brondani et al. (2009), testando concentrações de hipoclorito de sódio na desinfestação de segmentos nodais de *E. benthamii* x *E. dunnii*, coletados de minicepas cultivadas em sistema semi-hidropônico, constataram que a concentração de 0,5 % de cloro ativo foi mais efetiva.

Alfenas et al. (2004) recomendam a desinfestação de segmentos nodais mais lignificados imersos em 0,5 % de cloro ativo durante 20 minutos e 0,3 % de cloro ativo durante dois minutos para segmentos nodais mais tenros. Normalmente, são adicionadas gotas de detergente comercial ou 0,01-0,05 % de Tween 20 às soluções a base de cloro a fim de aumentar o contato dessas com os tecidos.

Na desinfestação de sementes de eucalipto, McComb e Bennett (1986) relatam que a desinfestação depende do tamanho e espessura do revestimento da casca. Termignoni et al. (1996) utilizaram hipoclorito de sódio a 0,12 % por 15 minutos na desinfestação de sementes de *E. dunnii*. Já para *E. marginata*, que possui sementes grandes e com revestimento mais espesso, pode-se tratar as sementes com 5 % de hipoclorito de sódio por 1 hora (CAHILL et al., 1992).

Holden e Paton (1981) em *E. grandis*, desinfestaram os explantes com hipoclorito de cálcio saturado por 75 minutos, seguido de 4 h sob irradiação ultravioleta. Gupta et al. (1981) utilizaram cloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>) a 0,05 % por 15 minutos em *E. citriodora* (= *C. citriodora*); HgCl<sub>2</sub> a 0,2 g.L<sup>-1</sup> por 2 minutos, seguida de 2 minutos em 10 g.L<sup>-1</sup> de hipoclorito de cálcio em *E. grandis* foi utilizado por Watt et al. (2003a) e em *E. grandis* x *E. urophylla* por Hajari et al. (2006), enquanto Sharma e Ramamurthy (2000) empregaram 1 g.L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> por 10 minutos em *E. tereticornis*.

O cloreto de mercúrio é altamente tóxico e utilizado em concentrações inferiores aos hipocloritos, enquanto o cloreto de benzalcônio é pouco tóxico aos tecidos vegetais e pode ser usado em concentrações semelhantes aos hipocloritos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Outros agentes desinfestantes como o PPM<sup>TM</sup> (*Preservative Plant Mixture*) e o Saniagri<sup>®</sup> também podem ser utilizados.

Após a desinfestação, os explantes são inoculados em meio de cultura, onde podem permanecer por 20-30 dias, entretanto a ocorrência de oxidações e/ou contaminações pode ser perceptível já na primeira semana de cultivo. A

fim de evitar contaminações generalizadas, é indicada a inoculação dos explantes em tubos de ensaio, onde ficam individualizados, ao invés de frascos de cultura.

Nessa fase, a composição do meio de cultura pode variar de acordo com as necessidades nutricionais de cada espécie. Os meios de cultura mais utilizados no cultivo *in vitro* de eucalipto são MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), JADS (CORREIA, 1993) e WPM (*Woody Plant Medium*) (LLOYD; McCOWN, 1980).

Para o estabelecimento *in vitro* de plantas lenhosas, recomenda-se a utilização de meios de cultura com baixas concentrações de nutrientes. Em função disso, é muito empregado o meio MS com metade das concentrações normais de seus sais, ou ½MS, no qual todos os componentes são reduzidos à metade. A adição de fitorreguladores é facultativa.

Visando evitar ou diminuir o processo oxidativo, podem ser adicionados antioxidantes, como o polivinilpirrolidona (PVP) e o ácido ascórbico. Além disso, a iniciação do cultivo na ausência de luz ou baixa intensidade luminosa por 7 a 14 dias, a troca frequente de meio de cultura, o uso de Gelrite® ou Fitagel™ como solidificante ou a adição de carvão ativado podem evitar a oxidação fenólica. Fungicidas e bactericidas também podem ser adicionados ao meio de cultura para controlar contaminações.

### **Multiplicação**

O objetivo dessa fase é a proliferação dos explantes, mantendo-se a estabilidade genética. Os explantes oriundos da fase de estabelecimento são inoculados em meio de cultura contendo combinações de auxinas e citocininas, dependendo da espécie e do tipo de explante.

