

DL 15.FEV2001*190857

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA

MESTRADO EM BIOLOGIA VEGETAL

**Estabelecimento de culturas *in vitro* e micropropagação da
espécie *Eucalyptus nitens* Maiden**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre
em Biologia Vegetal

Maria Filomena Figueiredo Nazaré Gomes

Orientador

Prof. Doutor Jorge Manuel Canhoto

Coimbra, 2000



RESUMO

No presente trabalho, pretendeu-se desenvolver uma metodologia para a micropropagação da espécie *Eucalyptus nitens* Maiden (semente e plantas com 1 ano de idade). A micropropagação de semente melhorada pode contribuir para o aumento da qualidade dos povoamentos destinados à indústria de pasta celulósica.

No estabelecimento de culturas *in vitro* de semente (Fase I), foram testados diferentes tratamentos de desinfecção. No estabelecimento de culturas *in vitro*, de plantas com 1 ano de idade, foram testadas duas metodologias. Utilizaram-se, como “explants” primários, ápices meristemáticos caulinares ou segmentos nodais. Na fase de multiplicação (Fase II), foram testadas diferentes formulações nutritivas. Na fase de enraizamento (Fase III), avaliou-se o efeito da auxina no meio de indução de rizogénese, em rebentos provenientes de sementes germinadas *in vitro* com 4, 8 e 10 semanas de idade, e em rebentos provenientes de culturas *in vitro*. Por último, procedeu-se à aclimatização (Fase IV) das plântulas micropropagadas.

No estabelecimento de culturas *in vitro* de semente, observaram-se taxas médias de germinação e infecção de, 94,3 e 1,3%, respectivamente. A cultura de ápices meristemáticos mostrou ser mais favorável ao estabelecimento e ulterior multiplicação de “explants”, provenientes de material vegetal com um ano de idade, com taxas médias de infecção e de “explants” reactivos de, 1,3 e 36,3%, respectivamente (em meio de cultura de De Fossard, com BAP e ANA a 0,2 e 0,01 mg.l⁻¹). Esta proporção de reguladores de crescimento, em meios de cultura de De Fossard e Murahige & Skoog (1/2), permitiu obter melhores taxas de multiplicação (1,86 e 2,25). As taxas médias de enraizamento, em “explants” mais jovens (4 e 8 semanas de idade/99,99 e 99,95%, respectivamente, em meio de Knop), foram superiores às observadas em microestacas com 10 semanas de idade (98,54%). Com AIB a 3 mg.l⁻¹, obteve-se a melhor percentagem média de enraizamento (43,90%), em microestacas provenientes de culturas de sementes germinadas *in vitro*. Na aclimatização, registou-se uma percentagem média de sobrevivência de 96,3%, ao fim de um período de quatro meses.

Os resultados indicam que as técnicas utilizadas permitem a micropropagação de semente melhorada da espécie *Eucalyptus nitens* Maiden, sendo, no entanto, ainda necessários estudos adicionais que permitam a micropropagação de material vegetal adulto.

