

ARTIGO ORIGINAL

**Formação de jardim clonal *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus*:
parâmetros genéticos, recipientes e substratos*****Establishing an in vitro clonal hedge of Eucalyptus genotypes:
genetic parameters, containers, and substrates***Natane Amaral Miranda Padua^{1*} , Wagner Campos Otoni² , Aloisio Xavier² ¹Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil²Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, MG, Brasil

INFORMAÇÕES DO ARTIGO

Fonte de financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brasil (CAPES) – Código 001. Conflito de interesse: Nada a declarar.

*Autor correspondente:
nataneamaral@gmail.com

Recebido: 18 fevereiro 2026.

Aceito: 17 junho 2026.

Editor: Alexandre de Vicente Ferraz.

Como citar: Padua, N. A. M., Otoni, W. C., & Xavier, A. (2026). Formação de jardim clonal *in vitro* de genótipos de *eucalyptus*: parâmetros genéticos, recipientes e substratos. *Scientia Forestalis*, 54, e4199. <https://doi.org/10.18671/scifor.v54.16>

RESUMO

Para viabilizar a propagação *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus* em larga escala, é necessário tornar a técnica produtiva e competitiva em relação ao sistema de produção por miniestaquia. O jardim clonal *in vitro* pode oferecer vantagens em relação à miniestaquia, desde que fatores relevantes e condições de cultivo sejam adequadamente ajustados. Entre estes fatores destacam-se a seleção de genótipos com alta capacidade de produção de microestacas e propagação *in vitro*, além da definição dos ambientes mais adequados para sua condução. Neste trabalho, objetivou-se estimar parâmetros genéticos relacionados ao crescimento das brotações e avaliar diferentes recipientes e substratos na formação de jardim clonal *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus*. Brotações de dez genótipos foram cultivadas em quatro tipos de recipientes (potes, frascos, Agripot® e tubo de ensaio), em meio gelificado com ágar. Também foi avaliado o desempenho dos dez genótipos em cinco substratos (ágar, areia, fibra de celulose, substrato comercial e vermiculita). Para a estimativa dos componentes de variância e dos parâmetros genéticos, utilizou-se a metodologia de modelos mistos, via procedimento REML/BLUP. Verificaram-se efeitos significativos dos genótipos sobre o crescimento das plantas, permitindo a seleção dos mais responsivos à propagação *in vitro*. Os ambientes mais favoráveis à formação de jardim clonal *in vitro* de *Eucalyptus* foram frascos de vidro de 250 mL e potes de polipropileno de 500 mL associados ao uso de ágar ou vermiculita como substratos.

Palavras-chave: Propagação vegetativa; Silvicultura clonal; Microestaca.

ABSTRACT

To enable large-scale *in vitro* propagation of *Eucalyptus* genotypes, the technique must become more productive and cost-effective than the current mini-cutting system. *In vitro* clonal hedges may offer advantages over conventional mini-cuttings, provided that key factors and cultivation conditions are optimized. In particular, genotype selection and growing conditions are critical, especially regarding the capacity for micro-cutting production and overall *in vitro* performance. This study aimed to estimate genetic parameters related to *in vitro* plant growth and to evaluate the effects of container type and substrate composition on the establishment of *in vitro* clonal hedges of *Eucalyptus* genotypes. Explants from ten genotypes were cultivated in four types of containers (pots, flasks, Agripot®, and test tubes), using agar-gelled medium. Their performance was also assessed across five substrates (agar, sand, cellulose fiber, commercial substrate, and vermiculite). Variance components and genetic parameters were estimated using mixed models with the REML/BLUP approach. Genotypic differences significantly influenced plant growth, allowing the identification of genotypes with greater responsiveness to *in vitro* propagation. The most favorable conditions for establishing an *in vitro* clonal hedge of *Eucalyptus* were 250 mL glass flasks and 500 mL polypropylene pots combined with agar or vermiculite as substrates.

Keywords: Vegetative propagation; Clonal forestry; Micro-cutting.



1. INTRODUÇÃO

O setor florestal brasileiro conta com uma área de 10,5 milhões de hectares plantados com árvores, dos quais 8,1 milhões de hectares são ocupados por plantios de *Eucalyptus*, representando um importante segmento na geração de renda e no desenvolvimento nacional (Indústria Brasileira de Árvores, 2025). A crescente demanda por produtos e subprodutos florestais estimula o aumento dos plantios e da produtividade, sendo grande parte desse crescimento creditado aos programas de melhoramento genético, produção de híbridos e genótipos adaptados (Benatti et al., 2025). Também os avanços do conhecimento de tecnologias da propagação vegetativa têm grande contribuição nesse processo (Xavier et al., 2021).

Entre as técnicas de propagação clonal, a micropropagação é uma alternativa para produção de mudas de *Eucalyptus*, que permite a propagação massal de diferentes genótipos em tempo e espaço físico reduzidos. Além de permitir maior controle do ambiente, nutricional, fitossanitário, rejuvenescimento/revigoramento pela clonagem, armazenamento por longos períodos e retenção do vigor híbrido (Trueman et al., 2018; Rathore et al., 2025). Apesar das vantagens potenciais da micropropagação, a propagação de genótipos comercialmente importantes ainda é principalmente realizada pela miniestaquia. Alguns desafios para uso da micropropagação são o alto investimento, contaminação por microrganismos e desenvolvimento de protocolos diferenciados para espécies ou grupos de genótipos (Chen, 2016; Xavier et al., 2021; Castro-Camba et al., 2023; Dhiman, 2025).