O benzilaminopurina (BAP) tem sido o fitorregulador mais utilizado para induzir a proliferação de gemas em eucalipto (DEL PONTE et al., 2001). As concentrações têm variado de 0,006 µM a 8,8 µM. No entanto, outras citocininas, como a cinetina (0,23 µM a 2,5 µM), o tidiazuron (TDZ) (0,045 µM a 0,05 µM) e o 2iP (2,5 µM) também têm sido utilizadas.

As combinações das citocininas têm sido feitas com as auxinas ácido naftalenoacético (ANA) (0,01 µM a 5,3 µM), ácido indolbutírico (AIB) (0,05 µM) e 2,4-D (0,2 µM).

O número de subcultivos é indefinido, no entanto, quando o objetivo é o rejuvenescimento e o restabelecimento da capacidade de enraizamento, 10-12 subcultivos, no mínimo, são necessários (ALFENAS et al., 2004; XAVIER et al., 2007). O período de cada

subcultivo é geralmente de 20 a 30 dias.

Alfenas et al. (2004) alertam para a utilização de concentrações elevadas de BAP no meio de cultura, pois o acúmulo deste fitorregulador nos tecidos pode prejudicar o enraizamento posterior das brotações. Os mesmos autores relatam que a multiplicação e o alongamento das brotações pode ser obtido com 0,3 µM de BAP e 0,5 µM de ANA.

### **Alongamento**

Fase na qual o objetivo é a preparação das brotações para o enraizamento. O desejável é que a multiplicação e o alongamento das brotações ocorram ao mesmo tempo. Contudo, em função do genótipo e de materiais genéticos de difícil propagação *in vitro*, eventualmente é necessária uma fase de alongamento em meio de cultura próprio. Quando esta etapa é necessária, normalmente é adicionada giberelina (GA<sub>3</sub>) ao meio de cultura, embora alongamento de brotações também seja obtido com diversas combinações entre BAP, ANA, AIB e GA<sub>3</sub>. Outra opção é a simples redução na concentração de citocininas utilizadas na fase de multiplicação.

Multiplicação seguida de alongamento de brotações foram obtidas com combinações de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP com 0,04 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, em *E. tereticornis* x *E. grandis* (JOSHI et al., 2003); 1,0 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP com 0,01 e 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, em *E. tereticornis* x *E. camaldulensis* (BISHT et al., 1999); 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de AIB com 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, em *E. urophylla* (SANTOS et al., 2004); 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>, em *E. saligna* (FANTINI JÚNIOR; GRAÇA, 1990). Brondani (2008) obteve maior alongamento de brotações de clones de *E. benthamii* x *E. dunnii* adicionando 0,10 ou 0,20 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> combinadas com 0,10 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ANA.

### **Enraizamento**

Após a multiplicação e o alongamento, as brotações são induzidas ao enraizamento, o qual pode ser realizado tanto em condições *in vitro* quanto *ex vitro*.

No enraizamento *in vitro*, as brotações alongadas são subcultivadas em meio para enraizamento contendo auxina, geralmente o AIB. Alfenas et al. (2004) indicam a permanência dos explantes por 7 a 15 dias em meio de cultura contendo 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB.

A sequência e o número de fases do processo de micropropagação podem ser alterados em função da espécie e dos objetivos. Para Xavier e Comério (1997), o enraizamento *in vitro* pode ser dispensado, fazendo-se com que as gemas alongadas *in vitro* em meio de cultura

sejam enraizadas em condições de casa de vegetação. Citam como vantagens: evitar a manipulação de plantas de raiz nua, reduzir o período de formação da muda, aumentar a capacidade de produção do laboratório e reduzir uma fase de desenvolvimento (enraizamento *in vitro*).

O enraizamento *ex vitro* proporciona redução de custos de mão-de-obra e economia de espaço de sala de crescimento, energia elétrica e meio de cultura. Quanto à qualidade, o enraizamento *ex vitro* tende a produzir um sistema radicular mais completo e funcional, com maior número de raízes secundárias (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Xavier e Comério (1997) relatam que no enraizamento *ex vitro*, que ocorre entre 10-15 dias, não há necessidade de aplicação de fitorreguladores na base das gemas alongadas. Titon (2001) e Wendling (2002), em trabalhos com *E. grandis*, também observaram a não necessidade do tratamento das microestacas com fitorreguladores para o enraizamento *ex vitro*.

#### **Aclimatização**

É a última etapa do processo de micropropagação, objetivando reduzir o estresse causado pela diferença entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro* e constitui-se numa etapa na qual ocorrem grandes perdas de explantes.