Palavras chave: *Eucalyptus nitens* Maiden; micropropagação; multiplicação de gomos axilares.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	IX
ÍNDICE DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	X
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A FLORESTA E O EUCALIPTO.....	1
1.1.1 O género <i>Eucalyptus</i>	1
1.1.2 O enquadramento económico do género <i>Eucalyptus</i>	4
1.1.3 O eucalipto na economia nacional.....	8
1.1.4 Caracterização da espécie <i>Eucalyptus nitens</i> Maiden.....	15
1.1.5 Objectivos do trabalho.....	20
2 A MICROPROPAGAÇÃO E O MELHORAMENTO FLORESTAL DO EUCALIPTO.....	22
2.1 A MULTIPLICAÇÃO DE ESPÉCIES LENHOSAS POR MICROPROPAGAÇÃO.....	22
2.1.1 A micropropagação e o melhoramento florestal.....	35
2.1.2 A micropropagação do eucalipto.....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	49
3.1.1 Origem e caracterização do material vegetal.....	49
3.1.2 Preparação dos "explants" para as diferentes fases de micropropagação.....	49
3.1.3 Métodos de desinfeção.....	52
3.1.3.1 Métodos de desinfeção das sementes.....	52
3.1.3.2 Métodos de desinfeção de "explants" provenientes de plantas em estufa, com um ano de idade.....	53
3.2 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTURA PARA AS FASES DESENVOLVIDAS <i>IN VITRO</i>	54
3.2.1 Fase de estabelecimento (Fase I).....	55
3.2.1.1 Estabelecimento de culturas <i>in vitro</i> de semente.....	56
3.2.1.2 Estabelecimento de culturas <i>in vitro</i> de "explants" provenientes de plantas em estufa, com um ano de idade.....	56
3.2.2 Fase de multiplicação (Fase II).....	57
3.2.2.1 Multiplicação de culturas <i>in vitro</i> de semente.....	57
3.2.2.2 Multiplicação de culturas <i>in vitro</i> de "explants" provenientes de plantas em estufa, com um ano de idade.....	57
3.2.3 Fase de enraizamento (Fase III).....	58
3.2.3.1 Enraizamento de microestacas provenientes de sementes germinadas <i>in vitro</i>	58
3.2.3.2 Enraizamento de microestacas provenientes de culturas de sementes germinadas <i>in vitro</i>	59
3.2.3.3 Enraizamento de microestacas provenientes de culturas de ápices meristemáticos.....	59
3.3 FASE DE ACLIMATIZAÇÃO (FASE IV).....	60
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL, RECOLHA E ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	62
3.4.1 Fase de estabelecimento (Fase I).....	62
3.4.1.1 Estabelecimento de culturas <i>in vitro</i> de semente.....	62
3.4.1.2 Estabelecimento de culturas <i>in vitro</i> de "explants" provenientes de plantas em estufa, com um ano de idade.....	62
3.4.2 Fase de multiplicação (Fase II).....	63
3.4.2.1 Multiplicação de culturas <i>in vitro</i> de semente.....	63
3.4.2.2 Multiplicação de culturas <i>in vitro</i> de "explants" provenientes de plantas em estufa, com um ano de idade.....	63
3.4.3 Fase de enraizamento (Fase III).....	64
3.4.3.1 Enraizamento de microestacas provenientes de sementes germinadas <i>in vitro</i>	64
3.4.3.2 Enraizamento de microestacas provenientes de culturas de sementes germinadas <i>in vitro</i>	64
3.4.3.3 Enraizamento de microestacas provenientes de culturas de ápices meristemáticos.....	65
3.4.4 Fase de aclimatização (Fase IV).....	65
3.4.5 Análise estatística dos resultados.....	65
4 RESULTADOS.....	67
4.1 FASE DE ESTABELECIMENTO (FASE I).....	67
4.1.1 Estabelecimento de culturas <i>in vitro</i> de semente.....	67

4.1.2	<i>Estabelecimento de culturas in vitro de "explants" provenientes de plantas em estufa, com um ano de idade</i>	67
4.2	FASE DE MULTIPLICAÇÃO (FASE II)	69
4.2.1	<i>Multiplicação de culturas in vitro de semente</i>	69
4.2.2	<i>Multiplicação de culturas in vitro de "explants" provenientes de plantas em estufa, com um ano de idade</i>	69
4.3	FASE DE ENRAIZAMENTO (FASE III)	71
4.3.1	<i>Enraizamento de microestacas provenientes de sementes germinadas in vitro</i>	71
4.3.2	<i>Enraizamento de microestacas provenientes de culturas de sementes germinadas in vitro</i>	73
4.3.3	<i>Enraizamento de microestacas provenientes de culturas de ápices meristemáticos</i>	75
4.4	FASE DE ACLIMATIZAÇÃO (FASE IV)	75
5	DISCUSSÃO	78
5.1	FASE DE ESTABELECIMENTO (FASE I)	78
5.1.1	<i>Estabelecimento de culturas in vitro de semente</i>	78
5.1.2	<i>Estabelecimento de culturas in vitro de "explants" provenientes de plantas em estufa, com um ano de idade</i>	79
5.2	FASE DE MULTIPLICAÇÃO (FASE II)	81
5.2.1	<i>Multiplicação de culturas in vitro de semente</i>	82
5.2.2	<i>Multiplicação de culturas in vitro de "explants" provenientes de plantas em estufa, com um ano de idade</i>	83
5.3	FASE DE ENRAIZAMENTO (FASE III)	84
5.3.1	<i>Enraizamento de microestacas provenientes de sementes germinadas in vitro</i>	84
5.3.2	<i>Enraizamento de microestacas provenientes de culturas de sementes germinadas in vitro</i>	85
5.3.3	<i>Enraizamento de microestacas provenientes de culturas de ápices meristemáticos</i>	90
5.4	FASE DE ACLIMATIZAÇÃO (FASE IV)	93
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
7	BIBLIOGRAFIA	98
8	ANEXOS	111

