

AVALIAÇÃO DE CLONES DE EUCALIPTO PARA RESISTÊNCIA À FERRUGEM EM CONDIÇÕES DE MICROPROPAGAÇÃO¹

Reginaldo Gonçalves Mafia², Helen Pacheco Marchesi² e Cristina Pierroti Aun³

RESUMO – A ferrugem, causada pelo fungo *Puccinia psidii*, é uma das doenças mais frequentes nos plantios de eucalipto no Brasil. Atualmente, o plantio de clones resistentes constitui a principal estratégia para o controle da doença no campo. Para selecionar clones resistentes, é fundamental inocular e avaliar a resposta fenotípica de diferentes materiais genéticos, o que demanda tempo e recursos. Para facilitar e acelerar essa etapa do programa de melhoramento genético, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência em paralelo à etapa de multiplicação dos clones de eucalipto pela técnica de micropropagação. Para isso, seis clones foram multiplicados em meio MS, modificado nas fases de multiplicação, alongamento e enraizamento. Após 60 dias de incubação, os explantes foram inoculados com suspensão de esporos do patógeno ajustada para 2×10^4 urediniosporos mL^{-1} . Os explantes foram incubados a 24 ± 2 °C, fotoperíodo de 14 h de luz com intensidade de $20 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. Após 7, 11 e 14 dias da inoculação, avaliou-se a incidência da doença. Observou-se que as reações dos genótipos avaliados em condições de micropropagação foram altamente correlacionadas com os fenótipos determinados pelo procedimento-padrão de inoculação. Assim, o uso desse protocolo permite avaliar grande número de genótipos, com maior rapidez e precisão.

Palavras-chave: *Puccinia psidii*, Resistência, Melhoramento genético, Indexação e Controle de doenças.

EVALUATING RESISTANCE OF EUCALYPTUS CLONES TO RUST IN MICROPROPAGATIONS CONDITIONS

ABSTRACT – The rust, caused by the fungi *Puccinia psidii*, is one of the most frequent diseases on eucalyptus forests in Brazil. Currently, the use of resistant eucalyptus clones is the most important strategy to control this disease on the field. In order to select a resistant clone is essential to inoculated and to evaluate the phenotypic of various genetic materials. This procedure is time and resource consuming. To improve this step of the breeding program, the present work aimed at evaluating the resistance during the micro propagation of eucalyptus clones. Therefore, six clones were micro propagated on MS medium adjusted to promote the multiplication, growing and rooting. After 60 days of incubation, the explants were inoculated with the pathogen spores adjusting to 2×10^4 urediniospores mL^{-1} . The explants were incubated at 24 ± 2 °C, with light photoperiod of 14 h under intensity of $20 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$. After 7, 11, and 14 days of incubation, the disease incidence was evaluated. It was found a high correlation between the results obtained with the protocol developed in this work and the results of the standard rust inoculation proceeding. It was possible to conclude that this new proceeding allows fast and precise evaluation of several eucalyptus clones at the same time.

Keywords: *Puccinia psidii*, Resistance, Genetic breeding, Indexing and Disease control.

¹ Recebido em 07.06.2010 aceito para publicação em 04.06.2012.

² Fibria Celulose S.A. Centro de Tecnologia. Rod. Aracruz, ES. Brasil. E-mail: <rgoncalves@fibria.com.br> e <hpacheco@fibria.com.br>.

³ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Viçosa, MG. E-mail: <crisrina.aun@gerdau.com.br>.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, os plantios de eucalipto são afetados por inúmeras doenças, causadas por fungos e bactérias, além de problemas abióticos resultantes do manejo e, ou, do ambiente inadequado. Entre as doenças limitantes ao pleno desenvolvimento da cultura, destaca-se a ferrugem do eucalipto, causada pelo fungo *Puccinia psidii* Winter. Em razão dos danos e do impacto ambiental potencial, o risco de disseminação deste patógeno a partir do seu centro de origem, que engloba as Américas do Sul e Central, tem causado também grandes preocupações em outras partes do mundo (GLEN et al., 2007; CARNEGIE; LIDBETTER, 2012; LANA et al., 2012).