A aclimatização é realizada em ambiente sombreado, onde as plantas ficam por um período variável de 15-30 dias e, posteriormente, são levadas para área de pleno sol, onde ocorre a rustificação e o crescimento.

#### **Desenvolvimento da Microestaquia como Resultado dos Avanços da Micropropagação de Eucalipto**

Tendo como base a micropropagação, desenvolveu-se a microestaquia. Essa técnica foi um avanço desenvolvido por Assis et al. (1992), sendo uma aplicação direta do rejuvenescimento via micropropagação. A microestaquia possui vantagens em relação ao enraizamento tradicional de estacas, como: menor envolvimento de mão-de-obra na preparação de estacas e aplicação de fitorreguladores e maior grau de juvenilidade das microestacas, com aumento da velocidade de iniciação e crescimento radicular.

A microestaquia de eucalipto envolve a seguinte sequência: 1) partes aéreas alongadas *in vitro*, em laboratório de cultura de tecidos, são enraizadas em casa de vegetação durante 15 dias; 2) aclimatização em casa de sombra por 10 dias; 3) transferência para

pleno sol, em que após 20 dias já é feita a primeira coleta de microestacas (ápices das mudas de três a cinco centímetros de tamanho).

O emprego da microestaquia proporciona algumas vantagens, entre as quais se podem destacar: maiores índices de enraizamento obtidos; supressão de gastos com jardins clonais; melhor qualidade do sistema radicular em termos de vigor, uniformidade, volume, aspecto e formato; não-necessidade da aplicação de reguladores de crescimento para enraizamento.

Como desvantagem, destaca-se a maior sensibilidade das microestacas às condições ambientais. Em função das limitações da microestaquia relativas a custos, por depender da disponibilidade de um laboratório de cultura de tecidos para rejuvenescer o material, desenvolveu-se a miniestaquia, hoje utilizada nos programas de propagação clonal massal das empresas florestais brasileiras. Ainda deve-se considerar que há dificuldade de rejuvenescimento de algumas espécies/clones.

#### **Comparação entre as Técnicas de Produção de Mudanças de Eucalipto**

Os trabalhos desenvolvidos para comparar diferentes técnicas de propagação de eucalipto têm reportado vantagens da microestaquia e miniestaquia em relação à propagação convencional.

Titon (2001), em trabalho com clones de *E. grandis*, concluiu que clones com maior dificuldade de enraizamento apresentaram maior resposta ao rejuvenescimento via microestaquia, resultando em maior eficiência de enraizamento. Resposta semelhante foi obtida por Santos et al. (2005), comparando quatro clones de *E. grandis* propagados por estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação. Estes observaram que em avaliações iniciais em teste clonal (4 e 8 meses), maior crescimento em altura, diâmetro e biomassa da parte aérea foram obtidos em mudas de alguns clones oriundas de micropropagação e microestaquia. Já, aos 24 meses, houve tendência de uniformidade entre as variáveis para as diferentes técnicas de propagação clonal. Watt et al. (1995), em seis clones híbridos de *E. grandis* com *E. urophylla*, *E. camaldulensis* e *E. tereticornis*, e Xavier et al. (1997), em dez clones híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla*, observaram aos 36 e 72 meses de idade, respectivamente, que as plantas micropropagadas obtiveram maior altura e diâmetro (DAP).

Xavier et al. (2001), em trabalho comparando o desempenho da miniestaquia e da microestaquia de clones híbridos de *E. grandis*, constataram que a microestaquia proporcionou melhor desempenho e velocidade de enraizamento e qualidade do sistema radicular em relação à miniestaquia.

Em contrapartida, para Wendling (2002), o subcultivo *in vitro* não foi eficiente no rejuvenescimento de clones de *E. grandis*, o que, de acordo com o autor, ocorreu porque os clones estudados apresentavam alto potencial de propagação vegetativa. Em função disso, o rejuvenescimento de matrizes adultas selecionadas ou de clones somente é indicado quando estes apresentam dificuldade de enraizamento.

Outro ponto a considerar, de acordo com Watt et al. (1995), é que plantas *in vitro* parecem ter sistemas radiculares que se assemelham mais aos de mudas produzidas por sementes do que aquelas de plantas oriundas de macroestacas. Assim, recomendam a associação da propagação *in vitro* com métodos de produção por estaquia para contribuir com o melhoramento florestal e programas de silvicultura clonal.