7 BIBLIOGRAFIA

- ADAM, S., 1989. *Étude de la sensibilité d'Eucalyptus gunnii à Agrobacterium rhizogenes et Agrobacterium Tumefaciens*. These de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie. 157 pp.
- ALMEIDA, M.H., 1993. *Estudo da Variabilidade Geográfica em Eucalyptus globulus Labill.* Tese de doutoramento, I.S.A., Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 196 pp.
- ARNOLD, S., EGERTSDOTTER, U., EKBERG, I., GUPTA, P.K., NØRGAARD, J., 1995. Somatic Embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*). In *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, JAIN, S.M., GUPTA, P.K., NEWTON, R.J., ed., Kluwer Academic Publishers, pp. 17-36.
- BADIA, N.K., 1982. *Eucalyptus rudis* Endl.: Techniques de micropropagation par la culture de noeuds *in vitro*. In *Colloque international sur la culture in vitro des essences forestières*, IUFRO, AFOCEL, Nangis, pp. 135-142.
- BAJAJ, 1991. Automated micropropagation for en masse production of plants. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech and Micropropagation I*. Bajaj, ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 3-16.
- BARLASS, M., SKENE, K.G.M., 1978. *In vitro* propagation of grape vine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis* 17: 335-340.
- BEADLE, C., 1998. Sustainable management. In *CRC, Annual Report 97/98*. Austrália, pp. 28.
- BEKKAOUI, F., FRANCKET, A., WALKER, N., 1985. Culture *in vitro* de méristèmes de douglas âgé et juvénile. *Annales de Recherches Sylvicoles*. AFOCEL, 1984: 45-73.
- BENNETT, I.J., MCCOMB, J.A., TONKIN, C.M., MCDAVID, D.A.J., 1992. Effect of cytokinins on multiplication and rooting of *Eucalyptus globulus* and other *Eucalyptus* species. In *Mass Production Technology for Genetically Improved Fast Growing Forest Tree Species*. AFOCEL, IUFRO, Symposium Bordeaux, Tome II, pp. 195-202.

- BENNETT, I.J., MCCOMB, J.A., MCDAVID, D.A.J., 1994. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. *Annals Bot.* **74**: 53-58.
- BONGA, J.M., 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity, and rejuvenation. In: *Tissue Culture In Forestry*, J.M. Bonga and D.J. Durzan, eds., Martinus Nijhoff / Dr W. Junk Publishers, pp.387-412.
- BOULAY, M., 1983. Micropropagation of frost resistant *Eucalyptus*. In *Proceeding of a workshop on Eucalyptus*, For. Serv. General Technical Report, USDA, California, pp. 102-107.
- BOULAY, M., 1985. Aspects pratiques de la multiplication *in vitro* des essences forestières. *Annales de Recherches Sylvicoles*. AFOCEL, **1984**: 7-44.
- BOURIQUET, R., TSOGAS, M., BLASELLE, A., 1985. Essais de rajeunissement de l'épicéa par les cytokinines. *Annales de Recherches Sylvicoles*. AFOCEL, **1984**: 173-186.
- BROOKER, M.I.H., KLEINIG, D.A., 1983. *Field guide to Eucalypts. Volume 1, South-eastern Australia*. Inkata Press Proprietary Limited Melbourne and Sydney, 288 pp.
- BYRNE, M., MORAN, G., 1994. *Breakthrough in genetic mapping*. Onwood 5 - winter 1994, Research updates from CSIRO Divisions of Forestry and Forest Products, htm, 2pp.
- CANHOTO, J.M., LOPES, M.L., CRUZ, G.S., 1999. Somatic Embryogenesis in Myrtaceous Plants. In *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol. 4, JAIN, S.M., GUPTA, P.K., NEWTON, R.J., ed., Kluwer Academic Publishers, pp. 293-340.
- CAROCHA, V., MARQUES, C., FERREIRA, J.G., 1996. Aplicação de metodologia de RAPD no programa de melhoramento genético do RAIZ. In *Tecnicelpa XV Congresso Nacional*. Aveiro, pp.162-163.
- CHAUSSAT, R., COURDUROUX, J.C., 1980. Régulateurs de croissance et multiplication végétative. In *La multiplication végétative des plantes supérieures*. R. Chaussat, C. Bigot, eds., Gauthiers-Villars, pp. 31-50.
- CHIPPENDALE, G.M. 1976. *Eucalyptus* nomenclature. *Austr. For. Res.* **7**: 69-107.

