

TRABALHO DE PESQUISA / RESEARCH PAPER

**EFEITO DO MEIO DE CULTURA LÍQUIDO E SÓLIDO NO  
CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE GEMAS DE *Eucalyptus*  
*grandis* X *Eucalyptus urophylla* NA MULTIPLICAÇÃO IN VITRO**

Diva Correia<sup>1</sup>

Antonio Natal Gonçalves<sup>2</sup>

Hilton Thadeu Zarate do Couto<sup>2</sup>

Milton Cezar Ribeiro<sup>3</sup>

**ABSTRACT** - The aim of this study was to evaluate the growth and development of shoots of five clones of ***Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*** in liquid and solid culture media at the multiplication phase for 42 days of culture. The establishment of culture in vitro of the clones was made with nodal segments collected from epicormic shoots of cuttings at the age of five months. A modified GONÇALVES (1980) culture medium was utilized to establish the cultures for shoot multiplication in 19 successive transfers. Then, standard explants were inoculated in the liquid and solid JADS culture media. The shoots growth and development were weekly evaluated for 42 days through: fresh and dry matter weight and relative growth rate of the dry matter weight. The evaluation of the shoots growth and development of the clones cultivated in liquid or solid culture media showed: higher fresh and dry matter weight produced at the solid medium than in the liquid medium at the 42nd day; higher gains of the fresh and dry matter weight at the 28th day and them stabilization until the 42nd day; higher relative growth rate of the dry matter weight until the 7th day; reduction and variations of the relative growth of the dry matter weight from the 21 st and 28th day at the solid and liquid culture media, respectively and variations among clones at the fresh and dry matter weight. Occurrence of the hiperhydricity was discussed.

**RESUMO** - O objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento e desenvolvimento de gemas de cinco clones de híbridos de ***Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*** em meio de cultura líquido e sólido na fase de multiplicação de gemas durante 42 dias de cultura. O estabelecimento da cultura in vitro dos clones foi realizado com segmentos nodais coletados de brotos epicórmicos de plantas com cinco meses de idade, propagadas por estacas. O meio de cultura GONÇALVES (1980) modificado foi utilizado para o estabelecimento e multiplicação de gemas em 19 subculturas sucessivas. Explantes-padrão foram transferidos para o meio de cultura JADS, líquido e solidificado com ágar. O crescimento e desenvolvimento de gemas foram avaliados semanalmente, durante 42 dias através de: peso fresco, peso seco e taxa de crescimento relativo da produção de matéria seca. As avaliações do crescimento e desenvolvimento de gemas dos clones cultivados em

<sup>1</sup> Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP;

<sup>2</sup> Professor do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP;

<sup>3</sup> Técnico em informática do mesmo departamento. Caixa Postal 9, 13400-970, Piracicaba, SP.

meio sólido e líquido, mostraram: maiores produções de matéria fresca e seca em meio sólido do que em meio líquido aos 42 dias; aumento das produções de matéria fresca e seca até o 28º. dia e estabilização das produções de matéria fresca e seca até 42º. dia; maiores taxas de crescimento relativo da produção da matéria seca nos primeiros 7 dias; reduções e variações das taxas de crescimento relativo das produções de matéria seca até o 21º. dia e 28º. dia em meio de cultura sólido e líquido, respectivamente e variações entre clones para as produções de matéria fresca e seca. Ocorrência de hiperidricidade foi discutida.

## INTRODUÇÃO

A seleção em viveiro de plantas oriundas de sementes híbridas ou em campo de híbridos espontâneos, o desenvolvimento de híbridos interespecíficos e intraespecíficos têm sido práticas aplicadas em programas de melhoramento genético florestal. A hibridação entre espécies e posterior seleção clonal de híbridos superiores nas progênes é a forma mais comum de obtenção de híbridos em programas de melhoramento genético de **Eucalyptus** sp. (ASSIS, 1986 e 1987). A aplicação do melhoramento contínuo dos híbridos superiores no decorrer das gerações através das seleções recorrentes interpopulacionais ou intrapopulacionais pode gerar híbridos superiores a cada ciclo (HIGA et al., 1991).