### Avanços e Tendências na Micropropagação

#### Micropropagação Fotoautotrófica

O cultivo *in vitro* convencional preconiza a adição de altas concentrações de sacarose ao meio, baixa irradiância e vedação dos frascos de cultura que não permitem trocas gasosas. Esses fatores influenciam negativamente nos cultivos *in vitro* por proporcionarem baixo teor de CO<sub>2</sub> disponível, induzirem alterações morfo-fisiológicas das plantas produzidas, dificultando a transição do metabolismo heterotrófico para o autotrófico e afetarem a sobrevivência *ex vitro*.

Uma série de deficiências anatômicas, induzidas pela condição *in vitro*, dificulta o controle da transpiração e ocasiona rápida perda de água, dentre as quais, pode-se destacar: formação de cera epicuticular deficiente, funcionalidade do mecanismo de fechamento estomático, maior densidade estomática, estômatos mais superficiais na epiderme da folha, presença de hidatódios, reduzida diferenciação do mesófilo das folhas, alta proporção de espaços intercelulares e conexão deficiente entre o sistema vascular do caule e raízes. De acordo com Preece e Sutter (1991), a alta umidade relativa do ar no interior dos recipientes e a baixa irradiância são os principais fatores que provocam alterações na estrutura

e funcionamento dos tecidos, levando à incapacidade das mudas em controlar as perdas de água.

Em função dos problemas apresentados pela micropropagação heterotrófica (convencional), inúmeras pesquisas foram realizadas visando à rustificação das plantas produzidas *in vitro* e, conseqüente redução das taxas de mortalidade na fase de aclimatização. Alterações na composição do meio de cultura e no intercâmbio de gases entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro* fazem parte do conceito de micropropagação fotoautotrófica (*sugar-free*), na qual não são adicionadas fontes de carbono (açúcares) ao meio de cultura.

Kozai e Kubota (2005) comentam que na micropropagação fotoautotrófica se utiliza meio de cultura isento de açúcar, no qual o crescimento das culturas ou acumulação de carboidratos nas culturas depende em grande parte da fotossíntese e absorção de nutrientes inorgânicos. Além da concentração ou exclusão da sacarose e concentração de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, outros fatores, como suportes (substratos) mais porosos, fluxo de fótons fotossintéticos, nível e direção de luz, ventilação natural ou forçada, e fotoperíodo também têm sido pesquisados. As lâmpadas fluorescentes, normalmente utilizadas, podem ser substituídas por fontes de iluminação à base de diodos-LED e lâmpadas fluorescentes catódicas frias-CCFLs (PENCHEL et al., 2007) ou de halogênio (KOZAI et al., 1997). As trocas gasosas têm sido permitidas com a utilização de tampas com filtros que impedem a passagem de agentes contaminantes.

Nesta mesma linha, também tem sido pesquisada a utilização de luz natural para promover o crescimento *in vitro*, em função do aumento da taxa fotossintética pela maior densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (KOZAI et al., 1997). A micropropagação fotoautotrófica com o uso da luz natural pode reduzir custos de produção de mudas micropropagadas, com menores gastos com energia elétrica ou melhorando a qualidade das mudas, reduzindo as perdas durante a aclimatização e a contaminação microbiana. Entretanto, as pesquisas com o uso da luz natural na micropropagação fotoautotrófica são recentes e muito escassas.

A micropropagação fotoautotrófica possui vantagens, entre as quais, podem-se destacar: promoção do crescimento e fotossíntese, altas porcentagens de sobrevivência/transição gradual para ambiente *ex vitro*, eliminação de desordens morfológicas e fisiológicas, menor perda de plantas devido à contaminações, uso

de recipientes maiores, automação do processo e a simplificação do sistema de micropropagação. Como desvantagens, tem-se a relativa complexidade das técnicas e o conhecimento requerido para controlar o ambiente *in vitro*, o custo de iluminação, enriquecimento com CO<sub>2</sub> e refrigeração (PENCHEL et al., 2007).

Resultados com micropropagação fotoautotrófica de eucalipto já foram obtidos, nos quais se constatou superioridade em relação à micropropagação convencional (KIRDMANEE et al., 1995; ZOBAYED et al., 2000, 2001; SHA VALLI KHAN et al., 2002; TANAKA et al., 2005). As pesquisas realizadas constataram que a micropropagação de eucalipto sob condições fotoautotróficas proporciona maior crescimento e desenvolvimento, tanto de parte aérea quanto raízes; maior taxa fotossintética; e porcentagem de sobrevivência das plantas, em relação à micropropagação convencional.