Para viabilizar a técnica de micropropagação em larga escala, é preciso torná-la produtiva e vantajosa em relação ao sistema de produção de miniestacas em minijardins clonais. O desenvolvimento de jardim clonal *in vitro* para produção de microestacas surge como alternativa a ser testada a fim de unir as vantagens da propagação *in vitro* com a funcionalidade do jardim clonal (Miranda et al., 2023). No entanto, para viabilizar a implantação deste sistema de produção é necessária a otimização de condições de cultivo. A variação genotípica exige, muitas vezes, a otimização e implementação de protocolos específicos (Watt, 2014), enquanto que, os recipientes utilizados no cultivo *in vitro* variam em virtude do espaço interno de cultivo, influenciando na composição da fase gasosa do frasco, e, consequentemente, o crescimento e o desenvolvimento das culturas (Xiao et al., 2011).

Além disso, o uso de substratos alternativos em substituição ao ágar, pode reduzir o custo de produção e também permitir melhores resultados quanto ao desenvolvimento das plantas (Oliveira et al., 2014; Curti & Reiniger, 2014). Contudo, estudos sobre seleção de materiais genéticos, recipientes e substratos utilizados na implantação do jardim clonal são importantes para maximizar a produtividade das culturas *in vitro*. Este trabalho objetivou estimar parâmetros genéticos das características de crescimento das plantas *in vitro* e avaliar diferentes recipientes e substratos na formação de jardim clonal *in vitro* de *Eucalyptus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. Utilizou-se como explantes segmentos nodais ou um conjunto de brotações com gemas diferenciadas de dez genótipos de *Eucalyptus* spp. (Tabela 1).

As brotações contendo gemas diferenciadas, estabelecidas *in vitro* em tubos de ensaio, foram mantidas em 10 mL de meio de cultura

com base na formulação salina JADS (Correia et al., 1995), adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), 2,2 µM de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,05 µM de ácido α-naftalenoacético (ANA) e 6 g L⁻¹ de ágar (Merck®). Os segmentos nodais, com cerca de 3 cm contendo 2 a 3 pares de folhas, foram obtidos *in vitro* em meio JADS com a adição de 1,23 µM de ácido indol-3-butírico (AIB) e 0,22 µM de BAP.

O meio de cultura teve o pH ajustado para 5,80 ± 0,02 antes da inclusão do ágar ou substratos. Fez-se a esterilização por autoclavagem à pressão de 1,3 atm e temperatura de 121 °C, por 20 minutos. Os cultivos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C por um fotoperíodo de 16 horas de luz, com irradiância de 70 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil).

2.2. Seleção do recipiente

Brotações contendo de quatro a seis gemas diferenciadas de dez genótipos de *Eucalyptus* obtidos *in vitro*, foram transferidas para diferentes recipientes de cultivo.

O delineamento experimental utilizado foi um bifatorial, 10 x 4, com 40 tratamentos: Dez genótipos de *Eucalyptus* (Tabela 1) combinados com quatro tipos de recipientes (pote de polipropileno (500 mL), frasco de vidro (250 mL), frasco de acrílico Agriplot® (250 mL com troca gasosa) e tubo de ensaio (22x150 mm, 55 mL) (Figura 1). Foram utilizadas quatro repetições, distribuídas em blocos ao acaso. Cada unidade experimental foi constituída de acordo com a quantidade de meio de cultura em cada recipiente. Desta forma, o número de explantes foi proporcional ao volume que cada recipiente comportava:

Tabela 1. Identificação dos genótipos de *Eucalyptus* utilizados no cultivo *in vitro*.

Genótipo	Origem genética
G1	<i>Eucalyptus urophylla</i>
G2	<i>Eucalyptus urophylla</i>
G3	<i>Eucalyptus urophylla</i>
G4	<i>Eucalyptus urophylla</i>
G5	<i>Eucalyptus benthamii</i>
G6	<i>Eucalyptus benthamii</i>
G7	<i>Eucalyptus dunnii</i>
G8	<i>Eucalyptus dunnii</i>
G9	<i>Eucalyptus dunnii</i>
G10	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>) x <i>E. viminalis</i>



Figura 1. Recipientes utilizados no cultivo *in vitro* de clones de *Eucalyptus*. Na sequência, Agriplot®, tubo de ensaio, frasco de vidro e potes de polipropileno. Barra = 2 cm.

pote de polipropileno com 10 explantes em 100 mL de meio de cultura; frasco de vidro com 4 explantes em 40 mL; Frasco Agriplot® com 3 explantes em 30 mL e; para tubo de ensaio 1 explante em 10 mL de meio de cultura. Assim, um fator variante em cada tratamento também foi o espaço interno (*headspace*) dos frascos, ou seja, o volume de atmosfera gasosa em cada frasco de cultura, acima do meio de cultura.

Utilizou-se meio de cultura JADS, suplementado com 0,22 µM de BAP mais 1,23 µM de AIB e adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP e 6 g L⁻¹ de ágar. Os tubos de ensaio e frascos de vidro foram vedados com tampas translúcidas de polipropileno, e os potes e frascos Agriplot® foram vedados com tampas próprias, compostas do mesmo material do recipiente.