A ferrugem do eucalipto ocorre durante a produção de mudas, em jardins e minijardins clonais, em plantios jovens e em brotações após o corte raso (ALFENAS et al., 2009). Os sintomas e os danos variam de acordo com o nível de suscetibilidade do genótipo. Em plantas altamente suscetíveis, o patógeno causa deformações, necroses, hipertrofia, minicancros e morte das porções terminais, podendo afetar o crescimento. Entretanto, em plantas medianamente resistentes se observa a ocorrência de pústulas do patógeno sobre o tecido foliar. Em plantas resistentes, o patógeno pode induzir reação de hipersensibilidade, expressa como “fleck” ou como lesão necrótica, geralmente sem esporulação (JUNGHANS et al., 2003).

O controle da ferrugem do eucalipto pode ser realizado por meio da aplicação de fungicidas, principalmente os sistêmicos, escape pela época de colheita de materiais suscetíveis e por meio do plantio de material resistente (COUTINHO et al., 1998). Todavia, a utilização da resistência genética é o método de controle mais efetivo (ALFENAS et al., 2009; CARVALHO et al., 1998; XAVIER et al., 2007), além de apresentar menor custo e impacto para o ambiente, contribuindo para a redução do uso de fungicidas.

Atualmente, dentro do contexto da maioria dos programas de melhoramento genético, após selecionar indivíduos de alto desempenho produtivo e tecnológico, considerando as exigências industriais, os clones de eucalipto são avaliados quanto à resistência a doenças. Nesta etapa, diferentes patógenos são inoculados em condições controladas, com o objetivo de determinar a reação fenotípica e selecionar clones, preferencialmente, com resistência múltipla às diferentes doenças limitantes ao pleno desenvolvimento da cultura (ASSIS; MAFIA, 2007).

Para avaliar a resistência de plantas, é necessário estabelecer métodos simples, rápidos e precisos para reprodução e quantificação das doenças (ALFENAS; MAFIA, 2007). De acordo com a metodologia atualmente utilizada, desde a fase de produção de mudas até a inoculação são gastos aproximadamente seis meses. Essa demanda de tempo tem reduzido os ganhos advindos da substituição de materiais genéticos por clones mais produtivos. Em razão disso e da necessidade de redução de custos, estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver novas metodologias e estratégias de seleção de clones resistentes.

Dentro do contexto do programa de melhoramento genético, tem sido empregada a técnica de microestaquia do eucalipto, visando evitar a disseminação de doenças sistêmicas e para fins de indexação (MAFIA, 2008; MAFIA et al., 2011). Assim, os objetivos deste trabalho foram desenvolver um método e avaliar a resistência de clones de eucalipto pré-selecionados quanto à ferrugem durante a fase de micropropagação, reduzindo o tempo e os custos necessários para determinar o nível de resistência dos clones de eucalipto.

2. MATERIALE MÉTODOS

O trabalho consistiu de inoculações controladas do patógeno em mudas e em plântulas micropropagadas de seis clones de eucalipto. Em ambas as inoculações, empregaram-se um isolado monopustular de *Puccinia psidii* pertencente à raça 1 (GRAÇA et al., 2011), predominante nas diferentes regiões do Brasil. O isolado foi cedido pelo Laboratório de Patologia Florestal e Interação Planta:Patógeno, da Universidade Federal de Viçosa, MG. A multiplicação do inóculo foi realizada em mudas de jameiro (*Syngysium jambos* L., Alston), mediante inoculações periódicas a cada 20 dias. A suspensão foi ajustada com o auxílio de uma câmara de Neubauer, para concentração de 2×10^4 urediniosporos mL^{-1} (ALFENAS; MAFIA, 2007). O inóculo foi imediatamente utilizado após o preparo da suspensão.

2.1. Inoculação de *Puccinia psidii* em mudas de eucalipto *ex vitro*

As mudas dos seis clones de eucalipto, com 90 dias de idade, foram transplantadas para vasos de 2 L de capacidade, contendo a mistura de solo:areia:esterco (3:1:1) complementada com 3 g/L de NPK (6-30-6), e mantidas em condições de casa de vegetação até atingir o estágio adequado para inoculação,

que ocorreu após 30 dias do transplântio. Foram inoculadas 10 mudas de cada clone, totalizando 60 plantas.