### **Biorreatores**

O cultivo *in vitro* baseia-se na utilização de pequenos recipientes contendo número reduzido de explantes em meio de cultura geleificado com ágar. Nesse sistema, há intensa manipulação das culturas e envolvimento de grande quantidade de mão-de-obra, utilização de várias câmaras de fluxo laminar, grandes autoclaves e espaço para cultivo em prateleiras com iluminação artificial.

Em função da necessidade de automação, adoção de técnicas de propagação em larga escala e alto volume, com vistas à redução dos custos de produção de plantas *in vitro*, os biorreatores começaram a ser empregados no cultivo *in vitro*.

Existem inúmeros modelos de biorreatores, os quais podem ser de imersão temporária ou permanente, sendo os primeiros mais utilizados.

Os biorreatores possibilitam aumentar a produção de biomassa de tecido vegetal com redução no tempo requerido para propagação. Estes incrementos são devidos ao maior contato das células ou brotações com o meio de cultura, maior aeração do meio e maior absorção de nutrientes (LEMOS et al., 2000).

Embora tenha vantagens em relação à micropropagação convencional, esta técnica ainda não é largamente utilizada no eucalipto. Entretanto, algumas pesquisas têm relatado potencial de uso desta técnica para o gênero (CASTRO; GONZÁLES, 2002; REIS et al., 2003; McALISTER et al., 2005).

### **Transformação genética**

A transferência de um fragmento de DNA exógeno para o interior da célula vegetal, sua integração ao genoma nuclear e posterior expressão de maneira estável fazem parte do processo de transformação genética (BRASILEIRO; DUSI, 1999).

Em um processo de obtenção de plantas transgênicas, o principal requisito, e maior dificuldade, é o estabelecimento prévio de uma metodologia eficiente de cultura de tecidos e regeneração da espécie-alvo. De acordo com McCown e Sellmer (1987), a regeneração *in vitro* é influenciada pelos fatores genótipo, fonte e histórico; composição do meio de cultura; ambiente; tempo entre subcultivos e suas interações.

A transformação genética possibilita a geração de cultivares/clones com características superiores. Em eucalipto, os objetivos buscados são: aumento no potencial de crescimento, modificação das propriedades das fibras, aumento na polimerização da celulose, modificação na biossíntese de lignina, redução dos teores de lignina e resistência a estresses bióticos e abióticos (QUOIRIN; QUISEN, 2006).

De acordo com Pasquali e Zanettini (2007), a transformação genética pode proporcionar a redução do tempo necessário para a introdução de novas características de interesse. Entretanto, a recalcitrância à transformação genética é o fator mais limitante da aplicação desta técnica no eucalipto. Embora a maioria dos trabalhos com transformação de eucalipto seja via indireta, mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (GONZÁLES, 2002), pesquisas também tem sido realizadas com transformação direta, via biobalística (SARTORETTO et al., 2002).

Estudos recentes foram realizados com a transformação genética de *E. camaldulensis* visando à utilização na fitorremediação (QUISEN, 2007) e de *E. saligna* para aumentar a tolerância ao frio (DIBAX, 2007). Entretanto, a baixa taxa de obtenção de explantes transformados e a recalcitrância observada indicam que mais pesquisas são necessárias.

### **Embriogênese somática**

Embriogênese somática ou assexual é a produção de estruturas como embriões a partir de células haplóides ou somáticas, sem que ocorra a fusão de gametas (GUERRA et al., 1999). Quando os embriões são originados diretamente a partir de células esporofíticas

ou gametofíticas do explante, sem a formação de calos, é denominada direta. No entanto, na maioria dos casos, os embriões somáticos resultam de células embriogênicas determinadas indiretamente (WATT et al., 1999).

Os embriões somáticos possuem sistema vascular fechado, não havendo conexão vascular com os tecidos do explante inicial, o que, juntamente com a bipolaridade, diferencia os embriões somáticos dos embriões dos propágulos resultantes da micropropagação e da organogênese (GUERRA et al., 1999). No entanto, seu padrão de desenvolvimento é similar ao dos embriões zigóticos.

De acordo com Xavier et al. (2007), a embriogênese somática, em relação a outras técnicas, apresenta vantagens como: obtenção de grande quantidade de propágulos (embriões somáticos); possibilita elevado grau de automação, reduzindo os custos por unidade produzida; e produção sincronizada dos embriões somáticos. A principal limitação em espécies lenhosas é a baixa taxa de conversão de embriões somáticos em plantas completas.