- CHRIQUI, D., ADAMS, S., CAISSARD, J.C., NOIN, M., AZMI, A., 1991. Shoot regeneration and *Agrobacterium* mediated transformation of *Eucalyptus globulus* and *gunnii*. In *Symposium on Intensive Forestry, The Role of Eucalypts*. IUFRO, Durban, pp. 70-79.
- CORNU, BOULAY, 1986. La multiplication végétative: techniques horticoles et culture *in vitro*. In: *Amélioration génétique des arbres forestiers*. R.F.F., M.Agri., pp. 60-68.
- CRESSWELL, R.J., DE FOSSARD, R.A., 1974. Organ culture of *Eucalyptus grandis*. *Australian Forestry* **37**: 55-69.
- DAVIES, P.J., 1995. The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In *Plant Hormones*. P.J. DAVIES (ed.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 1-12.
- DEBERGH, P., MAENE, L., 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Science Hort.*, **14**: 335-345.
- DEBERGH, P., MAENE, L., CAPELLADES, M., 1986. Problemas actuales que influyen en la producción de plantas *in vitro*. *ITEA* **65**: 3-6.
- De FOSSARD, R.A., 1974. Tissue Culture of *Eucalyptus*. *Australian Forestry* **37**: 43-54.
- De FOSSARD, R.A., NITSCH, C., CRESSWELL, R.J., LEE, H.C.M., 1974. Tissue and organ culture of *Eucalyptus*. *NZ. J. FOR. SCI.* **4**: 267-278.
- De FOSSARD, R., 1978. Tissue culture propagation of *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. In *Proceedings of Symp. on plant tissue culture*, Peking, 425-438.
- De LITTLE, D.W., TIBBITS, W.N., RASMUSSEN, G.F., RAVENWOOD, I.C., 1992. Genetic improvement strategy for APPM eucalypt tree farms in Tasmania. In: *Mass production technology for genetically improved fast growing forest tree species*. T. I, AFOCEL, IUFRO, Bordeaux, pp. 275-282.
- DENISON, N.P., KIETZKA, J.E., 1993. The development and utilisation of vegetative propagation in Mondi for commercial afforestation programmes. *South African Forestry Journal* **166**: 53-60.

- DESTREMAU, D.X., 1980. Quelques généralités sur les *Eucalyptus*. AFOCEL, ARMEF, *Informations Forêt* 144: 23-30.
- DIRECÇÃO GERAL DAS FLORESTAS, 1991. *Perfil Florestal - Portugal*. Divisão de Estudos. DGF, 42 pp.
- DIRECÇÃO GERAL DAS FLORESTAS, 1992. *Inventário Florestal do Eucalipto. Protocolo de Cooperação DGF/ACEL*. DGF, 15 pp.
- DGF.pt, 2000. info@dgf.min-agricultura.pt
- DONALD, D.G.M., 1980. The production of cineole from *Eucalyptus*: a preliminary report. *South African Forestry J.* 114: 64-67.
- DUHOUX, E., 1988. Organogénese et multiplication végétative chez les arbres. In: *Cultures de cellules, tissus et organes végétaux*. Jean-Pierre Zryd, ed., P. Polyt. R., pp.59-67.
- DURAND-CRESSWELL, R.J., NITSCH, 1977. Factors influencing the regeneration of *Eucalyptus grandis* by organ culture. *Acta Hort.* 78: 149-155.
- DURAND-CRESSWELL, R.J., BOUDET, A.M., 1979. Le bouturage *in vitro* de l'*Eucalyptus*. *Etudes et Recherches, AFOCEL* 12: 57-66.
- DURAND-CRESSWELL, R., BOULAY, M., FRANCKET, A., 1982. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: *Tissue Culture In Forestry*, J.M. Bonga and D.J. Durzan, eds., Martinus Nijhoff / Dr W. Junk Publishers, pp. 150-181.
- ELDRIDGE, K. G., DAVIDSON, J., HARWOOD, C., VAN WYK, G., 1993. *Eucalypt Domestication and Breeding*. Clarendon Press, Oxford Univ., 288 pp.
- ESMERALDO, M.V., CARVALHEIRA, S.B., BRASIL, A., FIGUEIREDO, S., BARRUETO, C., BRASILEIRO, A., 1997. Analysis of different parameters affecting *Agrobacterium* mediated transformation of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. In *IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts, V 2*, Salvador, Brasil, pp. 19-23.