Para realizar a inoculação, a suspensão de inóculo do patógeno foi atomizada homogeneamente nas superfícies abaxial e adaxial das folhas das mudas, com o auxílio de um pulverizador costal (Brudden®) de 5 L de capacidade, com bico do tipo leque (diâmetro de gotas de 158 µm), acoplado a uma válvula de pressão constante de 2 kgf.cm⁻² na barra de pulverização. Após a inoculação, as mudas foram mantidas em câmara com nebulização intermitente de água, a 25 ± 2 °C, na ausência de luz por 24 h, quando foram transferidas para câmara de crescimento a 22 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 h (RUIZ et al., 1989) e intensidade luminosa de 40 µmol.s⁻¹.m⁻². A avaliação da severidade da doença foi realizada aos 20 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala de notas. A escala para avaliação da resistência à ferrugem do eucalipto englobou quatro classes de severidade: S0 = imunidade ou reação de hipersensibilidade do tipo “fleck” ou necrótico; S1 = pústulas < 0,8 mm de diâmetro; S2 = pústulas de 0,8 a 1,6 mm de diâmetro; e S3 = pústulas > 1,6 mm de diâmetro (JUNGHANS et al., 2003).

2.2. Inoculação de *Puccinia psidii* em plântulas de eucalipto *in vitro*

Os mesmos clones de eucalipto empregados na etapa anterior, após a introdução no Laboratório de Micropropagação, foram multiplicados em meio MS (MURASHIG; SKOOG, 1962), modificado pela adição dos hormônios BAP (6-Benzilaminopurina) a 1,0 µM e ANA (ácido naftaleno acético) a 0,05 µM, em placas de Petri (9 cm diâmetro). Os explantes foram mantidos a 24 ± 2 °C, fotoperíodo de 14 h de luz com intensidade de 20 µmol.s⁻¹.m⁻². Após 40 dias de cultivo, os explantes foram transferidos para meio de alongamento, MS modificado (informação confidencial) com hormônios BAP e AIA (ácido 3-indolacético), em potes plásticos (500 mL) do tipo Osmotec®. O material vegetal foi incubado nas mesmas condições anteriores, e, após 60 dias, procedeu-se à transferência dos brotos alongados para meio MS modificado (informação confidencial) para enraizamento, com adição de AIB (ácido indolbutírico). Decorridos cinco dias, realizou-se a inoculação das plântulas alongadas e enraizadas.

Para realizar a inoculação, a suspensão de inóculo foi atomizada sobre os explantes, com o auxílio de um miniborrifador, suficientemente para uma cobertura

uniforme da superfície adaxial das folhas. Após a inoculação, as plantas foram incubadas a 22 °C, na ausência de luz, por 24 h, e, em seguida, foram transferidas para sala de crescimento a 24 ± 2 °C, com fotoperíodo de 14 h e intensidade luminosa de 20 µmol.s⁻¹.m⁻². Após 7, 11 e 14 dias da inoculação, avaliou-se a incidência da doença.

2.3. Confirmação da doença e análise estatística

Amostras foliares com a presença de sinais do patógeno foram observadas com o auxílio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, discos foliares (50 mm diâmetro) foram fixados em suporte apropriado e metalizados com ouro (metalizador: Balzers, modelo SDC50). Em seguida, os fragmentos foram observados em MEV (Zeiss EVO 50) com aceleração de 15 kV e distância de trabalho de 11 a 26 mm.

As notas de classe de severidade (JUNGHANS et al., 2003) da doença (valores 0, 1, 2 e 3), avaliada *ex vitro*, foram correlacionadas pelo coeficiente de Pearson, com a intensidade da doença após 7, 11 e 14 dias da inoculação *in vitro*, visando validar o protocolo de inoculação em material vegetal micropropagado.

3. RESULTADOS

A resistência à ferrugem variou de acordo com o clone de eucalipto inoculado. Porém, não foram observadas diferenças quanto às reações dos genótipos em razão da técnica empregada de inoculação do patógeno, confirmando a eficiência do protocolo alternativo desenvolvido neste trabalho. O período latente médio foi de aproximadamente cinco dias para ambas as metodologias de inoculação.