No Brasil, o **Eucalyptus grandis** Hill ex Maiden caracteriza-se pela produtividade, próxima a 73 m<sup>3</sup>/ha/ano em materiais selecionados (Barros, 1979) citado por IKEMORI (1990), enquanto o **E. urophylla** S.T. Blake tem sido uma espécie importante para plantios em regiões tropicais úmidas devido ao excelente vigor, resistência ao cancro e capacidade de rebrota. A hibridação entre essas espécies tem demonstrado haver superioridade dos híbridos para: densidade básica da madeira (BRIGATTI et al., 1983), DAP e altura (ODA; FERREIRA, 1983), viabilidade de produção de sementes (IKEMORI; CAMPINHOS, 1983), resistência ao cancro, homogeneidade na qualidade da madeira e para plantios clonais em larga escala estabelecidos por, plantas propagadas por estacas (IKEMORI, 1990).

Desta forma, a prática da hibridação, aliada às vantagens oferecidas pela técnica de micropropagação, pode contribuir para a multiplicação rápida dos genótipos selecionados precocemente em viveiro e/ou através de seleções recorrentes dos híbridos interespecíficos e intraespecíficos e/ou selecionados por técnicas de eletroforese de isoenzimas. A aplicação dessas metodologias pode favorecer a redução do tempo dos programas de melhoramento genético e o aumento da produtividade.

Diante disso, torna-se necessária a obtenção de metodologias para a propagação in vitro de híbridos de **Eucalyptus**. Este estudo tem como objetivo avaliar o crescimento e desenvolvimento de gemas de clones: híbridos de **E. grandis** x **E. urophylla** na fase de multiplicação de gemas em meio de cultura líquido e sólido.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Árvores matrizes

Os clones utilizados tiveram origem de árvores propagadas por sementes híbridas (**E. grandis** x **E. urophylla**) plantadas na região de Mogi Guaçu, no Estado de São Paulo e abatidas com 8 anos de idade. Os clones (H3, H4, H8, H9 e H1 0) foram propagados por estacas na mesma região e abatidos com 30 meses de idade.

## **Fonte e preparo dos explantes**

Foram preparadas estacas oriundas da primeira rebrota das touças conforme metodologia indicada por CORREIA (1993). Destas plantas propagadas por estacas e com cinco meses de idade foram retirados brotos epicórmicos de aproximadamente 5 cm de comprimento. Os brotos foram lavados em solução de detergente comercial a 3% (v/v) durante 15 minutos e após, lavados em solução de Benlate ( $1 \text{ g.l}^{-1}$ ) durante 30 minutos. Em câmara de fluxo laminar, os brotos foram imersos em solução de NaOCI a 1% (v/v) com acréscimo de Tween 20 a 0,01% (v/v) durante 15 minutos e lavados por quatro vezes em água destilada e esterilizada. Segmentos nodais com 1 cm de comprimento foram retirados destes brotos.

## **Estabelecimento das culturas e multiplicação das gemas**

Para indução de gemas dos segmentos nodais, foi utilizado o meio de cultura GONÇALVES (1980) modificado utilizando  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (9,8 mM) com acréscimo de AIA ( $5,7 \mu\text{M}$ ) e BAP ( $2,2 \mu\text{M}$ ). Utilizou-se 0,6% (p/v) de ágar Difco Bacto-Sigma e 3% (p/v) de sacarose. O pH foi ajustado para  $6,0 \pm 0,1$  antes da autoclavagem e do acréscimo do ágar. O mesmo meio de cultura suplementado com BAP ( $2,2 \mu\text{M}$ ) foi utilizado para a multiplicação de gemas sendo realizadas 19 subculturas, uma a cada 30 dias.

## **Características do explante-padrão**

Foram utilizados explantes-padrão oriundos da 19<sup>o</sup> subcultura da fase de multiplicação de gemas com peso médio de matéria seca de 35 mg/explante.

## **Meio da cultura líquido e sólido**

Foi utilizado o meio de cultura JADS (QUADRO 1) suplementado com BAP ( $2,2 \text{ IJM}$ ). O pH dos meios de cultura foi ajustado para  $6,0 \pm 0,1$  antes da autoclavagem, Para o meio de cultura sólido foi acrescentado 0,6% (p/v) de ágar (Difco Bacto-Sigma), após o ajuste do pH. Este meio de cultura possui uma composição nutricional de inorgânicos específica à espécie de **E. grandis** que favorece um crescimento ótimo, podendo produzir in vitro até 150 mg de matéria seca/explante em cada 10 ml de meio de cultura. (CORREIA, 1993).

