

# DESINFESTAÇÃO E MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus dunnii* MAIDEN

Disinfestation and micropropagation of *Eucalyptus dunnii* Maiden

MALYSZ, M.  
CADORE, D.  
TIBOLA, E.  
LEONTIEV-ORLOV, O.  
CANSIAN, R. L.  
MOSSI, A. J. M.

Recebimento: 11/03/2011 - Aceite: 11/10/2011

**RESUMO:** Entre as diferentes espécies de eucalipto adaptadas ao cultivo no sul do Brasil, *Eucalyptus dunnii* se destaca pela tolerância a geadas. Entretanto, tem como característica produzir poucas sementes, o que dificulta a sua multiplicação. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes métodos de desinfestação de explantes e diferentes combinações de reguladores de crescimento vegetal para a sua micropropagação. Foi avaliado o percentual de desinfestação e sobrevivência de explantes com e sem tratamento prévio das matrizes com fungicida (Dicarboximida, 2,0 g.L<sup>-1</sup>) e bactericida (Oxitetraciclina + Sulfato de Estreptomicina, 2,0 g.L<sup>-1</sup>), seguido de assepsia com diferentes concentrações (0,5 e 1,0%) e tempos de exposição (15, 20 e 25 minutos) de hipoclorito de sódio. O tratamento de desinfestação das matrizes em campo com bactericida e fungicida aumentou o índice de explantes assépticos. Entretanto, o tratamento com assepsia prévia e desinfestação com 20 minutos em hipoclorito de sódio (0,5%) obteve o melhor resultado, apresentando um índice de 80,2% de explantes assépticos e um maior número de explantes vivos (91,7%). Para a avaliação da micropropagação, foram realizados experimentos testando diferentes concentrações de ácido indol acético (AIA) e de zeatina, avaliando-se o número de brotos por explante, comprimento médio dos brotos, índice de multiplicação, número de gemas e diâmetro médio do calo. A maior taxa de multiplicação ocorreu com a utilização do meio MS acrescido de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> da auxina AIA e 0,75 mg.L<sup>-1</sup> da citocinina zeatina, gerando até 20 clones.

**Palavras-chave:** Micropropagação. *Eucalyptus dunnii*. Desinfestação.

**ABSTRACT:** Among the different *Eucalyptus* species adapted to the cultivation in the south of Brazil, *Eucalyptus dunnii* stands out for frost tolerance. However, it is characterized by the production of few seeds, what makes its multiplication difficult. Thus, the aim of this study was to evaluate different methods of disinfection of explants and different combinations of plant growth regulators for its micropropagation. It was evaluated the percentage of disinfection and explants survival with and without previous treatment of the matrices with fungicide (Dicarboximide, 2.0 g.L<sup>-1</sup>) and bactericide (Oxytetracycline + Streptomycin Sulphate, 2.0 g.L<sup>-1</sup>), followed by sterilization with different concentrations (0.5 and 1.0%) and exposure times (15, 20 and 25 minutes) of sodium hypochlorite. The matrices disinfection treatment in field with bactericide and fungicide increased aseptic explants index, however the treatment with previous asepsis and disinfection with 20 minutes in sodium hypochlorite (0.5%), got the best result presenting an index of 80.2% of aseptic explants and a greater number of living explants (91.7%). In order to assess micropropagation, experiments testing different concentrations of indole acetic acid (IAA) and zeatin were performed, evaluating the number of sprouts for explant, sprouts average length, multiplication index, bud numbers and callus average diameter. The highest multiplication rate occurred with the use of MS plus 0.2 mg.L<sup>-1</sup> of auxin IAA and 0.75 mg.L<sup>-1</sup> of the cytokinin zeatin generating up to 20 clones.

**Keywords:** Micropropagation. *Eucalyptus dunnii*. Disinfection.

## Introdução

Dentre as técnicas de cultura de tecidos de plantas, a micropropagação é a que apresenta aplicação mais difundida e concreta, já sendo utilizada em nível comercial em diversos países, inclusive no Brasil (BERTONI et al., 2006).