2.3. Seleção do substrato

Segmentos nodais com cerca de 3 cm contendo 2 a 3 pares de folhas de dez genótipos de *Eucalyptus* obtidos *in vitro* foram transferidos para frascos de vidro (250 mL) contendo 50 cm³ de diferentes tipos de substratos. O delineamento experimental utilizado foi um bifatorial, 10 x 5, com 50 tratamentos: Dez genótipos de *Eucalyptus* (Tabela 1) combinados com cinco tipos de substratos, para o suporte dos explantes (areia, vermiculita, fibra de celulose, substrato florestal comercial - Tropstrato Vida Verde® e meio de cultura com uso de ágar) (Figura 2). O meio nutritivo líquido utilizado nos diferentes substratos foi com base na formulação salina JADS, suplementada com 0,22 µM de BAP mais 1,23 µM de AIB e adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP e para o meio de cultura gelificado usou-se 6 g L⁻¹ de ágar. Em cada frasco foram inoculados dois segmentos nodais de *Eucalyptus* com cinco repetições, distribuído em blocos ao acaso.

2.4. Coleta e análise de dados

Após 30 dias de cultivo avaliou-se, para os testes de recipientes e substratos, para os 10 genótipos, o número de brotações maiores que 0,5 cm (NB), número de microestacas com altura superior a 2 cm (NM), altura da maior microestaca (HM), enraizamento (RZ) e vigor das brotações, avaliado com base em uma escala de notas de 1 a 3, onde 1 (Baixo), 2 (Médio) e 3 (Alto). Também foram avaliadas a massa fresca da parte aérea (MFA) e área foliar (AF) no teste de substratos.

Para estimativas de componentes de variância e parâmetros genéticos utilizou-se a metodologia REML/BLUP, baseada na estimação de componentes de variância via máxima verossimilhança residual (REML) e predição de valores genéticos e a seleção via melhor predição linear não viesada (BLUP). Houve uma medição simultânea de estabilidade,

adaptabilidade e produtividade pela média harmônica do desempenho relativo dos valores genotípicos (MHPRVG) (Resende, 2007). O modelo utilizado, considerando vários ambientes (recipientes ou substratos) e uma única observação por parcela (média dos explantes) foi:

$$y = Xr + Zg + Wi + e \quad (1)$$

Em que **y** é o vetor de dados; **r** é o vetor dos efeitos de repetição (assumidos como fixos) somados à média geral; **g** é o vetor dos efeitos genotípicos (assumidos como aleatórios); **i** é vetor dos efeitos da interação genótipo x ambiente (aleatórios); e **e** é o vetor de erros ou resíduos (aleatórios).

Realizou-se análise de deviance (ANADEV) (Resende, 2007), teste da razão da máxima verossimilhança (Likelihood Ratio Test) e os valores foram comparados com o valor tabelado de qui-quadrado (6,63) com um grau de liberdade a 1% de probabilidade. As análises foram realizadas mediante software SELEGEN-REML/BLUP (Resende, 2016).

3. RESULTADOS

3.1. Recipientes

O efeito de genótipos e a interação genótipos e recipientes foi significativo para todas as características analisadas, de acordo com a análise de deviance. Com a estimativa dos parâmetros genéticos obtiveram-se altos valores de herdabilidade (*h*²*g*) para todas as variáveis (Tabela 2). Os valores de acurácia encontrados foram de 0,97, 0,95, 0,93, 0,95 e 0,97 para vigor, NB, NM, HM e RZ, respectivamente. O número médio de brotações maiores que 0,5 cm foi de 3,96, enquanto que, o número de microestacas maiores que 2 cm foi de 1,50.



Figura 2. Frascos de vidro de 250 mL de capacidade contendo 50 cm³ dos substratos, da esquerda para direita, ágar, areia, fibra de celulose, substrato florestal comercial e vermiculita. Barra = 2 cm.

Tabela 2. Estimativa de parâmetros genéticos para as características vigor das brotações (escala de notas), número de brotações maiores que 0,5 cm (NB), número de microestacas maiores que 2 cm (NM), altura da maior microestaca (HM) e enraizamento (RZ) avaliadas em 10 genótipos de *Eucalyptus* spp., após 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes recipientes.

Parâmetros	Vigor	NB	NM	HM	RZ
<i>Vg</i>	0,08	1,05	0,28	1,80	354,02
<i>Vint</i>	0,01	0,34	0,13	0,64	77,22
<i>Ve</i>	0,03	0,34	0,14	0,35	62,84
<i>Vf</i>	0,12	1,73	0,55	2,79	494,07
<i>h</i> ² <i>g</i>	0,63±0,18	0,61±0,17	0,51±0,16	0,64±0,18	0,72±0,19
<i>Acgen</i>	0,97	0,95	0,93	0,95	0,97
Média	2,67	3,96	1,50	3,67	11,18

Vg: variância genotípica; *Vint*: variância da interação genótipos x ambientes; *Ve*: variância residual; *Vf*: variância fenotípica individual; *h*²*g*: herdabilidade individual no sentido amplo (dos efeitos genotípicos totais); *Acgen*: acurácia da seleção de genótipos, assumindo sobrevivência completa.

A média de enraizamento nos ambientes para os dez genótipos foi de 11,2%.

Na análise conjunta dos diferentes recipientes utilizados, para a característica NM, o genótipo G1 (*Eucalyptus urophylla*) apresentou o maior valor genético (Tabela 3). Enquanto que, os outros três genótipos de *Eucalyptus urophylla* (G2, G3 e G4) apresentaram valores negativos. Os dois genótipos de *Eucalyptus benthamii* (G5 e G6) utilizados na análise apresentaram o segundo e terceiro maiores valores genéticos na classificação.

Os frascos de vidro e potes de polipropileno foram os recipientes que representaram ambientes mais favoráveis para produção de microestacas com alturas maiores que 2 cm (Tabela 4). Em todos os

ambientes foi possível obter microestacas dos genótipos (Figura 3). No entanto, o uso de frascos de vidro foi considerado ambiente superior para aumentar a produção de microestacas de oito dentre os dez genótipos avaliados.