## QUADRO 1. Meio de cultura JADS.

Compostos	Concentração
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	4,00 mM
KNO <sub>3</sub>	8,00 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,00 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	5,00 mM
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,00 mM
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	200,00 µM
Na <sub>2</sub> EDTA	200,00 µM
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	75,60 µM
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	14,90 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,62 µM
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	5,00 µM
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,00 µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50,10 µM
Ácidonicotínico	4,00 µM
Pyridoxina	2,43 µM
Thyamina	14,80 µM
Myoinositol	555,00 µM
L-arginina	40,20 µM
L-glutamina	992,30 µM
L-cysteina	20,60 µM
PantotenatodeCálcio	5,00 µM
Sacarose	11,40 M

### Recipientes, volumes e esterilização dos meios de cultura

Foram utilizados recipientes com capacidade de 250 ml, vedados com tampa de polipropileno. Utilizou-se 20 ml de meio de cultura/recipiente, O meio de cultura com ágar foi homogeneizado em fusão, em banho-maria, a 90°C. Em cada recipiente contendo meio de cultura líquido foi colocado um suporte de manta acrílica para a sustentação do explante medindo 4,5 cm de diâmetro e 0,5 de espessura. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C sobre pressão de 1,05 kg/cm<sup>2</sup>, durante 15 minutos.

### Condições ambientais de crescimento

As culturas permaneceram em condições ambientais de crescimento à temperatura de 26°C ± 2°C, fotoperíodo de 16 horas com intensidade luminosa de 1000 lux e 8 horas no escuro.

### Amostragem

Para cada tipo de meio de cultura, líquido e sólido, foram preparados 30 recipientes/clone, contendo dois explantes-padrão/recipiente. A cada sete dias, a partir do início do experimento, retiraram-se como amostragem cinco recipientes, considerando duas

amostras independentes/recipiente para cada tipo de meio de cultura/clone para a avaliação da PMF e PMS.

### **Taxa de crescimento relativo**

A avaliação das taxas de crescimento relativo foi definida com as médias da PMS, segundo a equação estabelecida por HUNT (1982):

$$\text{Taxa de crescimento relativo} = \frac{\ln \text{PMS}_2 - \ln \text{PMS}_1}{T_2 - T_1} * 100$$

onde: PMS1 = média inicial da PMS a cada sete dias;

PMS2 = média final da PMS a cada sete dias;

T2 - T1 = diferença entre o último dia e o primeiro dia do período.

### **Análise estatística**

Foi utilizado o delineamento estatístico em parcelas subdivididas. Os dados de peso seco foram transformados em  $\ln(x + 0,5)$ . Os efeitos dos tratamentos foram avaliados mediante análise de variância e as médias dos tratamentos, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas dos resultados experimentais foram testadas por meio de análise de regressão linear tendo como variáveis dependentes PMF e PMS e como variável independente o período de cultura (dias), onde foram testados vários modelos. A escolha do melhor modelo linear foi baseada no teste de F da regressão, no coeficiente de determinação ajustado (R<sup>2</sup>), na significância dos coeficientes da regressão pelo teste 't' de Student, a 1% de probabilidade.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados das análises de variância para PMF e PMS dos clones de híbridos de **E. grandis** x **E. urophylla** encontram-se na TABELA 1.

A multiplicação das gemas variou de explante para explante dentro e entre os clones em meio de cultura líquido e sólido. Isto contribuiu para haver maior amplitude entre os valores de peso fresco, justificando o alto coeficiente de variação (34,3%) para os valores de PMF (TABELA 1). Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990) a fonte de variação do crescimento in vitro entre os explantes pode estar relacionada com o tamanho do explante e com a posição deste explante quando seccionado no explante de origem. Entretanto, a relação entre as médias gerais da PMS/PMF (10,8% de matéria seca/explante), aos 42 dias de cultura, foi considerada adequada.

Os efeitos do período de cultura (dia), de clone dentro do período de cultura e tipo de meio (líquido ou sólido) foram altamente significativos pelo teste de F ( $p < 0,01$ ) tanto para PMF quanto para PMS. Interação significativa ( $p < 0,05$ ) somente foi obtida para PMF (TABELA 1).

O cultivo dos clones de híbridos de **E. grandis** x **E. urophylla** apresentou maiores médias de PMF e PMS em meio de cultura sólido do que em meio líquido aos 42 dias, diferenciando estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). (FIGURA 1).