A micropropagação, ou propagação vegetativa *in vitro* consiste na reprodução de plantas idênticas à planta mãe pela estimulação da capacidade natural da multiplicação vegetativa das espécies, ou pela indução de uma nova organogênese de gema, folhas e raízes (AUGÉ et al., 1984; ALCANTARA; BESPALHOC-FILHO; QUOIRIN, 2011).

Esta técnica, aliada à cultura de meristemas, está sendo muito utilizada na limpeza

e multiplicação clonal de espécies herbáceas e arbustivas, além de lenhosas como frutíferas de clima temperado e árvores de elite de essências florestais (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O uso da micropropagação apresenta algumas vantagens sobre métodos tradicionais, entre eles, alto índice de multiplicação, propagação de material livre de patógenos e vírus, possibilidade de propagação de espécies com dificuldade de multiplicação vegetativa *in vivo* e produção de material durante todo o ano (SHEN; MULLINS, 1984; AUGÉ et al., 1984; ERIG; SCHUCH, 2005a).

Por outro lado, esta técnica pode apresentar algumas desvantagens, como: custo de instalação de um laboratório, necessidade de pessoal qualificado, tempo de estabelecimento da cultura *in vivo* apesar da rápida multiplicação *in vitro* e variação genética

potencial (ATAS, 1984; ERIG; SCHUCH, 2005a).

O eucalipto, por ser uma espécie de uso múltiplo, com possibilidade de atender a diversos segmentos, como celulose, madeira sólida e carvão vegetal, caracteriza-se como uma espécie extremamente importante no setor florestal brasileiro. *Eucalyptus dunnii* Maiden tem-se destacado no Brasil pelo rápido crescimento, uniformidade dos talhões, forma das árvores e resistência à geada não muito severa. Essa espécie é indicada para plantio em altitudes entre 500 e 1.000m e em regiões de ocorrência de geadas (HIGA et al., 2000). Esta espécie produz poucas sementes, o que dificulta sua propagação aleatória (SOUZA; SOARES; BATISTA, 2003; BILLARD; LALLANA, 2005). A característica de produzir poucas sementes praticamente dificulta seu cultivo, pelo custo oneroso na obtenção das memas e na propagação da espécie.

O cultivo *in vitro* é um método viável para propagação clonal e massal de diversas espécies florestais. No entanto, um dos maiores entraves no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminações provocadas por fungos e bactérias e ainda por oxidações provocadas por compostos fenólicos (THORPE; HARRY; KUMAR, 1991; GRATAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A desinfestação de segmentos nodais em espécies lenhosas é a primeira etapa a ser considerada para a realização de ótimo estabelecimento *in vitro* (PIERIK, 1990). Os níveis de contaminação tendem a ser maiores, quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo. No entanto, mesmo as plantas submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação são fontes potenciais de micro-organismos que podem tornar-se limitantes aos procedimentos de cultivo *in vitro* (MEDEIROS, 1999; ALMEIDA; MARTINS; DUTRA, 2008).

A multiplicação *in vitro* de várias espécies de eucalipto tem sido descrita na literatura (BISHT et al., 1999; JOSHI et al., 2003; GLOCKE et al., 2006; PEREIRA-NETTO et al., 2006; ALMEIDA et al., 2008; BRONDA-NI et al., 2009), entretanto não há protocolo estabelecido para *E. dunnii*. Além disso, a falta de opções de espécies de eucalipto tolerantes a geadas é uma das limitações da expansão de seu cultivo na Região Sul do Brasil, e o *E. dunnii* se apresenta como alternativa potencial para o empreendedor florestal nesses casos.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes métodos de desinfestação de explantes e diferentes combinações de reguladores de crescimento vegetal para a micropropagação de *Eucalyptus dunnii* Maiden.

## Material e Métodos

### Coleta e desinfestação dos explantes

Foram coletados explantes de *Eucalyptus dunnii* de diferentes partes da planta (segmentos nodais da gema apical e gemas laterais) de matrizes mantidas em casa de vegetação com irrigação controlada, observando-se as épocas de vegetação da espécie (primavera e verão). Para a avaliação da desinfestação dos explantes, matrizes de *E. dunnii* foram mantidas sem tratamento prévio (experimentos 1 a 6) e com tratamento prévio, onde foram aplicados semanalmente 2,0 g.L<sup>-1</sup> do bactericida Agrimicina (Oxitetraciclina + Sulfato de Estreptomicina) e 2,0 g.L<sup>-1</sup> do fungicida Captan (Dicarboximida), começando a assepsia 60 dias antes dos explantes serem coletados (experimentos 7 a 12).