Os embriões somáticos podem ser utilizados tanto na continuação da propagação *in vitro* quanto na produção de sementes sintéticas, que são um conjunto de técnicas utilizadas para usar os embriões somáticos como sementes funcionais (GUERRA et al., 1999).

Em eucalipto, trabalhos com embriogênese somática têm sido realizados por Muralidharan e Mascarenhas (1987, 1995); Muralidharan et al. (1989); Watt et al. (1991); Ruaud et al. (1997); Termignoni et al. (1996); Bandyopadhyay et al. (1999); Arruda et al. (2000); Nugent et al. (2001); Pinto et al. (2002); Prakash e Gurumurthi (2005); Titon (2005); Carvalho (2007).

### Conclusões

O trabalho constou de ampla abordagem referente à micropropagação de eucalipto, considerando-se as espécies trabalhadas até o momento, os objetivos do emprego desta técnica, suas etapas e distintas utilizações.

Embora considerando seu alto custo em comparação a outros métodos de clonagem, a micropropagação de eucalipto é estratégica para produção massal de genótipos-elite e conservação de germoplasma.

A micropropagação de eucalipto, desde sua concepção, evoluiu de forma substancial. Atualmente, técnicas avançadas como embriogênese somática, micropropagação fotoautotrófica, emprego de

biorreatores e transformação genética têm proporcionado ganhos à produção de mudas e pesquisas com eucalipto. Considera-se, ainda, que há necessidade de continuidade dos estudos com micropropagação desta espécie, principalmente no sentido de redução de custos, maximização das etapas que compõem o processo e estabelecimento de protocolo que possa ser empregado para diversas espécies.

### Referências

- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, A. A. V.; MAFIA, R. G., ASSIS, T. F. de. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.
- ANEJA, D.; ATAL, C. Plantlet formation in tissue culture from lignotubers of *Eucalyptus citriodora* (Hook). **Current Science**, v. 38, p. 69-70, 1969.
- ARRUDA, S. C. C.; SOUZA, G. M.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, n. 2, p. 142-154, 2000.
- ASSIS, T. F.; ROSA, O. P.; GONCALVES, S. I. Propagação clonal de *Eucalyptus* por microestaquia. In: Congresso Florestal Estadual, 7. Nova Prata, **Anais**. Santa Maria: UFSM. 1992. p. 824-837.
- ASSIS, T. F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, v. 18, n. 185, p. 32-51, 1996.
- ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (ed.) **Biotechnology florestal**. Viçosa: [s.n.], 2007. p. 93-121.
- BANDYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSSEN, G.; HAMILL, J. D. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species - *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Plant Science**, v. 140, n. 2, p. 189-198, 1999.
- 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**, v. 48, n. 2, p. 104-108, 1999.
- BONGA, J. M.; VON ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236 p.
- BRASILEIRO, A. C. M.; DUSI, D. M. A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa CNPH, 1998. v. 2, p. 679-735.
- BRONDANI, G. E. **Miniestaquia e micropropagação de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden**. 2008. 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 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**, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.