**TABELA 1. Resumo das análises de variância para PMF e PMS de clones de híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas cultivadas em meio de cultura JADS líquido e sólido avaliadas a cada 7 dias durante 42 dias de cultura.**

**Quadrados médios**

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios	
		PMF	PMS <sup>(1)</sup>
Período de cultura	6	18,0212**	36,6971**
Clone (Período de cultura)	28	0,3850**	0,3501**
Meio	1	4,8495**	1,2182**
Meio* Período de cultura	6	0,3419*	0,2232ns
Resíduo	658	0,1428	0,1201
F		21,4**	47,1**
CV%		34,3	14,9
Média Geral (mg)		1099,2	118,9

(ns) não significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade;

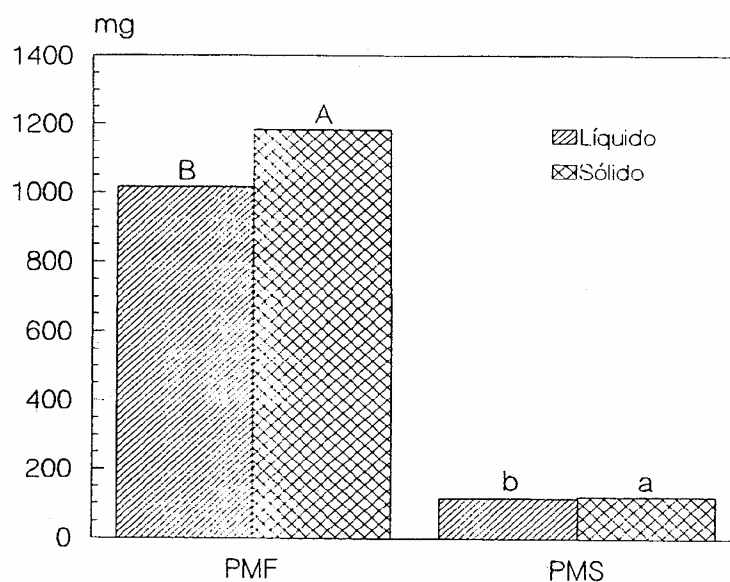
(\*) significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade;

(\*\*) significativo pelo teste F, a 1% de probabilidade;

(1) valores transformados em  $\ln(x+0,5)$ ;

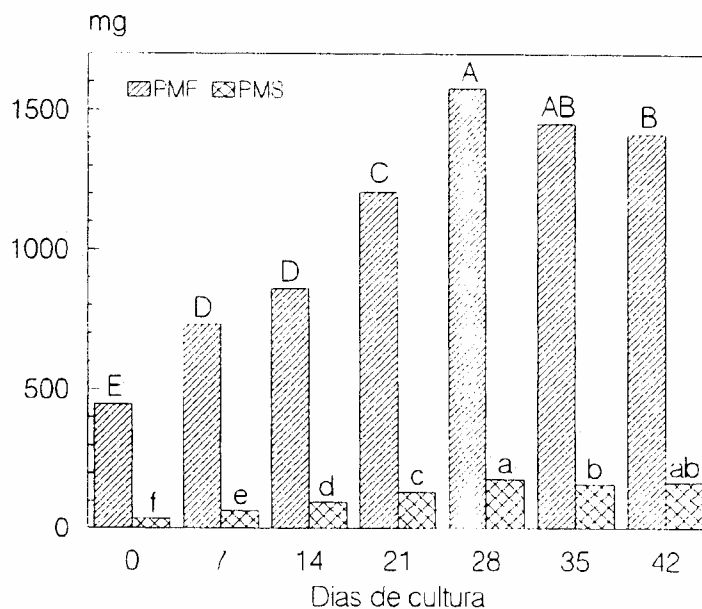
(PMF) Produção de matéria fresca;

(PMS) Produção de matéria seca.