Após a coleta, os explantes foram armazenados em agrimicina (1,0 g/L), permanecendo submersos por 20 minutos. Decorrido

isso, os explantes permaneceram em água corrente por 10 minutos. Após, os mesmos foram mantidos em álcool 70% por 30 segundos e posteriormente em hipoclorito de sódio

(0,5% e 1,0%) com 15, 20 e 25 minutos de imersão e lavados 3 vezes em água destilada autoclavada (Tabela 1).

**Tabela 1** - Experimentos de assepsia dos explantes de *Eucalyptus dunnii*.

Experimentos	Tratamento prévio (Agrimicina + Captan)	Tempo de Desinfestação (Hipoclorito de sódio)	
		0,5 %	1,0%
1	-	15 min.	-
2	-	20 min.	-
3	-	25 min.	-
4	-	-	15 min.
5	-	-	20 min.
6	-	-	25 min.
7	2,0 g.L <sup>-1</sup> + 2,0 g.L <sup>-1</sup>	15 min.	-
8	2,0 g.L <sup>-1</sup> + 2,0 g.L <sup>-1</sup>	20 min.	-
9	2,0 g.L <sup>-1</sup> + 2,0 g.L <sup>-1</sup>	25 min.	-
10	2,0 g.L <sup>-1</sup> + 2,0 g.L <sup>-1</sup>	-	15 min.
11	2,0 g.L <sup>-1</sup> + 2,0 g.L <sup>-1</sup>	-	20 min.
12	2,0 g.L <sup>-1</sup> + 2,0 g.L <sup>-1</sup>	-	25 min.

Os experimentos relacionados à assepsia dos explantes foram realizados em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com luz ultravioleta por 15 minutos e foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 0,05 mg/L de benzilaminopurina (BAP), 30,0 mg.L<sup>-1</sup> de sacarose e 6,0 mg.L<sup>-1</sup> de ágar. Os mesmos foram mantidos em câmara de crescimento a 25°C ± 1 e fotoperíodo de 16 horas luz/dia com luminosidade de 2000 lux, por 45 dias.

### Avaliação da multiplicação dos explantes

Para a multiplicação dos explantes foram realizados 20 experimentos utilizando meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acres-

cidos de 30,0 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 6,0 g.L<sup>-1</sup> de ágar. Foram testadas diferentes concentrações de ácido indol acético-AIA(0,05 a 1,0 mg.L<sup>-1</sup>) e de zeatina (0,1 a 0,75 mg.L<sup>-1</sup>). Os mesmos foram mantidos em câmara de crescimento a 25°C ± 1 e fotoperíodo de 16 horas luz/dia com luminosidade de 2000 lux, por 90 dias.

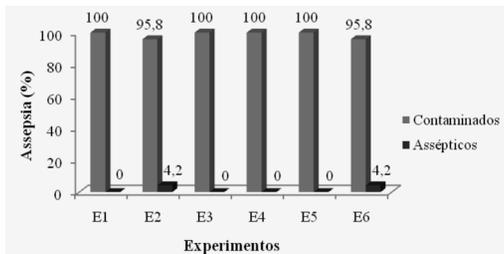
### Análise Estatística

Foram utilizados 25 explantes por experimento, sendo avaliados o número de brotos por explante, comprimento médio dos brotos (mm), índice de multiplicação, número de gemas e diâmetro médio do calo (mm). O índice de multiplicação, que corresponde ao número de brotos, foi duplicado, quando o comprimento dos brotos foi maior que 10 mm, pois estes permitem a obtenção de dois

novos explantes. As médias, desvios padrão e comparação entre médias (Tukey com 95% de confiança), foram calculados com o programa Statistica 5.0.