- CAHILL, D. M.; BENNETT, I. J.; McCOMB, J. A. Resistance of micropropagated *Eucalyptus marginata* to *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Disease**, v. 76, n. 6, p. 630-632, 1992.
- CARVALHO, E. C. S. **Antioxidantes, reguladores de crescimento e estresse térmico na embriogênese somática de *Eucalyptus* spp.** 2007. 102 f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CASTRO, D. R.; GONZÁLES, J. O. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. **Agricultura Tecnica**, v. 62, n. 1, p. 68-78, 2002.
- CHAPERON, H. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: Simposio sobre Silvicultura y Mejoramiento Genético de Especies Forestales, 1987, Buenos Aires, Argentina. **Anales...** (s.l): AFOCEL, 1987. p. 215-232.
- CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp. em meio de cultura líquido e sólido.** 1993. 113 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- DEL PONTE, E. M.; MATTEI, V. L.; PETERS, J. A.; ASSIS, T. F. de. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subsp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2001.
- DIBAX, R. **Transformação genética de *Eucalyptus saligna* com o gene *P5CSF129A* via *Agrobacterium tumefaciens*.** 2007. 112 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- FANTINI JÚNIOR, M.; GRAÇA, M. E. C. Propagação "in vitro" de *Eucalyptus saligna*. In: Congresso Florestal Brasileiro, 6, Campos do Jordão, 1990. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1990. p. 373-378.
- GONÇALVES, A. N. **Reversão a juvenildade e clonagem de *Eucalyptus urophylla*, S.T. Blake "in vitro"**. 1982. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- GONZÁLEZ, E. R. **Transformação genética de *Eucalyptus grandis* e do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* via *Agrobacterium*.** 2002. 93 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- 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 CNPH, 1998. v. 1, p. 183-260.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI; Embrapa CNPH, 1999. v. 2, p. 533-568.
- GUPTA, P. K.; MASCARENHAS, A. F.; JAGANNATHAN, V. Tissue culture of forest trees - clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook, by tissue culture. **Plant Science Letters**, v. 20, n. 3, p. 195-201, 1981.
- HAJARI, E.; WATT, M. P.; MYCOCK, D. J.; McALISTER, B. Plant regeneration from induced callus of improved *Eucalyptus* clones. **South African Journal of Botany**, v. 72, n. 2, p. 195-201, 2006.
- HANSEL, F. A.; DUTRA, L. F.; WENDLING, I. **Ápices caulinares como alternativa para o resgate de matrizes adultas de *Eucalyptus benthamii* diretamente do campo: resultados preliminares.** Colombo: Embrapa Florestas, 2005. 4 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 153).
- HOLDEN, P. G.; PATON, D. M. Sterilization of field grown *Eucalyptus* for organ culture. **Journal of the Australian Institute of Horticulture**, v. 3, n. 10, p. 5-7, 1981.
- 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**, v. 52, n. 3/4, p. 110-113, 2003.
- KIRDMANEE, C.; KITAYA, Y.; KOZAY, T. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, v. 31, n. 3, p. 144-149, 1995.
- KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B.R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, n. 1, p. 49-56, 1997.
- KOZAI, T.; KUBOTA, C. Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. In: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. (Ed.). **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. Springer: Dordrecht, 2005. p. 19-30.
- LEMONS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; MAGALHÃES, V. S.; ALENCAR, L. M. C.; OLIVEIRA, J. G. L. Uso de biorreatores de imersão temporária para incrementar a micropropagação de banana. **ABCPTP Notícias**, n. 36, p. 2-5, 2000.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagation Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.
- McALISTER, B.; FINNIE, J.; WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, n.3, p. 347-358, 2005.
- McCOMB, J. A.; BENNETT, I. J. Eucalypts (*Eucalyptus* spp.). In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Trees 1. Berlin: Springer-Verlag, 1986. v. 1, p. 340-362.
- MCCOWN, B. H.; SELLMER, J. C. General media and vessels suitable for wood plant culture. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. v.1, p. 4-13.