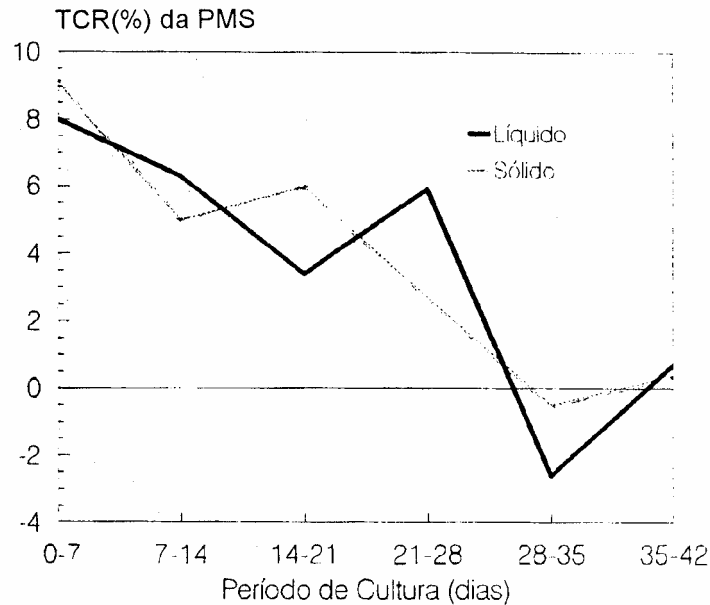
**FIGURA 1 .Produção de matéria fresca (PMF) e seca (PMS) de clones de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas em meio de cultura líquido e sólido aos 42 dias de cultura. Barras com letras maiúsculas (PMF) ou minúsculas (PMS) iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.**

Aumentos crescentes de PMF e PMS dos clones obtidos até o 28º dia diferenciaram estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Neste período, foram alcançadas as maiores médias de PMF e PMS (FIGURA 2).



**FIGURA 2. Variações nas produções de matéria fresca (PMF) e seca (PMS) para clones de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas em meio de cultura líquido e sólido durante 42 dias de cultura. Barras com letras maiúsculas (PMF) ou minúsculas (PMS) iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.**

As maiores médias das taxas de crescimento relativo da PMS foram alcançadas nos primeiros sete dias de cultura. Após este período, houve redução da taxa de crescimento relativo da PMS em meio de cultura sólido até o 21º dia. Em meio líquido houve maiores variações das taxas de crescimento relativo da PMS até o 28º dia de cultura (FIGURA 3).



**FIGURA 3. Variação da taxa de crescimento relativo da produção de matéria seca (PMS) para clones de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas em meio de cultura líquido e sólido.**

A ocorrência de médias negativas para taxas de crescimento relativo da PMS no intervalo entre do 28<sup>o</sup> dia e o 35<sup>o</sup> dia em meio de cultura líquido e sólido pode estar relacionada com o tipo de amostragem realizada (aleatória e destrutiva) aliado à heterogeneidade encontrada para os tamanhos dos explantes (FIGURA 3). Adicionalmente, a redução e estabilização das PMF e PMS dos clones após o 28<sup>o</sup> dia (FIGURA 2) podem estar relacionadas com o esgotamento de um ou mais nutrientes dos meios de cultura necessários para manter um crescimento ótimo, ao próprio crescimento dos explantes e/ou ao acúmulo de produtos inibidores resultantes do próprio metabolismo celular.

O uso de ágar como agente solidificante do meio sólido pode estar interferindo nos processos de absorção e de translocação de íons (WILLIAMS, 1993). Este produto, dependendo da qualidade e/ou origem, pode apresentar na sua composição substâncias inibidoras ao crescimento e desenvolvimento de gemas conforme observou DEBERGH (1983) em culturas de *Cyanara scolymus* e MACRAE; V AN ST ADEN (1990) nas fases de multiplicação e de alongamento de gemas de *E. grandis*.

Após o 28<sup>o</sup> dia de cultura, observou-se que alguns explantes mantidos em meio líquido apresentaram, gemas com crescimento em altura desuniforme, com folhas largas, vítreas e translúcidas. Esses aspectos caracterizam a ocorrência de hiperidricidade observada freqüentemente em cultivo de plantas in vitro conforme citações feitas por PAQUES (1991) e DEBERGH (1992). Em meio sólido houve maior uniformidade para o crescimento em altura das gemas. Porém, alguns explantes após o 30<sup>o</sup> dia de cultura apresentaram gemas com deficiências nutricionais e senescência. Estes sintomas que caracterizam desequilíbrios fisiológicos, metabólicos e/ou nutricionais podem estar relacionados com níveis endógenos de BAP, adquiridos por meio de subculturas sucessivas e/ou adicionados ao meio de cultura (DEBERGH, 1983). Segundo SODI et alii (1990), o