Nas inoculações *ex vitro*, os clones A e B foram classificados como resistentes à ferrugem, sendo o primeiro clone imune, não apresentando qualquer sintoma da doença. No clone B foram observadas pústulas puntiformes do patógeno, porém sem desenvolvimento expressivo da doença, o que caracterizou o clone como resistente. Os clones C, D e E foram classificados como suscetíveis, enquanto o clone F foi caracterizado como altamente suscetível (Tabela 1).

Na avaliação realizada aos sete dias após a inoculação dos explantes *in vitro*, embora tenha ocorrido variação na incidência, todos os clones, exceto o genótipo A, apresentaram explantes com sintomas da doença e sinais do patógeno (Figura 1).

Tabela 1 – Reação de clones *ex vitro* quanto à resistência à ferrugem causada por *Puccinia psidii*.
Table 1 – *Ex vitro eucalyptus clones reaction to rust disease caused by Puccinia psidii.*

Clone	Genitores	Nota de severidade*	Fenótipo
A	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	S0	Imune
B	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	S1	Resistente
C	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	S2	Suscetível
D	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	S2	Suscetível
E	<i>E. grandis</i> x Desconhecido	S2	Suscetível
F	<i>E. grandis</i> x Desconhecido	S3	Altamente suscetível

* Severidade da doença de acordo com a escala proposta por Junghans et al. (2003).

* *Disease severity evaluated with the scale proposed by Junghans et al. (2003).*