- F.A.O., 1979. *Eucalypts for planting*. FAO, Forestry Series 11. Rome, 677 pp.
- FAVRE, J.M., 1980. Rhizogenèse et bouturage. In *La multiplication végétative des plantes supérieures*. R. Chaussat, C. Bigot, eds., Gauthiers-Villars, pp. 51-75.
- FLORENCE, R.G., 1981. The biology of the eucalypt forest. In *The biology of Australian Plants*, Univ. W. Aust. Press, Nedlands, pp. 147-180.
- FOURET, Y., ARNOUD, Y., LARRIEU, C., 1985. Rajeunissement *in vitro* du *Sequoia sempervirens*. *Annales de Recherches Sylvicoles*. AFOCEL, 1984: 111-138.
- FRANCLLET, A., 1979. Rajeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation végétative. In *Micropropagation d'arbres forestiers, Etudes et Recher.*, 12, AFOCEL, pp. 3-18.
- FRANCLLET, A., DAVID, A., DAVID, H., BOULAY, M., 1980. Première mise en évidence morphologique d'un rajeunissement de méristèmes primaires caulinares de Pin maritime âgé (*Pinus pinaster* Sol.). *C. R. Acad. Sci. Paris*. 290: 927-930.
- FRANCLLET, A., BOULAY, M., 1982. Micropropagation of frost resistant eucalypt clones. *Austr. For. Res.* 13: 83-89.
- FRANCLLET, A., BOULAY, M., BEKKAOUI, F., FOURET, Y., VERSCHOORE-MARTOUZET, B., WALKER, N., 1987. Rejuvenation. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Bonga, Durzan (eds), Nijhoff, Dordrecht, pp. 232-248.
- FRANCLLET, A., BOULAY, M., 1989. Rejuvenation and clonal silviculture for *Eucalyptus* and forest species harvested through short rotation. In *Biomass Production by Fast Growing Trees*, J.S. Pereira, J.J. Landsberg, eds., Kluwer Academic Publish., pp. 267-274.
- FRANCO, J.M., 1971. *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*. Vol. I, *Lycopodiaceae - Umbelliferae*, Franco (ed), Lisboa, 648 pp.
- FURZE, M.J., CRESSWELL, C.F., 1985. Micropropagation of *Eucalyptus grandis* and *nitens* using tissue culture techniques. *South African Forestry Journal*, December: 20-23.

- GASPAR, T., SMITH, D., THORPE, T., 1977. Arguments supplémentaires en faveur d'une variation inverse du niveau auxinique endogène au cours des deux premières phases de la rhizogénèse. *C. R. Acad. Sci. Paris*. **285**: 327-330.
- GASPAR, T., COUMANS, M., 1987. Root formation. In *Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol. 2, Specific Principles and Methods: Growth and Developments*. , J.M. Bonga and D.J. Durzan, eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 202-217.
- GASPAR, T., 1988. Multiplication végétative des plantes supérieures par culture *in vitro*. In: *Cultures de cellules, tissus et organes végétaux*. Jean-Pierre Zryd, ed., P. Polyt. R., pp. 31-50.
- GASPAR, T., 1988. Aspect physiologique de l'organogénèse *in vitro*. In *Cultures de cellules, tissus et organes végétaux*. Jean-Pierre Zryd, ed., P. Polytech. Romandes, pp. 69-87.
- GAUTHERET, R.J., 1959. *La culture des tissus végétaux, techniques et réalisations*. Masson ed., Paris, 863 pp.
- GAZEAU, C.M., DERREUDRE, J., 1988. La culture des méristèmes. In *Cultures de cellules, tissus et organes végétaux*. Jean-Pierre Zryd, ed., P. Polytech. Romandes, pp. 13-30.
- GENTILLI, J., 1961. The resistance of eucalypts to low temperatures in the growing season. In *Rep. 2nd World Eucalypt Conf.*, São Paulo, Brazil, Vol. 1, pp. 495-504.
- GOES, E., 1985. *Os eucaliptos, identificação e monografia de 121 espécies existentes em Portugal*. Portucel, Lisboa, 372 pp.
- GOMES, F., PÂQUES, M., 1990. Micropropagation of *Eucalyptus globulus*. In: *V Congresso Nacional de Biotecnologia*. Universidade do Minho, Braga, BV 22.
- GOMES, F., COUCELO, F., 1994. Micropropagation of *Eucalyptus globulus*. In: *Eucalyptus for Biomass Production*. J. S. Pereira & H. Pereira. ISA, Lisboa, pp. 171-173.

GONÇALVES, J.C.D., 1991. *Influência de alguns factores na micropropagação de castanheiro (Castanea Miller)*. Tese de Mestrado, Universidad. Técnica de Lisboa, ISA, 96 pp.

GRATTAPAGLIA D., 1998. *Eucalypts catch up with the genome research wave*. Dendrome forest tree genome research. Updates, T.C., Vol1, Nº1, Forest Biotechnology Group, North Carolina State University. htm, 5 pp.