Segundo os critérios PRVG, MHVG e MHPRVG, os quatro melhores genótipos são G1 (*E. urophylla*), G6 (*E. benthamii*), G5 (*E. benthamii*) e G9 (*E. dunnii*) (Tabela 5). Estes genótipos, pelo critério MHPRVG, apresentaram superioridade média de 61% (G1), 49% (G5), 11% (G6) e 10% (G9) sobre a média geral dos quatro recipientes. Com a seleção desses quatro melhores genótipos para a variável NM há um ganho de 32,7% sobre a média geral dos ambientes, considerando simultaneamente a produtividade, estabilidade e adaptabilidade nos locais.

Tabela 3. Classificação dos valores genotípicos (g), médias genotípicas (u + g), ganhos genéticos preditos e nova média para o caráter número de microestacas maiores que 2 cm para dez genótipos de *Eucalyptus*, após 30 dias de cultivo *in vitro* considerando diferentes recipientes.

Genótipo	G	u+g	Ganho	Nova média
G1	0,90	2,40	0,90	2,40
G5	0,68	2,18	0,79	2,29
G6	0,23	1,74	0,60	2,11
G9	0,15	1,65	0,49	1,99
G7	0,00	1,50	0,39	1,90
G8	-0,19	1,31	0,30	1,80
G2	-0,33	1,18	0,21	1,71
G10	-0,37	1,13	0,13	1,64
G3	-0,49	1,02	0,06	1,57
G4	-0,58	0,92	0,00	1,50

Tabela 4. Recipientes superiores para cada genótipo de *Eucalyptus* considerando valores genotípicos e valores preditos para a variável número de microestacas maiores que 2 cm, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Genótipo	Recipiente	Ganho	Nova média
G1	Pote	1,73	3,42
G2	Frasco	0,32	2,14
G3	Pote	0,23	1,93
G4	Frasco	0,00	1,82
G5	Frasco	0,98	2,80
G6	Frasco	0,89	2,71
G7	Frasco	0,60	2,42
G8	Frasco	0,45	2,27
G9	Frasco	0,76	2,57
G10	Frasco	0,19	2,01

Tabela 5. Classificação da estabilidade de valores genotípicos (MHVG), adaptabilidade de valores genotípicos (PRVG e PRVG*MG), estabilidade e adaptabilidade de valores genotípicos (MHPRVG e MHPRVG*MG) para número de microestacas maiores que 2 cm dos dez genótipos de *Eucalyptus* cultivados em diferentes recipientes.

Genótipo	MHVG	PRVG	PRVG*MG	Genótipo	MHPRVG	MHPRVG*MG
G1	2,33	1,66	2,49	G1	1,61	2,42
G5	2,21	1,53	2,30	G5	1,49	2,24
G6	1,64	1,18	1,78	G6	1,11	1,66
G9	1,60	1,11	1,67	G9	1,10	1,66
G7	1,44	0,99	1,50	G7	0,99	1,49
G8	1,25	0,86	1,29	G8	0,86	1,29
G10	1,08	0,75	1,12	G2	0,72	1,09
G2	1,03	0,75	1,12	G10	0,72	1,08
G4	0,80	0,62	0,94	G3	0,57	0,85
G3	0,80	0,56	0,84	G4	0,55	0,83