## Resultados e Discussão

Os resultados da assepsia dos explantes de *Eucalyptus dunnii* sem tratamento prévio das matrizes com bactericida e fungicida foram insatisfatórios, pois os experimentos E1, E3, E4 e E5 apresentaram contaminação em 100% dos explantes. Os tratamentos E2 e E6 obtiveram 95,8% de explantes contaminados (Figura 1).

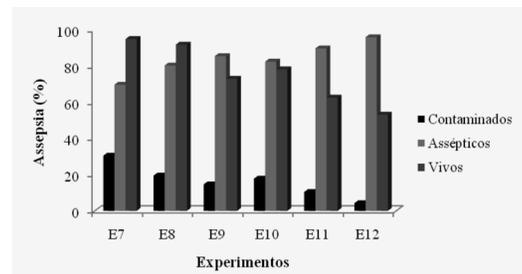


**Figura 1**- Resultados da assepsia dos explantes de *Eucalyptus dunnii* sem tratamento prévio no campo.

O tratamento de desinfestação das matrizes em campo com bactericida e fungicida (agrimicina + captan) aumentou o índice de explantes assépticos e vivos, apresentando resultados significativos (Figura 2). Brondani et al. (2009), avaliando o estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*, realizaram a aplicação do fungicida Kumulus DF® (enxofre como princípio ativo) a 3 g.L<sup>-1</sup> (p/v), uma semana previamente à coleta das brotações dos clones, conforme recomendações de Alfenas et al. (2004). Entretanto, não foi avaliado comparativamente o efeito deste tratamento prévio.

Os tratamentos E9, E10, E11 e E12 obtiveram excelentes taxas de assepsia dos explantes, porém apresentaram um grande número de explantes mortos, tornando menos viável a utilização destes tratamentos. O

tratamento E8, com 30 segundos em álcool 70% mais 20 minutos em hipoclorito de sódio (0,5%) obteve o melhor resultado, apresentando um índice de 80,2% de explantes assépticos e um maior número de explantes vivos (91,7%). Brondani et al. (2009), testando concentrações de hipoclorito de sódio na desinfestação de segmentos nodais de *E. benthamii* x *E. dunnii*, a partir de minícepas cultivadas em sistema semi-hidropônico, também constataram a concentração de 0,5% de cloro ativo como a mais efetiva.



**Figura 2** - Resultados da assepsia dos explantes de *Eucalyptus dunnii*, após tratamento prévio das matrizes no campo com Agrimicina (2,0 g.L<sup>-1</sup>) e Captan (2,0 g.L<sup>-1</sup>).

De acordo com George (1993) e Alfenas et al. (2004), a concentração e o tempo de exposição aos desinfetantes dependem do material vegetal e da planta, pois apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade dos tecidos. Uma desinfestação eficiente deve eliminar os micro-organismos e não causar danos ou morte aos tecidos. Almeida, Martins e Dutra. (2008), avaliando a desinfestação de segmentos nodais de *E. dunnii* mantidas em câmaras climatizadas, observou uma menor contaminação de bactérias e fungos após a desinfecção por 10 minutos com hipoclorito de sódio a 1% e 2%, respectivamente. No mesmo trabalho, observou-se um maior percentual de sobrevivência dos explantes de *E. dunnii* (30 a 40%) com concentrações de 2,0 e 1,5% de hipoclorito de sódio, respectivamente. Estas concentrações também apresentaram baixos percentuais de oxidação dos explantes.

Segundo Erig e Schuch (2005b), a sobrevivência dos segmentos nodais é indicada pela coloração verde do explante. Entretanto, a porcentagem de sobrevivência dos segmentos nodais não pode ser usada como único indicativo de que haverá o estabelecimento de plantas a partir destes explantes. Muitas vezes os segmentos nodais continuam vivos (de coloração verde) por um determinado tempo, mas, não emitem folhas ou brotos, isto é, não se estabelecem *in vitro*. Neste sentido, foram realizados 20 experimentos, testando-se dife-

rentes concentrações de ácido indol acético e de zeatina, avaliando-se o número de brotos por explante, comprimento médio dos brotos, índice de multiplicação, número de gemas e diâmetro médio do calo (Tabela 2).