GUIMARÃES, M.P., CORREIA, C., COUCELO, F., 1997. Integração de um laboratório de micropropagação de *Eucalyptus globulus* no viveiro de uma empresa do sector papelero Português. In *IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts, V 2*, Salvador, Brasil, pp. 79.

GUPTA, P.K., NADGIR, A.L., MASCARENHAS, A.F., JAGANNATHAN, V., 1980. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (Teack) by tissue culture. *Plant Sci. Lett.* **17**: 259-268.

GUPTA, P.K., MASCARENHAS, A.F., JAGANNATHAN, V., 1981. Tissue culture of forest tree: Clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook by tissue culture. *Plant Sc. Lett.* **20**: 195-201.

GUPTA, P.K., MEHTA, U.J., MASCARENHAS, A.F., 1983. A tissue culture method for rapid clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus torelliana* and *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Rep.* **2**: 296-299.

GUPTA, P.K., MASCARENHAS, A.F., 1987. *Eucalyptus*. In *Cell and Tissue Culture in Forestry, Volume 3*, J.M. Bonga and Durzan (eds), Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp. 385-399.

GUPTA, P. K., TIMMIS, R., TIMMIS, K. A., CARLSON, W. C., WELTY, E. D. E., 1995. Somatic Embryogenesis in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). In *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, JAIN, S. M., GUPTA, P. K., NEWTON, R. J., ed., Kluwer Academic Publishers, pp. 303-313.

- HARTNEY, V.J., BARKER, P.K., 1980. Vegetative propagation of *Eucalyptus* by tissue culture. In Symp. and Workshop on genetic improvement and production of fast growing tree species. IUFRO, S.Paulo,Brazil, pp. 791-793.
- HARTNEY, V.J., 1982. Vegetative propagation of *Eucalyptus in vitro*. In *Colloque international sur la culture in vitro des essences forestières*, IUFRO, AFOCEL, Nangis, pp. 175-179.
- HARTNEY, V.J., BARKER, P.K., 1983. The vegetative propagation of eucalypts by tissue culture. *Silviculture* 8: 791-792.
- IAPTC, 1985. Usage of vertebrate, invertebrate and plant cell, tissue and organ culture terminology. *Newsletter*, 45: 15-22.
- IKEMORI, Y.K., 1987. Epicormic shoots from the branches of *Eucalyptus grandis* as an explant source for *in vitro* culture. *Comm. For. Rev.* 66: 351-355.
- INSTITUTO FLORESTAL, 1994. *Anuário 94*. Instituto Florestal, 110 pp.
- INSTITUTO FLORESTAL, 1995. *Anuário 95*. Instituto Florestal, 106 pp.
- KOZAI, T., 1991. Acclimatization of micropropagated plants. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech and Micropropagation I*. Bajaj, ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.127-141.
- KUZMINSKY, E., LUBRANO, L., 1991. Impiego di cloni micropropagati di *Eucalyptus globulus* e di *Eucalyptus dalrympleana* per studi sulla resistenza al freddo. *Monti e Boschi* 42 (5): 51-53.
- LE ROUX, J.J., VAN STADEN, J., 1991. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* - a review. *Tree Physiology* 9: 435-477.
- MACRAE, S., COTTERILL, P., 1997. Macropropagation and micropropagation of *Eucalyptus globulus*: Means of capturing genetic gain. In *IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts, V 2*, Brasil, pp. 102-110.

- MACRAE, S., VAN STADEN, J., 1993. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation to improve rooting ability of eucalypts. *Tree Physiology* 12: 411-418.
- MAENE, L., DEBERGH, P., 1986. Optimization of plant micropropagation. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 51 (4): 1479-1488.
- MARGARA, J., 1980. La culture de méristèmes et d'apex de tige. In *La multiplication végétative des plantes supérieures*. R. Chaussat, C. Bigot, eds., Gauthiers-Villars, pp. 115-131.
- MARGARA, J., 1989. *Bases de la Multiplication Végétative, les méristèmes et l'organogénèse*. Inst. Nat. de la Recherche Agronomique, INRA, 262 pp.
- MARTIN, D., 1948. *Eucalyptus* in the British Isles. *Australian Forestry* 12: 67-74.
- MCCOMB, J. A., BENNETT, I. J., 1982. Vegetative propagation of *Eucalyptus* using tissue culture and its application to forest improvement in Western Australia. In *Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, Fujiwara A (ed), Japan, pp. 721-722.
- MCCOMB, J. A., BENNETT, I. J., 1986. Eucalypts (*Eucalyptus* spp.). In: *Trees I. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 1*. Y.P.S. Bajaj, ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 340-362.
- MCCOMB, J. A., 1995. Clonal propagation of eucalypts. *Plant Tissue Culture Manual C* 8: 1-24.
- MCCOMB, J. A., BENNETT, I. J., TONKIN, C., 1996. *In vitro* propagation of *Eucalyptus* species. In: *Tissue Culture of Australian Plants*. University of New England Print., pp. 112-156
- MCCOWN, B.H., LOYD, G., 1981. Woody Plant Medium. A mineral nutrient formula for microculture of woody plant species. *Hort Science* 16: 453.
- MCCOWN, B.H., SELLMER, J.C., 1987. General media and vessels suitable for woody plant culture. In *Cell and tissue culture in forestry, Vol. 1, General Principles and Biotechnology*, J.M. Bonga, D.J., Durzan, eds., Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 4-16.