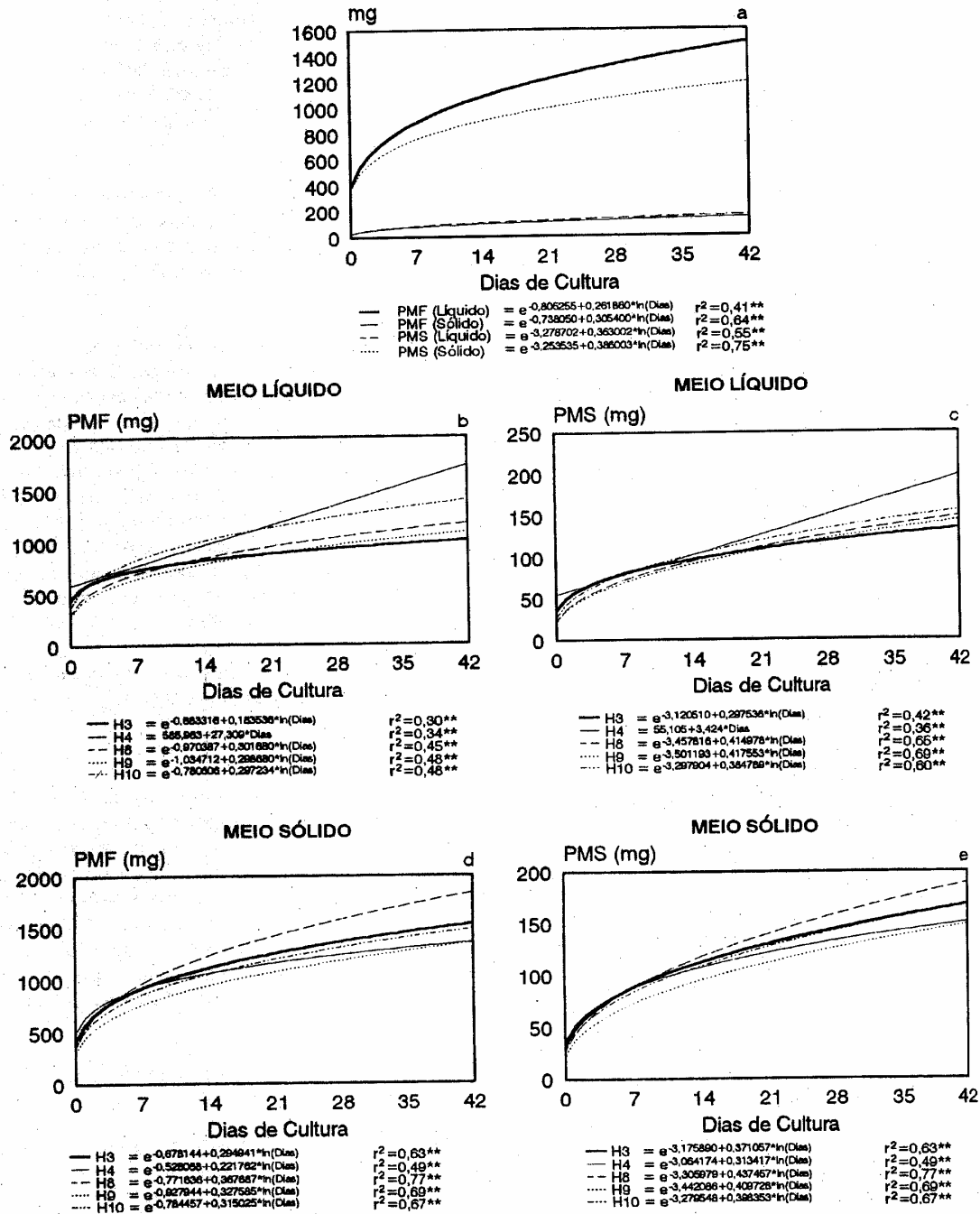
aumento do nível de BAP endógeno ocasionou elevação da concentração de etileno no frasco das culturas. BAP estimula o metabolismo de nitrogênio e conseqüentemente favorece o alongamento das gemas, uma vez que influencia na produção endógena de AIA, de etileno e de outros reguladores de crescimento que estão diretamente envolvidos no crescimento e desenvolvimento de plantas (SALISBURY & ROSS, 1985).

A aplicação da análise de variância da regressão para PMF e PMS, obtidas em meio líquido e sólido em função do período de cultura, demonstrou que o modelo logarítmico foi altamente significativo pelo teste F ( $p < 0,01$ ).