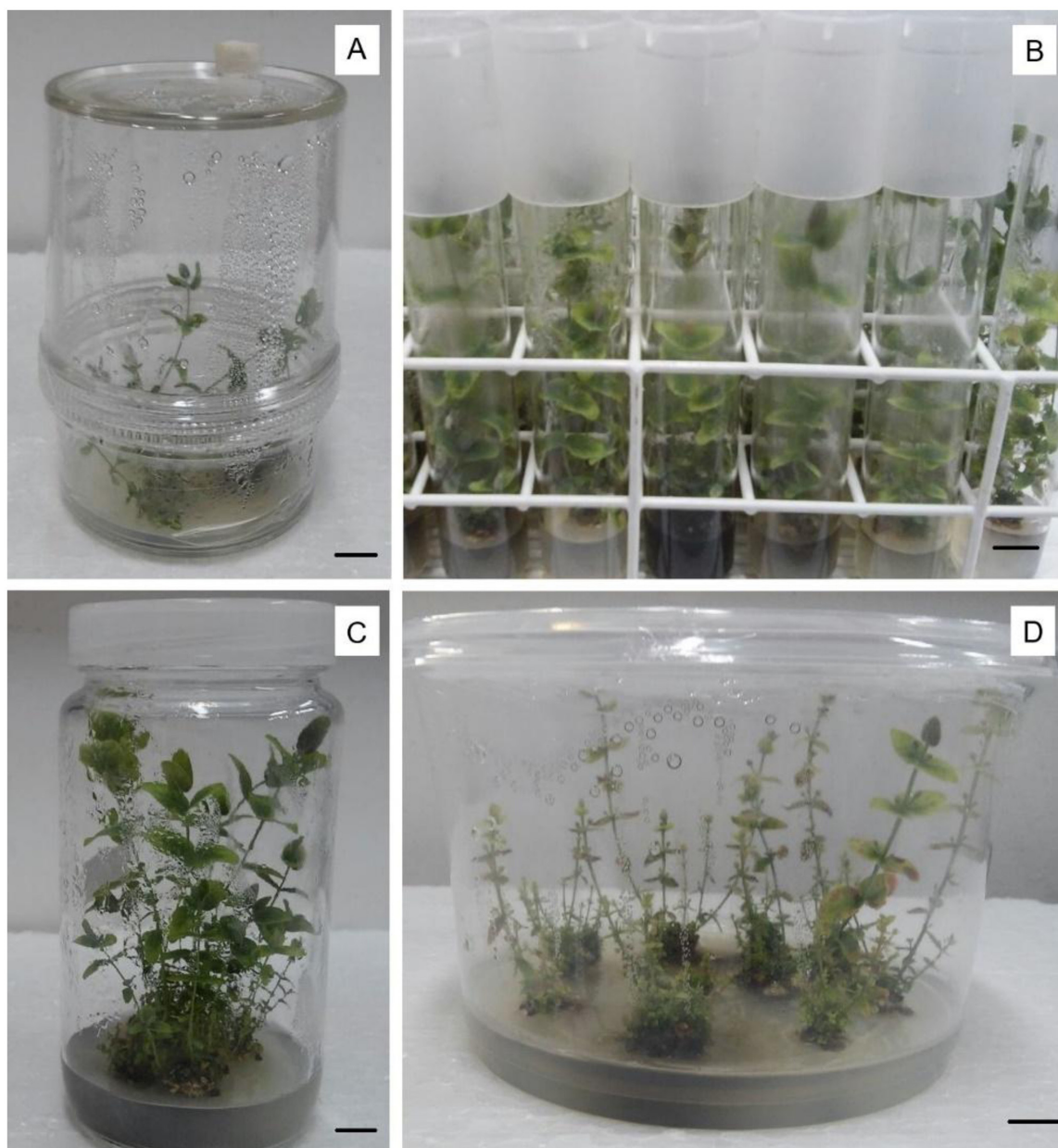


Figura 3. Produção de microestacas *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* em diferentes recipientes. A: Agripot®; B: Tubos de ensaio; C: Frasco de vidro; D: Pote de polipropileno. Barra = 1 cm.

3.2. Substratos

De acordo com a análise de deviance, as diferenças observadas entre os substratos são devido ao efeito dos genótipos, havendo interação significativa entre genótipos e ambientes (substratos) apenas para as características NB, MFA e RZ. A herdabilidade (h^2g) foi baixa ou moderada para todas as variáveis (Tabela 6).

Os maiores valores de acurácia foram encontrados para as variáveis NB, MFA e RZ. Em relação às médias gerais, o número médio de brotações maiores que 0,5 cm foi de 2,48, o número de microestacas maiores que 2 cm foi de 0,85 e com enraizamento de 18,78%.

Na classificação dos valores genotípicos para NM, os quatro genótipos de *Eucalyptus urophylla* (G2, G3, G1 e G4) ficaram entre os cinco genótipos com maior ganho na análise conjunta envolvendo substratos (Tabela 7). Os dois genótipos que apresentaram menor ganho foram o G10 e G9.

Médias gerais das variáveis vigor, NM, HM e AF para os dez genótipos de *Eucalyptus* nos diferentes substratos foram semelhantes com o uso de ágar ou vermiculita. O vigor médio dos dez genótipos em ágar foi de 2,57 e em vermiculita de 2,61. Os valores médios de NM foram de 1,75 para ágar e 1,13 para vermiculita. No geral, os substratos vermiculita e ágar proporcionaram melhores condições para o crescimento das plantas (Figura 4). Os demais substratos apresentaram médias gerais inferiores quando comparados ao uso de ágar ou vermiculita.

Para os dez genótipos de *Eucalyptus* testados, os maiores valores genotípicos de enraizamento, foram obtidos no substrato vermiculita. Para a variável NB houve maior ganho com uso de ágar, em todos os dez genótipos avaliados.

O substrato vermiculita foi superior para os genótipos G1, G2, G3, G6 e G10 na produção de massa fresca da parte aérea. Com o uso de ágar, maiores valores para esta variável são observados nos genótipos G4, G5, G7, G8 e G9 (Tabela 8).

Tabela 6. Estimativa de parâmetros genéticos (Par) para as características vigor das brotações, número de brotações maiores que 0,5 cm (NB), número de microestacas maiores que 2 cm (NM), altura da maior microestaca (HM), massa fresca da parte aérea (MFA), enraizamento (RZ) e área foliar (AF) avaliadas em dez genótipos de *Eucalyptus* depois de 30 dias de cultivo *in vitro* em diferentes substratos.

Par	Vigor	NB	NM	HM	MFA	RZ	AF
<i>Vg</i>	0,02	0,29	0,07	0,02	0,03	520,61	11,06
<i>Vint</i>	0,19	0,47	0,32	0,58	0,02	278,87	33,88
<i>Ve</i>	0,15	0,69	0,57	0,44	0,02	350,02	48,05
<i>Vf</i>	0,36	1,46	0,97	1,04	0,07	1149,49	92,99
<i>H²g</i>	0,05±0,04	0,21±0,09	0,08±0,06	0,02±0,02	0,38±0,12	0,45±0,13	0,12±0,07
<i>Acgen</i>	0,52	0,84	0,67	0,32	0,91	0,94	0,74
<i>Média</i>	2,28	2,48	0,85	1,95	0,31	18,78	13,60

Vg: variância genotípica; *Vint*: variância da interação genótipos x ambientes; *Ve*: variância residual; *Vf*: variância fenotípica individual; *h²g*: herdabilidade individual no sentido amplo (dos efeitos genotípicos totais); *Acgen*: acurácia da seleção de genótipos, assumindo sobrevivência completa.

Tabela 7. Valores genotípicos (g), médias genotípicas (u + g), ganhos genéticos preditos e nova média para o caráter número de microestacas maiores que 2 cm para dez genótipos de *Eucalyptus*, após 30 dias de cultivo *in vitro* considerando diferentes substratos.