- MURALIDHARAN, E. M.; GUPTA, P. K.; MASCARENHAS, A. F. Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v. 8, n. 1, p. 41-43, 1989.
- MURALIDHARAN, E. M.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *E. camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v. 6, n. 3, p. 256-259, 1987.
- MURALIDHARAN, E. M.; MASCARENHAS, A. F. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus*. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R.J. (Ed.) **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. v. 2, p. 23-40.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, n. 25, p. 135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NUGENT, G.; CHANDLER, S. F.; WHITEMAN, P.; STEVENSON, T. W. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, n. 1, p. 85-88, 2001.
- PASQUALI, G.; ZANETTINI, M. H. B. Transgênesse florestal. In: BOREM, A. (ed.) **Biotecnologia florestal**. Viçosa: [s.n.], 2007. p.317-334.
- PENCHEL, R. M.; OTONI, W. C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro*. In: BOREM, A. (ed.) **Biotecnologia florestal**. Viçosa: [s.n.], 2007. p.75-92.
- PINTO, G.; SANTOS, C.; NEVES, L.; ARAÚJO, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, v. 21, n. 3, p. 208-213, 2002.
- PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Somatic embriogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis* Sm. **Current Science**, v. 88, n. 8, p. 1311-1316, 2005.
- PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.). **Micropropagation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p. 71-93.
- QUISEN, R. C. **Transformação genética de *Eucalyptus camaldulensis* via co-cultivo com *Agrobacterium tumefaciens***. 2007. 125 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- QUOIRIN, M. G. G.; QUISEN, R. C. **Advances in genetic transformation of *Eucalyptus* species**. In: FRANCHE, C. (ed.). **Molecular Biology of Tropical Plants**. Research Signpost: Kerala. 2006, p. 41-56.
- REIS, J. P.; MORAIS, P. B.; PENCHEL, R.; HENRIQUE, A. Micropropagação de eucalipto no sistema de imersão temporária. In: Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 14, Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 1, Lavras, 2003. DUTRA, L. F. et al. (Ed.). Lavras: UFPA/FAEPE, 2003. p. 276.
- RUAUD, J.-N.; CHURCHILL, K.; PEPPER, S. Somatic embryogenesis initiation in *Eucalyptus nitens*. **Acta Horticulturae**, v. 447, p. 185-186, 1997.
- SANTOS, D. C. dos; WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; FRACARO, L. C. **Alongamento *in vitro* de *Eucalyptus urophylla***. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 4 p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 120).
- SANTOS, A. P. dos; XAVIER, A.; OLIVEIRA, M. L. de; REIS, G. G. do. Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones de *Eucalyptus grandis*. **Scientia Forestalis**, São Paulo, n. 68, p. 29-38, ago. 2005.
- SARTORETTO, L. M.; BARRUETO CID, L. P.; BRASILEIRO, A. C. M. Biolistic transformation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* callus. **Funcional Plant Biology**, v. 29, n. 8, p. 917-924, 2002.
- SHARMA, S. K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 5, p. 511-518, 2000.
- SHA VALLI KHAN, P. S.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, n. 2, p. 141-146, 2002.
- TANAKA, M.; GIANG, D. T. T.; MURAKAMI, A. Application of a novel disposable film culture system to photoautotrophic micropropagation of *Eucalyptus uro-grandis* (*Urophylla x grandis*). **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, v. 41, n. 2, p. 173-180, 2005.
- TERMIGNONI, R. R.; WANG, P. -J.; HU, C. -Y. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 45, n. 2, p. 129-132, 1996.
- TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia**. 2001. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- TITON, M. **Indução de embriogênese somática em *Eucalyptus grandis***. 2005. 107 f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- WATT, M. P.; BERJAK, P.; MAKHATHINI, A.; BLAKEWAY, F. *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 75, n. 3, p. 233-240, 2003a.
- WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. C.; CRESSWELL, C. F.; HERNAN, B. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, n. 157, p. 59-65, 1991.
- WATT, M. P.; BLAKEWAY, F.; MOKOTEDI, M. E. O.; JAIN, S. M. Micropropagation of *Eucalyptus*. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (Ed.) **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003a. p. 217-244.
- WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. C.; TERMIGNONI, R.; JAIN, S. M. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunnii*. In: JAIN, S. M.; GUPTA, P. K.; NEWTON, R.J. (Ed.) **Somatic embryogenesis in woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. v. 5, p. 63-78.
- WATT, M. P.; BLAKEWAY, F.; MOKOTEDI, M. E. O.; JAIN, S. M. Micropropagation of *Eucalyptus*. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (Ed.) **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003a. p. 217-244.

- WATT, M. P.; DUNCAN, E. A.; ING, M.; BLAKEWAY, F. C.; HERMAN, B. Field performance of micropropagated and macropropagated *Eucalyptus* hybrids. **South African Forestry Journal**, n. 173, p. 17-21, 1995.
- WENDLING, I. **Rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia seriada e micropropagação**. 2002. 98 f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.
- XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Enraizamento “ex vitro” de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e alongadas “in vitro”. **Scientia Forestalis**, n. 51, p. 29-36, 1997.
- XAVIER, A.; COMÉRIO, J.; IANNELLI, C. M. Eficiência da estaquia, da microestaquia e da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* spp. In: IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of *Eucalyptus*, 1997, Salvador. **Proceedings**. Colombo: Embrapa/CNPF, 1997. v. 2, p. 40-45.
- XAVIER, A.; ANDRADE, H. B.; OLIVEIRA, M. L. de; WENDLING, I. Desempenho do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de híbrido de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 25, n. 4, p. 403-411, 2001.
- XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (ed.) **Biotecnologia florestal**. Viçosa: [s.n.], 2007. p.55-74.
- ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KOZAI, T. Physiology of *Eucalyptus* plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. **In Vitro Cellular and Development Biology-Plant**, v. 37, n. 6, p. 807-813, 2001.
- ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. **Annals of Botany**, v. 85, n. 5, p. 587-592, 2000.

---

Recebido em 11 de maio de 2008 e aprovado em 03 de setembro de 2009