O número de brotos e o comprimento destes são os fatores mais relevantes na micropropagação, gerando o índice de multiplicação. O número de gemas influencia na capacidade de regeneração do futuro explante e o diâmetro do calo é um fator considerável para o futuro enraizamento do clone.

**Tabela 2** - Avaliação da micropropagação de explantes de *Eucalyptus dunnii*, em diferentes concentrações de ácido indol acético (AIA) e zeatina.

	AIA (mg.L <sup>-1</sup> )	Zeatina (mg.L <sup>-1</sup> )	Nº de brotos	Comprimento de brotos (mm)	Índice	Nº de gemas	Diâmetro do calo (mm)
1	0,05	0,1	2,44 <sup>b</sup> ± 0,5	15,94 <sup>ab</sup> ± 3,7	4,88	12,08 <sup>a</sup> ± 1,8	0,87 <sup>ab</sup> ± 0,01
2	0,05	0,25	3,22 <sup>c</sup> ± 0,7	12,23 <sup>ab</sup> ± 2,05	6,44	9,98 <sup>ab</sup> ± 1,7	0,89 <sup>ab</sup> ± 0,06
3	0,05	0,5	6,22 <sup>d</sup> ± 1,5	4,24 <sup>b</sup> ± 0,7	6,22	5,83 <sup>b</sup> ± 0,5	0,70 <sup>b</sup> ± 0,07
4	0,05	0,75	15,22 <sup>abc</sup> ± 2,0	6,78 <sup>b</sup> ± 0,5	15,22	5,72 <sup>b</sup> ± 0,2	0,83 <sup>ab</sup> ± 0,04
5	0,1	0,1	1,55 <sup>e</sup> ± 0,3	4,80 <sup>b</sup> ± 1,1	1,55	4,13 <sup>bc</sup> ± 0,8	0,43 <sup>c</sup> ± 0,07
6	0,1	0,25	4,55 <sup>e</sup> ± 0,9	15,84 <sup>ab</sup> ± 2,9	9,1	9,94 <sup>ab</sup> ± 1,6	0,88 <sup>ab</sup> ± 0,03
7	0,1	0,5	12,78 <sup>bcd</sup> ± 1,1	5,58 <sup>b</sup> ± 0,3	12,78	5,50 <sup>b</sup> ± 0,3	0,91 <sup>ab</sup> ± 0,03
8	0,1	0,75	18,44 <sup>ab</sup> ± 2,2	5,03 <sup>b</sup> ± 0,4	18,44	5,15 <sup>b</sup> ± 0,2	0,90 <sup>ab</sup> ± 0,03
9	0,2	0,1	3,11 <sup>e</sup> ± 0,3	10,39 <sup>ab</sup> ± 2,8	6,22	8,34 <sup>ab</sup> ± 0,9	0,89 <sup>ab</sup> ± 0,03
10	0,2	0,25	5,33 <sup>d</sup> ± 1,3	14,67 <sup>ab</sup> ± 3,4	10,66	8,85 <sup>ab</sup> ± 1,3	0,93 <sup>ab</sup> ± 0,05
11	0,2	0,5	9,55 <sup>cd</sup> ± 0,9	5,98 <sup>b</sup> ± 0,9	9,55	5,60 <sup>b</sup> ± 0,4	0,75 <sup>b</sup> ± 0,02
12	0,2	0,75	20,78 <sup>a</sup> ± 3,5	5,24 <sup>b</sup> ± 0,9	20,78	6,97 <sup>ab</sup> ± 1,0	0,84 <sup>ab</sup> ± 0,03
13	0,5	0,1	3,33 <sup>c</sup> ± 0,5	9,78 <sup>ab</sup> ± 2,4	3,33	9,17 <sup>ab</sup> ± 0,8	0,91 <sup>ab</sup> ± 0,08
14	0,5	0,25	3,89 <sup>e</sup> ± 1,2	14,37 <sup>ab</sup> ± 3,2	7,78	10,52 <sup>ab</sup> ± 1,7	0,89 <sup>ab</sup> ± 0,03
15	0,5	0,5	9,55 <sup>cd</sup> ± 2,1	12,76 <sup>ab</sup> ± 4,6	19,1	8,00 <sup>ab</sup> ± 1,6	1,04 <sup>a</sup> ± 0,03
16	0,5	0,75	19,67 <sup>ab</sup> ± 2,5	5,99 <sup>b</sup> ± 0,6	19,67	5,01 <sup>b</sup> ± 0,2	1,02 <sup>a</sup> ± 0,04
17	1,0	0,1	2,89 <sup>e</sup> ± 0,6	20,42 <sup>a</sup> ± 5,2	5,78	12,69 <sup>a</sup> ± 2,4	0,97 <sup>ab</sup> ± 0,1
18	1,0	0,25	8,67 <sup>cd</sup> ± 1,4	10,15 <sup>ab</sup> ± 4,3	17,34	5,80 <sup>b</sup> ± 1,1	0,93 <sup>ab</sup> ± 0,2
19	1,0	0,5	1,33 <sup>e</sup> ± 0,2	4,89 <sup>b</sup> ± 0,8	1,33	2,90 <sup>c</sup> ± 0,3	0,81 <sup>ab</sup> ± 0,1
20	1,0	0,75	9,55 <sup>cd</sup> ± 1,8	4,3 <sup>b</sup> ± 0,2	9,55	4,90 <sup>b</sup> ± 0,4	0,73 <sup>b</sup> ± 0,1