Na FIGURA 4, verifica-se a superioridade para a PMF e PMS dos clones em meio sólido. A produção estimulada de 150 mg de matéria seca/explante foi alcançada no 34º dia. Isto corresponde à média de 1409,6 mg de matéria fresca/explante. O resultado indica que o meio sólido não apresenta equilíbrio nutricional para suprir a taxa de crescimento prevista após o 34º dia e/ou condições ideais para o crescimento e desenvolvimento das culturas. Em meio líquido, este índice não foi alcançado em 42 dias de cultura. Estas respostas devem estar correlacionadas com a estabilização da PMF e PMS após o 28º dia (FIGURA 2), com as variações das taxas de crescimento relativo da PMS (FIGURA 3) e com a perda do vigor das gemas após o 28º dia e 30º dia em meio líquido e sólido, respectivamente. Nestas condições de cultivo, a realização de subculturas em períodos menores do que 20 dias poderia favorecer a manutenção da qualidade das culturas e o aumento da taxa de multiplicação das gemas.

Cada clone apresentou um potencial específico para a PMF e PMS sendo estas variáveis influenciadas pelo meio de cultura e pelas condições ambientais e micro-ambientais de crescimento.

O modelo logarítmico foi altamente significativo pelo teste F ( $p < 0,01$ ) para PMF e PMS dos clones em meio de cultura líquido ou sólido. Somente para o clone H4, quando cultivado em meio líquido, o modelo linear foi o mais adequado para expressar as PMF e PMS (FIGURA 4b e FIGURA 4c). Neste caso, a produção de 150 mg de matéria seca/explante foi alcançada no 28º dia, podendo atingir 200 mg de matéria seca/explante no 42º dia de cultura. Esta resposta significa que o meio líquido e as condições ambientais de crescimento tenham favorecido a ocorrência de *steady state* atingindo o equilíbrio entre absorção de nutrientes e a conversão em matéria seca, havendo desta forma, a otimização do sistema de produção in vitro para o clone H4. Este clone cultivado em meio sólido alcançou a PMS estimada somente em 41 dias (FIGURA 4e). Isto representa que o ágar pode ter sido um dos obstáculos para o crescimento e desenvolvimento de gemas.



**FIGURA 4. Produção de matéria fresca (PMF) e seca (PMS) de clones de *E. grandis* x *E. urophylla* na fase de multiplicação de gemas em meio líquido e sólido durante 42 dias de cultura: (a) para todos os clones, (b e c) para os clones H3, H4, H8, H9 e H10 em meio de cultura líquido e (d e e) para os clones H3, H4, H8, H9 e H10 em meio de cultura sólido.**

O clone H8 quando cultivado em meio sólido apresentou maior PMF e PMS (FIGURAS 4d e 4e). A produção de 150 mg de matéria seca/explante foi atingida no 26<sup>o</sup>

dia enquanto, em meio líquido, esta produção foi alcançada no 40º dia (FIGURA 4c). Os clones H3 e H10 obtiveram 150 mg de matéria seca/explante no 32º dia em meio sólido (FIGURA 4e). Em meio líquido, o clone H3 não atingiu a produção estimada em 42 dias e o clone H10 pode alcançá-la no 37º dia (FIGURA 4c).

O clone H9 foi o menos produtivo quando cultivado em meio sólido (FIGURAS 4d e 4e). Em meio líquido, este clone apresentou menor crescimento até o 20º dia. Posteriormente, superou a produção do clone H3 tanto para PMF quanto para PMS (FIGURAS 4b e 4c).

Os resultados obtidos indicaram que a heterogeneidade para PMF e PMS ao longo do período experimental podem ser explicados pela variabilidade genética, pela especificidade nutricional do meio de cultura para com a cultura e pelos fatores ambientais de crescimento. Estes resultados também foram observados por CORREIA (1993) quando avaliou o crescimento e desenvolvimento de gemas de clones de **E. grandis** e de prováveis híbridos de **E. grandis** x **E. botryoides** e de **E. grandis** x **E. tereticornis**. Neste caso, as maiores PMF e PMS foram alcançadas em meio de cultura líquido. A maior PMS foi obtida para **E. grandis** e, em menor período de tempo. Foi possível verificar a importância da especificidade do meio de cultura para com a espécie quando se deseja a proliferação de gemas com uniformidade em altura e maior vigor.

Além da especificidade nutricional do meio de cultura para a espécie, progênie e/ou clone, fatores ambientais como: aeração no meio de cultura e controle de seu fluxo, o termoperíodo, a qualidade e intensidade de luz e fotoperíodo podem estar influenciando o crescimento e desenvolvimento das gemas.