- MEYNIER, V., 1985. Contribution de la culture de méristèmes à la micropropagation *in vitro* du noyer. *Annales de Recherches Sylvicoles*. AFOCEL 1984: 75-86.
- MONCOUSIN, C., GASPAR, T., 1983. Peroxidase as a marker for rooting improvement of *Cynara scolymus* L. cultured *in vitro*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 178: 263-271.
- MONCOUSIN, C., 1991. Rooting of *in vitro* cuttings. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech and Micropropagation I*. Bajaj, ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.231-261.
- MONOD, V., POISSONNIER, M., DEREUDRE, J., PÂQUES, M., 1992. Successful cryopreservation of *Eucalyptus gunnii* shoot-tips in liquid nitrogen. In: *Mass production technology for genetically improved fast growing forest tree species*. T. I, AFOCEL, IUFRO, Bordeaux, pp. 133-145.
- MORAN, G., 1998. Molecular approaches to tree improvement. In *CRC, Annual Report 97/98*. Austrálie, pp. 23.
- MULLINS, M.G., NAIR, Y., SAMPET, P., 1979. Rejuvenation *in vitro*: induction of juvenile characters in an adult clone of *Vitis vinifera* L. *Ann. Bot.* 44: 623-627.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plantarum*. 15: 473-497.
- NOZERAN, R., 1980. La multiplication végétative chez les végétaux supérieurs. In *La multiplication végétative des plantes supérieures*. R. Chaussat, C. Bigot, eds., Gauthiers-Villars, pp. 1-29.
- NUGENT, G., CHANDLER, S.F., WHITEMAN, P., STEVENSON, T.W., 1997. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus* Labill. In *IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts, V 2*, Brasil, pp. 183-185.
- ORME, R.K., 1983. Vegetative Propagation of Tasmanian Eucalypts. In *Colloque International Sur Les Eucalyptus Résistants au Froid*, IUFRO, CSIRO, AFOCEL, Bordeaux, pp. 559-569.

- ORME, R.K., BANHAM, P.W., ALLISON, K., RUSSELL, S. 1993. Cold caustic soda pulps from young plantation *Eucalyptus nitens* and *globulus*. *Appita* 46 (2): 119-122.
- OSÓRIO, J., PEREIRA, J.S., 1994. Genotypic differences in water use efficiency and ^{13}C discrimination in *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology* 14: 871-882.
- PÁSCOA, F., TAVARES, J.S., OLIVEIRA, J., 1994. *Estudo Comparado Sobre a Economia da Produção Florestal - Portugal. Quadro Económico do Sector Florestal*. Programa Compostela Floresta. Escola Superior Agrária de Coimbra, 114 pp.
- PIERIK, R.L.M., 1987. *In vitro culture of higher plants*. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, Netherlands, 344 pp.
- POISSONIER, M., DUMANT, M.J., FRANCKET, A., 1984. Acclimatation de clones d'*Eucalyptus* multipliés *in vitro*. *Annales de Recherches Sylvicoles*. AFOCEL, 1983: 54-83.
- PRYOR, L.D., JOHNSON, L.A.S., 1975. *A classification of the Eucalypts*. Canberra, Australian National University, 102 pp.
- PRYOR, L.D., 1976. *The biology of Eucalypts*. Edward Arnold Ltd, London, Studies in Biology n° 61, 82 pp.
- PRYOR, L.D., 1983. Eucalypts in prospect. In *Colloque International Sur Les Eucalyptus Résistants au Froid*, IUFRO, CSIRO, AFOCEL, Bordeaux, pp. 35-39.
- QUOIRIN, M., LEPOIVRE, P., 1977. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus sp.* *Acta Hort.* 78: 437-442.
- QUOIRIN, M., LEPOIVRE, P., BOXUS, P., 1977. Un premier bilan de dix années de recherche sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. *Comptes Rendus Rech.*, Gembloux, Belgique.
- RUAUD, J.N., CHURCHILL, K., PEPPER, S., ALTMAN, A., (1997). Somatic embryogenesis initiation in *Eucalyptus nitens*. In *Proceedings of the third international ISHS Symposium on in vitro culture and horticultural breeding*, Jerusalem, Israel. *Acta-Horticulturae*, 1997, 447: 185-186.