A maior taxa de multiplicação ocorreu com a utilização do meio MS acrescido de 0,2 mg.L<sup>-1</sup> da auxina AIA e 0,75 mg.L<sup>-1</sup> da citocinina Zeatina (experimento 12), podendo gerar até 20 clones, como mostra o índice de multiplicação (Tabela 2). Borges et al. (2011) obtiveram maiores taxas de multiplicação de clones híbridos de *E. globulus* com o meio MS, em comparação ao meio JADS. Santos, Wendling e Dutra (2004) obtiveram maior número de brotações, quando aplicaram-se 0,1 mg.L<sup>-1</sup> da auxina, ácido indolbutírico (AIB) e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> da citocinina benzilaminopurina (BAP), entretanto com índices de multiplicação de no máximo 2 clones.

De maneira geral, o fitorregulador benzilaminopurina (BAP), em concentrações variando de 0,006 µM a 8,8 µM, tem sido o mais utilizado para induzir a proliferação de gemas em eucalipto (DEL PONTE et al., 2001). Uma revisão sobre diferentes combinações de fitorreguladores para multiplicação e alongamento de algumas espécies de eucalipto podem ser encontradas em Dutra, Wendling e Brondani. (2009).

## Considerações finais

De maneira geral, o tratamento de desinfestação das matrizes em campo com bactericida e fungicida (agrimicina + captan) juntamente com desinfestação *in vitro* com hipoclorito de sódio 0,5% por 20 minutos, aumentaram o índice de explantes assépticos e vivos, apresentando resultados significativos. A maior concentração de citocinina (zeatina) em diferentes combinações de auxina induzir a um maior número de brotos, com exceção da combinação com a maior concentração de ácido indolacético (1,0 mg.L<sup>-1</sup>). Os maiores comprimentos de broto foram obtidos nas concentrações baixas de citocinina. Já o número de gemas e o diâmetro dos calos foram menos influenciados pelas diferentes combinações destes reguladores de crescimento vegetal. Estes resultados estão de acordo com a literatura que aponta as citocininas como indutoras da brotação e as auxinas como indutoras do alongamento caulinar (MANTELL; MATHEWS, MCKEE, 1994; TORRES; CALDAS; BUSO, 1998. ALFENAS et al., 2004; DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

## AUTORES

Marcelo Malysz - Doutorando (Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Mestre em Ecologia, URI. E-mail: mmalysz@gmail.com

Diego Cadore - Ex bolsista de iniciação científica (PIIC-URI). E-mail: diecadore@gmail.com

Ederson Tibola - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Graduando em Engenharia Agrícola. E-mail: ertibola@hotmail.com

Oleg Leontiev-Orlov - Doutor em Agronomia, Moscou, Russia.