Ordem	Genótipo	g	u+g	Ganho	Nova média
1	G2	0,33	1,18	0,33	1,18
2	G3	0,24	1,09	0,28	1,13
3	G8	0,10	0,95	0,22	1,07
4	G1	0,06	0,91	0,18	1,03
5	G4	-0,01	0,84	0,14	0,99
6	G7	-0,06	0,79	0,11	0,96
7	G5	-0,10	0,75	0,08	0,93
8	G6	-0,10	0,75	0,06	0,90
9	G10	-0,22	0,62	0,03	0,87
10	G9	-0,24	0,61	0,00	0,85

Tabela 8. Substratos superiores para cada genótipo de *Eucalyptus* considerando valores genotípicos e valores preditos para a variável massa fresca da parte aérea, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Genótipo	Substrato	Ganho	Nova média
G1	Vermiculita	0,21	0,69
G2	Vermiculita	0,63	1,11
G3	Vermiculita	0,57	1,05
G4	Ágar	0,13	0,65
G5	Ágar	0,04	0,57
G6	Vermiculita	0,10	0,58
G7	Ágar	0,39	0,91
G8	Ágar	0,28	0,80
G9	Ágar	0,18	0,69
G10	Vermiculita	0,29	0,77



Figura 4. Crescimento *in vitro* de *Eucalyptus* spp. em frascos de vidro contendo os substratos água (Ag), areia (Ar), fibra de celulose (Fc), florestal comercial (Cm) e vermiculita (Vm). A: *Eucalyptus dunnii*, genótipo G9; B: *Eucalyptus benthamii*, genótipo G6; C: *Eucalyptus urophylla*, genótipo G2. Barra = 2 cm.

4. DISCUSSÃO

A proposta de um jardim clonal *in vitro* visa reproduzir, em um ambiente de laboratório, uma estrutura semelhante ao jardim clonal em viveiro, mantendo as microcepas em recipientes com reposição de meio nutritivo, para coletas sucessivas de microestacas (Miranda et al., 2023). Neste sistema, o ajuste das condições de cultivo é essencial para aumento da produtividade e longevidade das microcepas cultivadas. Conhecer os materiais genéticos mais promissores, os recipientes e os substratos mais indicados são os primeiros passos para o sucesso da técnica.

As diferenças observadas no desenvolvimento *in vitro* do material vegetal de *Eucalyptus* são atribuídas à interação genótipo x ambiente, considerando como ambiente os diferentes substratos e recipientes utilizados. Estudos sobre a interação genótipo x ambiente são importantes e têm sido realizados principalmente visando otimizar recomendações de materiais melhorados (Gezan et al., 2017; Sá & Tambarussi, 2023; Poupon et al., 2023).

Entre os recipientes testados, o frasco de vidro foi o que proporcionou melhores condições de desenvolvimento para grande parte dos genótipos avaliados, seguido pelos potes de polipropileno. Para estabelecimento de um jardim clonal *in vitro* de *Eucalyptus*, o uso de frascos de vidro representa uma boa opção para crescimento de microcepas. Maior produtividade e qualidade de microestacas podem ser obtidas com a seleção dos genótipos que tiveram melhor desempenho nesse recipiente.

O tipo de recipiente já foi indicado como fator responsável por produtividade de microestacas, por influenciar no enraizamento *in vitro* e também pela aclimatização de plantas *ex vitro* (McClelland & Smith, 1990; Hazra et al., 2000; Montalbán & Moncaleán, 2018). Esses resultados podem estar relacionados a fatores ambientais internos que afetam o desenvolvimento de explantes. O volume dos frascos e o *headspace* representam diferenças nas concentrações de dióxido de carbono e de etileno, além de serem afetados por irradiação de luz, temperatura do ar e umidade relativa (Zimmerman, 1995; Xiao et al., 2011; Poisson et al., 2016; Ozudogru et al., 2017). Segundo Vollmer et al. (2024), o desenvolvimento e a qualidade das plantas são aprimorados pelo ajuste das condições de cultivo *in vitro*, particularmente a taxa de troca gasosa, a densidade de plantio e o volume do recipiente utilizado. Além disso, no cultivo de plantas em salas de cultura, a escolha do recipiente influenciará a forma de acomodação e as possibilidades de empilhamento nas prateleiras, permitirá o aumento da produção, ou manutenção de microestacas por metro quadrado (Gallo et al., 2017).

De acordo com a classificação proposta por Resende (2002) para espécies perenes, os valores obtidos de herdabilidades (h^2g) para todas as características são considerados altos, nos diferentes recipientes, indicando que há controle genético dessas características. Os quatro genótipos com melhor desempenho de produção de microestacas foram G1, G5, G6 e G9, e os altos valores de acurácia encontrados para as características vigor, NB, NM, HM e RZ conferem segurança nos valores genéticos estimados.

Para selecionar os melhores materiais genéticos existem diferentes estratégias, e o método MHPRVG apresenta a vantagem adicional de selecionar materiais de acordo com sua adaptabilidade e estabilidade fenotípica (Rosado et al., 2012; Farias Neto et al., 2013). A seleção de genótipos com base no desempenho médio em todos os ambientes e a seleção pelo método MHPRVG, neste estudo, resultaram na escolha dos mesmos materiais genéticos para a característica NM. A capacidade de materiais genéticos apresentarem boa adaptação em maior amplitude de condições de ambiente, e sua capacidade de resposta à melhoria do ambiente, podem ser fatores essenciais em programas de melhoramento genético. Neste contexto, a análise da estabilidade e adaptabilidade dos materiais genéticos torna-se relevante (Resende, 2007).