- RYAN, P., 1997. *Developing tools for sustainable forest management*. Onwood 17 - winter 1997. Research updates from CSIRO Divisions of Forestry and Forest Products, htm, 2 pp.
- SALINERO, M.C., 1983. Advances in micropropagation of *Eucalyptus globulus* by *in vitro* nodal culture. In *Colloque International sur les Eucalyptus Résistants au Froid*, IUFRO, CSIRO, AFOCEL, Bordeaux, pp. 609-618.
- SOKAL, R.R., ROHLF, F.J., 1969. *Biometry*. W. H. Freeman and Company. San Francisco. 776pp.
- SOUSA, E.M.R., FERREIRA, L.J.C., 1996. *Gonipterus scutellatus* Gyll., uma nova praga do eucalipto em Portugal. *Revista Florestal* 4 (vol IX): 4-7.
- STEEL, R.G., TORRIE, J.H., 1981. *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*. 2th ed. McGraw-Hill International Book Company. Singapore. 633pp.
- TRINDADE, H., FERREIRA, J.G., PAIS, M.S., ALONI, R., 1990. The role of cytokinin and auxin in rapid multiplication of shoots of *Eucalyptus globulus* grown *in vitro*. *Australian Forestry* 53: 221-223.
- TRINDADE, H., MARQUES, C.M., 1994. Main constraints in the tissue culture method for rapid clonal propagation of mature *Eucalyptus* trees. In *Eucalyptus for Biomass Production*. J. S. Pereira & H. Pereira. ISA, Lisboa, pp.174-180.
- TULECKE W., 1987. Somatic Embryogenesis in Woody Perennials. In *Cell and Tissue Culture in Forestry*, BONGA, J. M., DURZAN, D. J., ed., Martinus Nijhoff Publishers, pp. 61-91.
- TURNBULL, J.W., ELDRIDGE, K.G., 1983. The natural environment of *Eucalyptus* as the basis for selecting frost resistant species. In *Colloque International Sur Les Eucalyptus Résistants au Froid*, IUFRO, CSIRO, AFOCEL, Bordeaux, pp. 43- 62.
- VOLKER, P.W., RAYMOND, C.A., 1989. Potencial for breeding eucalypts in Tasmânia. *Appita* 42: 198-200.

- VOLKER, P.W., OWEN, J.V., BORRALHO, N.M.G., 1994. Genetic variances and covariances for frost tolerance in *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. *Silvae Genetica* 43: 366-372.
- WALKER, N., DUMAS, E., FRANCKET, A., BEKKAOUI, F., 1985. Technique de culture *in vitro* des méristèmes de *Sequoia sempervirens* et *Pinus pinaster*. *Annales de Recherches Sylvicoles*. AFOCEL, 1984: 87-109.
- WANG, P.J., CHARLES, A., 1991. Micropropagation through meristem culture. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech and Micropropagation I*. Bajaj, ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 32-52.
- WATT, M.P., BLAKEWAY, F.C., TERMIGNONI, F.C., JAIN, S.M., 1999. Somatic Embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus dunnii*. In *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, vol. 5, JAIN, S.M., GUPTA, P.K., NEWTON, R.J., ed., Kluwer Academic Publishers, pp. 63-78.
- WHITE, P. R., 1943. *A Handbook of Plant Tissue Culture*. Jacques Catell Press, Lancaster, 277 pp.
- WILLYAMS, D., WHITEMAN, P., CAMERON, J., CHANDLER, S.F., 1992. Inter- and intra-family variability for rooting capacity in micropropagated *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*. In *Mass Production Technology for Genetically Improved Fast Growing Forest Tree Species*. AFOCEL, IUFRO, Symposium Bordeaux, Tome II, pp. 177-181.
- WRIGHT, J.W., 1976. *Introduction to Forest Genetics*. Acade. Press, Inc., California, 463 pp.
- XAVIER, A., COMÉRCIO, J., IANNELLI, C.M., 1997. Eficiência da estaquia, da microestaquia e da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* spp.. In *IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalypts*, V 2, Salvador, Brasil, pp. 40-45.
- ZOBEL, B., TALBERT, J., 1984. *Applied Forest Tree Improvement*. John Wiley and Sons. New York. USA, 505 pp.