## CONCLUSÕES

O crescimento e desenvolvimento de gemas de clones de híbridos de **E. grandis** x **E. urophylla** em meio de cultura líquido e sólido, na fase de multiplicação de gemas, permitiu observar:

- maior PMF e PMS em meio sólido aos 42 dias de cultura;
- ganhos crescentes de PMF e PMS até o 28º dia de cultura;
- maiores taxas de crescimento relativo da PMS nos primeiros sete dias de cultura;
- reduções e variações das taxas de crescimento relativo da PMS até o 21º dia de cultura e 28º dia de cultura em meio sólido e líquido, respectivamente, com estabilização da taxa de crescimento relativo da PMS até o 42º dia de cultura;
- variações entre clones para a PMF e PMS em 42 dias de culturas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CHAMFLORA AGRÍCOLA LTDA pelo suporte financeiro e apoio fornecido pela equipe técnica do laboratório de micropropagação dessa Empresa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, F.T. - Cultura do eucalipto: melhoramento genético do eucalipto. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, 12(141): 36-46, set.1986.

- ASSIS, F.T. - Produção de híbridos interespecíficos em **Eucalyptus** spp. In: REUNIÃO SOBRE TÉCNICAS PARA PRODUÇÃO DE HÍBRIDOS, Piracicaba, 1987. Piracicaba, IPEF, 1987. p. 3-32.
- BRIGATTI, R.A. et al. - Polinização controlada em **Eucalyptus urophylla**: um programa desenvolvido pela Champion Papel e Celulose S.A. **Silvicultura**, São Paulo, 8(28): 213-5, 1983.
- CORREIA, D. - **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de Eucalyptus spp in vitro em meio de cultura líquido e sólido**. Piracicaba, 1993. 113 p. (Tese-Mestrado-ESALQ).
- DEBERGH, P.C. - Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia plantarum**, Copenhagen, 59: 270-86, 1983.
- DEBERGH, P.C. et al. - Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. **Plant cell, tissue and organ culture**, Dordrecht, 30: 135-40, 1992.
- GONÇALVES, A.N. - Reversion to juvenility and cloning of **Eucalyptus urophylla** S.T. Blake in cell and tissue culture system. In: SIMPÓSIO IUFRO EM MELHORAMENTO GENÉTICO E PRODUTIVIDADE DE ESPÉCIES FLORESTAIS DE RÁPIDO CRESCIMENTO, Águas de São Pedro, 1980.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. - Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.A. - **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília, 1990. p. 99-200.
- HIGA, A. R. et alii - Programas de melhoramento genético de Eucalyptus no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL: O DESAFIO DAS FLORESTAS NEO-TROPICAIS, Curitiba, 1991. **Anais**. Curitiba, UFPR, 1991. p. 86-100.
- HUNT, R. - **Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis**. London, Edward Arnold, 1982. p.14-46.
- IKEMORI, Y.K. - **Genetic variation in characteristics of Eucalyptus grandis raised from micro-propagation, macro-propagation and seed**. Oxford, 1990. 123p. (Tese-Doutoramento-OFU).
- IKEMORI, Y.K; CAMPINHOS, E. - Produção de sementes de **Eucalyptus grandis** x **Eucalyptus urophylla** por polinização aberta: resultados preliminares. **Silvicultura**, São Paulo, 8(28): 306-8, jan/fev.1983.
- MACRAE, S.; VAN STADEN, J. - In vitro culture of **Eucalyptus grandis**: effect of gelling agents on propagation. **Journal plant physiologica**, Congella, 137: 249-51, 1990.

ODA, S.; FERREIRA, M. - Produção de híbridos interespecíficos por polinização aberta. **Silvicultura**, São Paulo, 8(28): 407-8, 1983.

PAQUES, M. - Vitrification and micropropagation: causes, remedies and propects. **Acta horticulturae**, Genova, 289: 283-99, 1991.

SALISBURY, J.B.; ROSS, C.W. - Plant development. In: CAREY, J.C. - **Plant physiology**. 3.ed. Belmont, Wadsworth, 1985. p.290-447.

SODI, A.M. et al. - Ethylene involvement in "in vitro" regeneration of lily. **Acta horticulturae**, Genova, 280: 151-4, 1990.

WILLIAMS, R.R. - Mineral nutrition "in vitro": a mechanistic approach. **Australian journal of botany**, Melbourne, 41: 237-51, 1993.

Trabalho recebido = 27/09/1994

Trabalho aceito = 16/03/1995