Para as características vigor, NM, HM e AF, é possível realizar seleção de genótipos a partir da avaliação do seu desempenho médio na análise conjunta dos substratos, uma vez que apenas o fator genótipo foi significativo. Para as características NB, MFA e RZ, avaliadas neste trabalho, foram observados elevados valores de acurácia. Essas características, contudo, tornam-se importantes na seleção do genótipo e do substrato mais indicado para o cultivo *in vitro*. Da mesma forma que, a proximidade entre os valores genéticos preditos e os valores genéticos verdadeiros dos indivíduos pode ser avaliada com base na acurácia (Resende, 2002).

No contexto geral, o uso dos substratos ágar e vermiculita permitiram melhor desenvolvimento dos genótipos *in vitro*. Resultados semelhantes também foram observados em *Eucalyptus* no trabalho de Gallo et al. (2017), que com o uso dos substratos ágar e vermiculita, em frascos Agripot®, que permitem trocas gasosas, observaram maior produção de microestacas. O ágar é amplamente utilizado na cultura de tecidos, no entanto, a sua principal desvantagem é o custo mais elevado (Castro-Camba et al., 2023). Além disso, em um sistema de jardim clonal *in vitro* onde se propõe a reposição do meio de cultura líquido para manutenção das microcepas nos mesmos recipientes, o uso de ágar pode dificultar o processo.

No presente trabalho, o enraizamento das plantas, para todos os genótipos, foi significativamente superior com o uso do substrato vermiculita. O estabelecimento do sistema radicular é um fator importante para que as plantas do jardim clonal possam manter-se produtivas durante o tempo de retirada de microestacas. Com a adição de vermiculita altera-se a porosidade do substrato, o equilíbrio entre aeração e disponibilidade de água e nutrientes, resultando em melhoria no desenvolvimento das plantas e raízes *in vitro* (Saldanha et al., 2014; Tuan et al., 2016). Com isso, reforça-se a importância deste fator na produção vegetal.

5. CONCLUSÕES

Há controle genético para as características de crescimento das plantas *in vitro* o que permite a seleção de genótipos de *Eucalyptus* mais responsivos à micropropagação. Os diferentes frascos e substratos avaliados foram responsáveis por diferentes respostas no crescimento *in vitro* de *Eucalyptus*. Para a formação de jardim clonal *in vitro*, os frascos de vidro de 250 mL ou potes de polipropileno de 500 mL representam ambientes mais favoráveis para o desenvolvimento dos genótipos de *Eucalyptus*. Os substratos ágar ou vermiculita favorecem o estabelecimento dos genótipos no jardim clonal *in vitro*, no entanto, considerando a necessidade de reposição de meio líquido para manutenção das microcepas, o uso de vermiculita é mais adequado na formação do jardim clonal *in vitro* de *Eucalyptus*.

6. AGRADECIMENTOS

Reconhecemos com gratidão o valioso apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCT-II) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO). Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Benatti, T. R., Ferreira, F. M., da Costa, R. M. L., de Moraes, M. L. T., Aguiar, A. M., Dias, D. da C., de Matos, J. W., Fernandes, A. C. M., Andrade, M. C., de Siqueira, L., Brum, I. J. B., do Nascimento, A. V., Utsunomiya, Y. T., Garcia, J. F., & Tambarussi, E. V. (2025). Accelerating eucalypt clone selection pipeline via cloned progeny trials and molecular data. *Plant Methods*, 21(1), 19. PMID:39953507. <https://doi.org/10.1186/s13007-025-01342-3>.