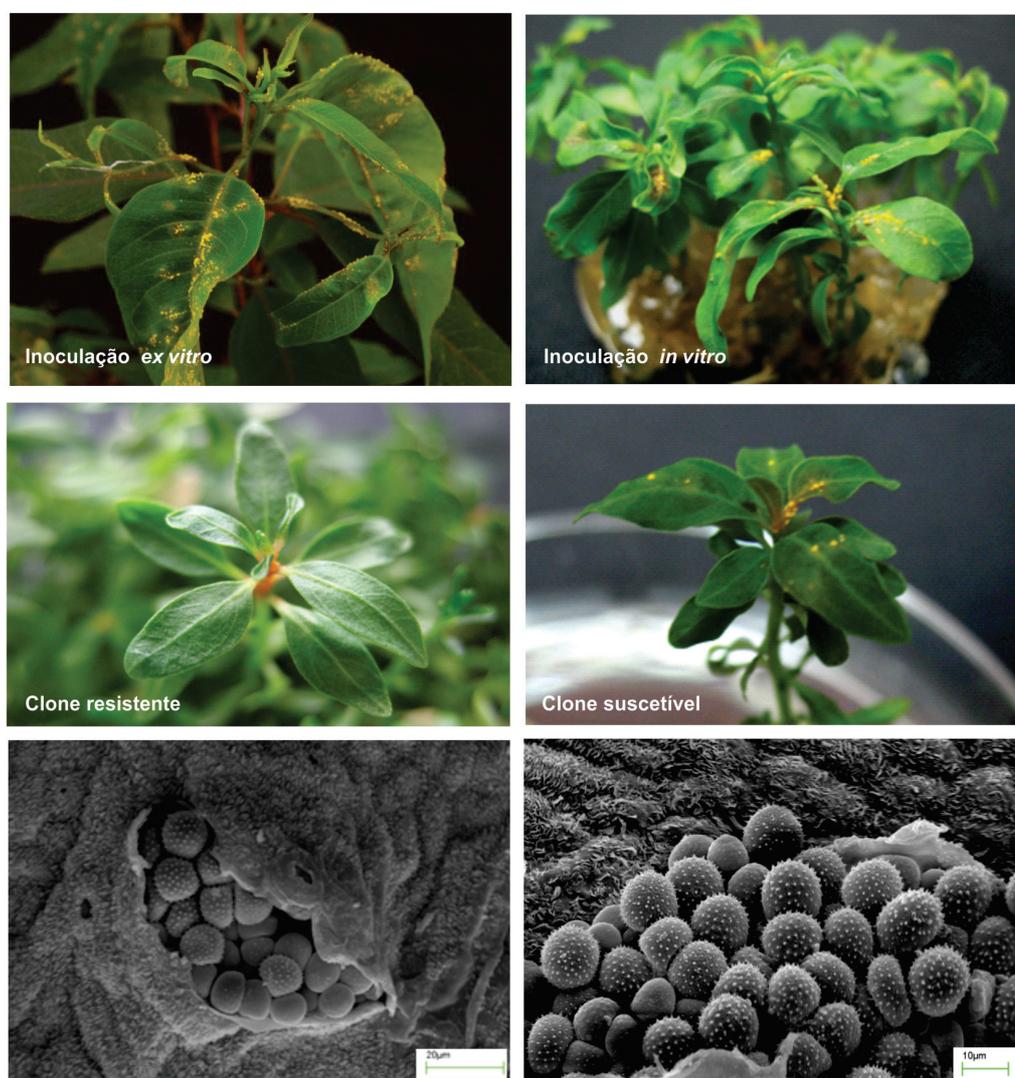


Figura 1 – Sintomas da ferrugem e sinais de *Puccinia psidii* em plantas *ex vitro* e em explantes *in vitro*.
Figure 1 – Rust symptoms and *Puccinia psidii* signs on *ex vitro* eucalyptus plants and *in vitro* explants.

De forma geral, os clones suscetíveis apresentaram um mesmo comportamento quanto à incidência da doença, ou seja, quanto ao percentual de plantas doentes, entre sete e 14 dias após a inoculação. Nos clones mais suscetíveis ocorreu aumento da intensidade da doença nos diferentes intervalos de avaliação. O clone A permaneceu imune durante todo o período de avaliação. O clone B permaneceu com menor intensidade da doença quando comparado com os clones C, D, E e F. Os clones C, D e E não diferiram entre si quanto à intensidade da doença, sendo classificados como suscetíveis. Em contrapartida, o clone F, a partir de 14 dias, apresentou a maior intensidade da doença (Figura 2).

Os resultados obtidos pelas duas técnicas de inoculação do patógeno foram altamente

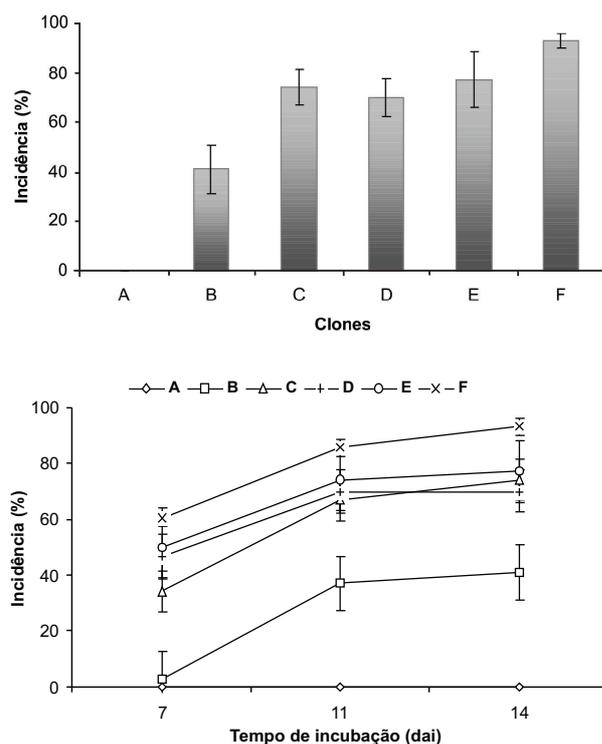


Figura 2 – Incidência da doença (percentagem de plantas doentes) após 14 dias da inoculação (A) e progresso da doença (B), em condições de micropropagação, para seis clones de eucalipto.

Figure 2 – Disease incidence (percentage of sick plants) after 14 days of inoculation (A) and disease progress (B) in micropropagation conditions for six eucalyptus clones.

correlacionados. Os coeficientes de correlação de Pearson obtidos entre os valores de severidade da ferrugem do eucalipto avaliada *ex vitro* aos 20 dias e de incidência da doença quando o patógeno foi inoculado em explantes *in vitro* foram de 0,93; 0,98; e 0,98% para os tempos de 7, 11 e 14 dias após a inoculação, respectivamente.

4. DISCUSSÃO

O uso das técnicas de micropropagação em estudos de resistência de plantas apresenta grande potencial (INGRAM; HELGESON, 1980). Em eucalipto, Mello et al. (2003) testaram pela primeira vez a inoculação de *P. psidii* em mudas seminais e micropropagadas. De acordo com esses autores, os resultados foram promissores, embora no trabalho não tenha sido demonstrado correlação dos resultados obtidos com a inoculação de material micropropagado e pelo procedimento-padrão de avaliação da resistência dos mesmos materiais genéticos.