Rogério Luis Cansian - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim. Professor, Doutor em Ecologia, UFSCar. E-mail: cansian@uricer.edu.br

Altemir José Mossi - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim. Professor, Doutor em Ecologia, UFSCar. E-mail: amossi@uricer.edu.br

## REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, G.B.; BESPALHOK-FILHO, J.C.; QUOIRIN, M. Organogenesis and transient genetic transformation of the hybrid *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 2, 246-251, 2001.
- ALFENAS, A.C.; ZUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 442p.
- ALMEIDA, J. R.; MARTINS, C. R.; DUTRA, L. F. Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* visando estabelecimento *in vitro*. **Revista da FZVA**, v. 15, n. 1, p. 54-60, 2008.
- ATAS. Tissue culture technology and development. **ATAS Bulletin**, November, 1984.
- AUGÉ, R.; BEUCHESNE, G.; BOCCON-GIBOD, J.; DECOURTYE, L.; DIGAT, B.; GALANDRIN, J.CL.; MINIER, R.; MORAND, J. CL.; VIDALIE, H. **La Culture in vitro et ses applications horticoles**. Paris. Lavoisier, 1984, 151p.
- BERTONI, B. W.; DAMIÃO FILHO, C. F.; MORO, J. R.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S. Micropropagação de *Calendula officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 8, n. 2, p. 48-54, 2006.
- 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.
- BILLARD, C.E.; LALLANA, V.H. Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*. **Ciencia, Docência y Tecnología**, n. 30, Ano XVI, 2005.
- 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 dunii* Maiden. **Revista Árvore**, v. 33, n.1, p. 11-19, 2009.
- BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.; LOPES, A.P.; OTONI, W.C. Multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, v. 35, n.2, p. 173-182, 2011.
- 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**, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2001.
- DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 58, p. 49-59, 2009.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005a.
- \_\_\_\_\_, A. C.; \_\_\_\_\_, M. W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agrária**, v.6, n.1-2, p.91-96, 2005b.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Edington: Exegetics Limited, 1993, 574 p.

GLOCKE, P.; DELAPORTE, K.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Micropropagation of juvenile tissue of *Eucalyptus erythronema* x *Eucalyptus stricklandii* Cv. "Urrbrae Gem". **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.42, n.2, p.139-143, 2006.

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: SPI/Embrapa - CNPH, 1998, p. 183-260.

HIGA, R. C. V. **Avaliação e recuperação de *Eucalyptus dunnii* atingidos por geadas em Campo do Tenente, Paraná**. Tese (doutorado em Ciências Florestais), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

JOSHI, I.; BISHT, P.; SHARMA, V.K.; UNİYAL, 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.

MANTELL, S. H.; MATHEWS, J. A.; MCKEE, R. A. **Princípios de Biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994.

MEDEIROS, C. P. C. **Indução *in vitro* de respostas morfogênicas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.)**. 79f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, E. I. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PEREIRA-NETTO, A.B.P.; CARVLHO-OLIVEIRA, M.M.C.; RAMÍREZ, J.A.; GALAGOVSKY, L.R. Shooting control in *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* hybrid: comparative effects of 28-homocastasterone and a 5a-monofluoro derivative. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.86, n.3, p.329-335, 2006.

PIERIK, R. L. M. **Vegetative propagation**. In: *In vitro* culture of higher plants. [S.l.]: International Association for Plant Tissue Culture, 1990, p. 183-230.

SANTOS, D. C.; WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Alongamento *in vitro* de *Eucalyptus urophylla*. Embrapa Florestas, **Comunicado Técnico 120**, p. 1-4, 2004.

SHEN, X.S.; MULLINS, M. G. Propagation *in vitro* of pear, *Pyrus communis* L., cultivars William's Bon chrétion, Packham's Triumph and Beurré Bosc. **Scientia Horticulturae**. v. 23, p. 51-57, 1984.

SOUZA, L. J. B.; SOARES, R. V.; BATISTA, A. C. Modelagem do material combustível em povoamentos de *Eucalyptus dunnii*, em Três Barras, SC. **Cerne**, v. 9, n. 2, p. 231-245, 2003.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. **Application of micropropagation to forestry**. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation: technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311-336.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Vol. I e II. Brasília: EMBRAPA, 1998, 509p.