- Castro-Camba, R., Vielba, J. M., Covelo, P., Vidal, N., & Sánchez, C. (2023). Reducing costs, improving profits: A low-cost culture media for woody plants micropropagation. *Journal of Forest Science*, 60(9), 366-388. <https://doi.org/10.17221/56/2023-JFS>.
- Chen, C. (2016). Cost analysis of plant micropropagation of *Phalaenopsis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126(1), 167-175. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0987-4>.
- Correia, D., Gonçalves, A. N., Couto, H. T. Z., & Ribeiro, M. C. (1995). Efeito do meio de cultura líquido e sólido no desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. *IPEF*, 48(49), 107-116.
- Curti, A. R., & Reiniger, L. R. S. (2014). Formação *in vitro* de raízes em canafistula: o efeito de diferentes meios de cultivo. *Ciência Rural*, 44(2), 314-320. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000200019>.
- Dhiman, R. C. (2025). Clonal forestry. In A. K. Mandal & A. Nicodemus (Eds.), *Textbook of forest science* (pp. 571-594). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-97-8289-5_26.
- Farias Neto, J. T. D., Moura, E. F., Resende, M. D. V. D., Celestino Filho, P., & Augusto, S. G. (2013). Genetic parameters and simultaneous selection for root yield, adaptability and stability of cassava genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(12), 1562-1568. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013001200005>.
- Gallo, R., Xavier, A., Oliveira, B. D. A., Moura, L. D., Miranda, N. A., Gatti, K. C., & Otoni, W. C. (2017). Micro-cutting propagation of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* through clumps of axillary buds using different containers and substrates. *Australian Journal of Crop Science*, 11(10), 1327-1333. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.10.pne607>.
- Gezan, S. A., de Carvalho, M. P., & Sherrill, J. (2017). Statistical methods to explore genotype-by-environment interaction for loblolly pine clonal trials. *Tree Genetics & Genomes*, 13(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1081-0>.
- Hazra, S., Kulkarni, A. V., Nalawade, S. M., Banerjee, A. K., Agrawal, D. C., & Krishnamurthy, K. V. (2000). Influence of explants, genotypes and culture vessels on sprouting and proliferation of pre-existing meristems of cotton (*Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium arboreum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant : Journal of the Tissue Culture Association*, 36(6), 505-510. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0090-7>.
- Indústria Brasileira de Árvores – IBÁ. (2025). *Relatório anual IBÁ 2025*. Recuperado em 18 de fevereiro de 2026, de <https://iba.org/wp-content/uploads/2025/10/relatorioAnual2025.pdf>
- McClelland, M. T., & Smith, M. A. L. (1990). Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. *HortScience*, 25(7), 797-800. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.25.7.797>.
- Miranda, N. A., Xavier, A., & Otoni, W. C. (2023). Applicability of *in vitro* clonal hedge in the vegetative propagation of *Eucalyptus urophylla*. *New Forests*, 54(5), 963-974. <https://doi.org/10.1007/s11056-022-09954-6>.
- Montalbán, I. A., & Moncaleán, P. (2018). Rooting of *Pinus radiata* somatic embryos: factors involved in the success of the process. *Journal of Forestry Research*, 30(1), 1-7. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0618-5>.
- Oliveira, K. S. D., Oliveira, M. D. S., Pereira, E. C., Lima, S. C. D., & Aloufa, M. A. I. (2014). Efeito de diferentes meios de cultura na germinação *in vitro* de sementes de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Revista Árvore*, 38(4), 601-607. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622014000400003>.
- Ozudogru, E. A., Benelli, C., Dradi, G., & Lambardi, M. (2017). Effect of culture container and carbohydrate content on *in vitro* slow growth storage of the cherry rootstock 'Gisela®5'. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(4), 94-101. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2372-2>.
- Poisson, A. S., Berthelot, P., Le Bras, C., Grapin, A., Vergne, E., & Chevreau, E. (2016). A droplet-vitrification protocol enabled cryopreservation of doubled haploid explants of *Malus × domestica* Borkh. 'Golden Delicious'. *Scientia Horticulturae*, 209, 187-191. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.030>.
- Poupon, V., Gezan, S. A., Schueler, S., & Lstibůrek, M. (2023). Genotype × environment interaction and climate sensitivity in growth and wood density of European larch. *Forest Ecology and Management*, 545, 121259. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2023.121259>.
- Rathore, T. S., Rathore, S. S., & Chauhan, A. K. (2025). Micropropagation of forest tree species. In A. K. Mandal & A. Nicodemus (Eds.), *Textbook of forest science* (pp. 703-716). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-97-8289-5_32.
- Resende, M. D. V. (2002). *Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes*. Embrapa Informação Tecnológica.
- Resende, M. D. V. (2007). *Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético*. Embrapa Florestas.
- Resende, M. D. V. (2016). Software Selegen-REML/BLUP: A useful tool for plant breeding. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16(4), 330-339. <https://doi.org/10.1590/1984-70332016v16n4a49>.
- Rosado, A. M., Rosado, T. B., Alves, A. A., Laviola, B. G., & Bhering, L. L. (2012). Seleção simultânea de clones de eucalipto de acordo com produtividade, estabilidade e adaptabilidade. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(7), 964-971. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000700013>.
- Sá, L. F., & Tambarussi, E. V. (2023). Melhoramento genético como estratégia de gestão da produtividade florestal. *Revista do Instituto Florestal*, 35(1), 99-112. <https://doi.org/10.24278/2178-5031.202335106>.
- Saldanha, C. W., Otoni, C. G., Rocha, D. I., Cavatte, P. C., Detmann, K. D. S. C., Tanaka, F. A. O., Dias, L. L. C., DaMatta, F. M., & Otoni, W. C. (2014). CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118(1), 87-99. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0464-x>.
- Trueman, S. J., Hung, C. D., & Wendling, I. (2018). Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. *Forests*, 9(2), 1-42. <https://doi.org/10.3390/f9020084>.
- Tuan, P. N., Meier-Dinkel, A., Höltnen, A. M., Wenzlitschke, I., & Winkelmann, T. (2016). Paving the way for large-scale micropropagation of *Juglans × intermedia* using genetically identified hybrid seed. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126(1), 153-166. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0986-5>.
- Vollmer, R., Espirilla, J., Espinoza, A., Villagaray, R., Castro, M., Pineda, S., Sánchez, J. C., Mello, A. F. S., & Azevedo, V. C. R. (2024). Effect of gas exchange rate, vessel type, planting density, and genotype on growth, photosynthetic activity, and ion uptake of *in vitro* potato plants. *Plants*, 13(19), e2830. PMID:39409700. <https://doi.org/10.3390/plants13192830>.
- Watt, M. P. (2014). Genotypic-unspecific protocols for the commercial micropropagation of *Eucalyptus grandis* × *nitens* and *E. grandis* × *urophylla*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(1), 125-133. <https://doi.org/10.3906/tar-1304-83>.
- Xavier, A., Wendling, I., & Silva, R. L. (2021). *Silvicultura clonal: princípios e técnicas* (3. ed.). Editora UFV.
- Xiao, Y., Niu, G., & Kozai, T. (2011). Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105(2), 149-158. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9863-9>.
- Zimmerman, R. H. (1995). Environmental effects and their control in plant tissue culture-Overview. *Acta Horticulturae*, (393), 11-14. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1995.393.1>.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

NAMP: concepção e desenho do estudo, desenvolvimento da metodologia, análise e interpretação dos dados, redação do manuscrito; WCO: concepção e desenho do estudo, revisão do manuscrito; AX: concepção e desenho do estudo, administração do projeto, revisão do manuscrito.