A avaliação da resistência de plantas submetidas à cultura de tecidos apresenta importantes vantagens, incluindo a ausência de microrganismos contaminantes, menor demanda de espaço físico e melhor controle ambiental (HELGESON; HABERLACH, 1980). Como se sabe, a existência de microrganismos na superfície foliar pode alterar a resposta fenotípica de resistência. Por meio de diferentes mecanismos de controle biológico, pode ocorrer supressão significativa do patógeno inoculado, o que não interessa na avaliação da resistência genética. Pela menor demanda de espaço físico e por ser realizado em condições laboratoriais, é possível também obter melhor controle ambiental, durante todas as fases do procedimento. Sabe-se que as condições ambientais, principalmente após a inoculação, são extremamente importantes na expressão de doenças (ALFENAS; MAFIA, 2007).

A comparação de custos entre as duas técnicas demonstra que é viável realizar a avaliação da resistência durante a micropropagação, sempre quando esta técnica já é empregada como procedimento-padrão de multiplicação inicial dos clones comerciais. Além disso, é importante considerar que, pelo procedimento-padrão, é necessária a realização de diferentes tratamentos culturais, por pelo menos seis meses, para produção e manejo das mudas até a inoculação.

A micropropagação do eucalipto, conforme recomendado por Mafia (2008), tem sido utilizada como procedimento preventivo no controle de doenças sistêmicas, sobretudo para controle da murcha-bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum*. Assim, quando esse método de propagação do eucalipto é utilizado, ele viabiliza o procedimento de avaliação da resistência *in vitro*, permitindo analisar grande número de genótipos com maior controle ambiental, em menor espaço físico e de tempo, o que permite acelerar as pesquisas sobre melhoramento genético do eucalipto. Métodos de avaliação da resistência de plantas devem ser, prioritariamente, voltados para análise de plantas jovens, de forma a contribuir para o processo de seleção de materiais genéticos. Dessa forma, o protocolo desenvolvido para avaliação da resistência à ferrugem durante a micropropagação deve constituir importante ferramenta em estudos genéticos, incluindo mapeamento e transformação genética, estudos de herança e seleção precoce para resistência.

Entre as principais desvantagens da inoculação e avaliação *in vitro*, destaca-se a limitação quanto à aplicação das técnicas de cultura de tecidos para algumas espécies de plantas. Para eucalipto, os protocolos de micropropagação (XAVIER; COMÉRIO, 1996) estão constantemente sendo desenvolvidos e aprimorados, o que não limita o emprego da técnica de avaliação da resistência *in vitro*, pelo menos para eucalipto. No entanto, é importante considerar que plantas micropropagadas podem diferenciar fisiologicamente das plantas matrizes adultas, mantidas em condições naturais de crescimento. Além disso, diferenças podem ocorrer nos mecanismos de resistência pré-infeccionais, especialmente quanto à presença e espessura de cutícula e ceras na superfície foliar (INGRAM; HELGESON, 1980). As diferenças fisiológicas e histoquímicas são importantes fatores que podem afetar a expressão e intensidade de doenças, avaliadas em condições naturais (*ex vitro*) e durante a micropropagação (*in vitro*).

Para complementar, a avaliação da resistência de plantas é limitada para alguns patógenos. Acredita-se que o método seja mais facilmente aplicável para fungos biotróficos, com restrições importantes para fungos necrotróficos. Como se sabe, os fungos biotróficos, incluindo o grupo das ferrugens e míldios pulverulentos, apresentam dificuldades de crescimento e nutrição a partir de meios artificiais de cultura (ALFENAS; MAFIA, 2007). É importante ressaltar que o inóculo de fungos biotróficos pode apresentar

contaminações com esporos ou bactérias indesejáveis. Nesse caso, a alternativa para diminuir as contaminações é realizar a multiplicação do inóculo em clones suscetíveis em micropropagação por cultivos seriados, para obtenção de esporos livres de contaminação.

Os principais fatores relacionados ao processo ideal para avaliação da resistência incluem o uso de planta sadia e em condições adequadas de nutrição, para expressão máxima do potencial genético. Além disso, é fundamental o emprego de inóculo viável e ativo do patógeno, devidamente ajustado e inoculado por método adequado, considerando ambiente controlado de forma a permitir condições ideais para estabelecimento e desenvolvimento da doença. Acredita-se que o protocolo desenvolvido neste trabalho, em razão dos valores de correlação obtidos, atende aos pré-requisitos necessários para avaliação da resistência do eucalipto, garantindo precisão e maior agilidade dessa etapa do programa de melhoramento genético.

5. CONCLUSÕES

O período entre 11 e 14 dias após a inoculação foi o mais indicado para avaliação da ferrugem nos explantes de eucalipto inoculados *in vitro*. Além disso, a avaliação da incidência apresentou correlação positiva com a severidade avaliada pelo procedimento-padrão.

Observou-se que as reações dos genótipos avaliados em condições de micropropagação foram correlacionadas com os fenótipos determinados pelo procedimento-padrão de inoculação. Assim, o uso deste protocolo permite avaliar grande número de genótipos, com maior rapidez e precisão.

6. AGRADECIMENTOS

À Fibria Celulose, pelo apoio na realização deste trabalho; e aos técnicos Sebastião Miguel da Silva e Nilson Rodrigues, pelas análises de microscopia eletrônica e pelo apoio durante a micropropagação.

7. REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 382p.

ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 500p.

- ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**. Viçosa MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 387p.
- CARNEGIE, A. J.; LIDBETTER, J. R. Rapidly expanding host range for *Puccinia psidii* sensu lato in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v.41, n.1, p.13-29, 2012.
- CARVALHO, A. O. et al. Resistência de espécies, progênes e procedências de *Eucalyptus* à ferrugem, causada por *Puccinia psidii* Winter. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.2, p.139-147, 1998.
- COUTINHO, T. A. et al. Eucalyptus rust: a disease with the potential for serious international implications. **Plant Disease**, v.82, n.7, p.819-925, 1998.
- GLEN, M. et al. *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy - a review. **Australasian Plant Pathology**, v.36, n.1, p.1-16, 2007.
- GRAÇA, R. N. et al. A new race of *Puccinia psidii* defeats rust resistance in eucalypt. **Australasian Plant Pathology**, v.40, n.4, p.442-447, 2011.
- HELGESON, J. P.; HABERLACH, G. T. Disease resistance studies with tissue cultures. In: INGRAM, D. S.; HELGESON, J. P. **Tissue culture methods for plant pathologists**. Oxford: Blackwell Scientific, 1980. p.179-184.
- INGRAM, D. S.; HELGESON, J. P. **Tissue culture methods for plant pathologists**. Oxford: Blackwell Scientific, 1980. 272p.
- JUNGHANS, D. T.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A. Escala de notas para a quantificação da ferrugem em *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.2, p.261-265, 2003.
- LANA, V. M. et al. Survival and dispersal of *Puccinia psidii* spores in eucalypt wood products. **Australasian Plant Pathology**, v.41, n.3, p.229-238, 2012.
- MAFIA, R. G. Manejo integrado de doenças: um bom exemplo florestal. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SILVICULTURA, 1., 2008, Curitiba. **Anais...** Piracicaba: PTSM/ IPEF/ FUPEF, 2008. 259p.
- MAFIA, R. G.; MAFIA, G. M. V.; ABAD, J. I. M. Desafios e conquistas na aplicação da tecnologia visando reduzir perdas causadas pelas doenças do eucalipto. **Tropical Plant Pathology**, v.36, Suplemento, p.1321-1323, 2011.
- MELLO, E. J. et al. Avaliação da resistência à ferrugem do eucalipto através da inoculação artificial em plântulas e em gemas micropropagadas. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 8., 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: 2003. CD-Rom.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised médium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- RUIZ, R. A. R. et al. Influência de temperatura, do tempo de molhamento foliar, fotoperíodo e da intensidade de luz sobre a infecção de *Puccinia psidii* em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v.14, n.1, p.55-61, 1989.
- XAVIER, A. A. et al. Resistência de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens* à ferrugem (*Puccinia psidii*). **Revista Árvore**, v.31, n.4, p.731-735, 2007.
- XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v.20, n.1, p.9-16, 1996.

