

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Crescimento e desenvolvimento de brotações de  
progênes de *Eucalyptus grandis in vitro***

**Daruska Cavalcante Cardim**

**Dissertação apresentada para obtenção do título  
de Mestre em Recursos Florestais com opção em  
Silvicultura e Manejo Florestal**

**PIRACICABA  
2006**

**Daruska Cavalcante Cardim**  
**Engenheiro Florestal**

**Crescimento e desenvolvimento de brotações de  
progênies de *Eucalyptus grandis in vitro***

Orientador:

Prof. Dr. **ANTÔNIO NATAL GONÇALVES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Recursos Florestais com opção em  
Silvicultura e Manejo Florestal

PIRACICABA

2006

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Cardim, Daruska Cavalcante

Crescimento e desenvolvimento de brotações de progênies de *Eucalyptus grandis* in vitro / Daruska Cavalcante Cardim. - - Piracicaba, 2006.  
45 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Anatomia vegetal 2. Crescimento vegetal 3. Desenvolvimento vegetal 4. Eucalipto  
5. Fertilização "in vitro" 6. Recurso genético vegetal I. Título

CDD 634.9734

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

“Felizes os que confiam no Senhor [...] são como as árvores plantadas às margens de um rio, cujas raízes alcançam águas profundas.

Tais árvores não são afetadas pelo calor nem se preocupam com longos meses de seca. Suas folhas permanecem verdes e produzem fruto delicioso”.

**Jeremias 17.7,8**

“Pois tudo, absolutamente tudo, nos céus e na terra, visível e invisível [...] todas as coisas começaram nEle e nEle encontram propósito”.

**Colossenses 1.16**

"Quando a empreitada é formidável, até fracassar é glorioso".

**Vincent Lombardi**

***Ao meu Deus, entrego este trabalho.***



É melhor ter companhia do que estar sozinho, porque maior é a recompensa do trabalho de duas pessoas. Se um cair, o amigo pode ajudá-lo a levantar-se [...] Um homem sozinho pode ser vencido, mas dois conseguem defender-se. Um cordão de três dobras não se quebra com facilidade.

**Eclesiastes 4.9,12**

***Aos meus pais Mirian e Antonio,***

***DEDICO***

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Criador e Fiel Amigo, e ao seu filho Jesus Cristo Salvador, onde encontro Vida e Real Propósito.

À minha família, que é a mais perfeita demonstração da graça divina na minha vida. Em especial aos meus amados pais, Mirian e Antônio, que são tão importantes para mim que não haveria livros para conter o tamanho do amor e gratidão que dedico a eles. A vocês, meu real obrigado, sem seu exemplo e cuidado não teria chegado até aqui.

Ao Prof. Dr. Antônio Natal Gonçalves por nunca ter desistido de mim, mesmo querendo, muitas vezes, e ficando bravo com razão, dedico meu sincero amor de aluna.

Ao Carlos Vera Bravo, obrigada mesmo irmão, pelo cuidado e por ter emprestado seu trabalho. Essa dissertação realmente não aconteceria sem você.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus avós, *in memoriam*, por terem me ensinado a, mesmo com as dificuldades no caminho, nunca perder o sorriso do rosto ou o brilho no olhar.

À minha amiga do peito, Cristina, que me sustentou com seu carinho nas inúmeras horas difíceis e nas outras tantas que pensei em desistir.

Aos meus amigos da ABU, tão queridos, Zizi, Marcela, Marina, Liana, Israel e Vanderlei, meu carinho.

Aos meus professores do Departamento de Engenharia Florestal, pela tão simples e bela arte de ensinar.

Ao Departamento de Ciências Florestais, pela estrutura fornecida para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Beto e Cláudia, por me darem de sua alegria nas horas que eu mais precisei, além da ajuda que foi essencial para que isso tudo acontecesse.

Aos amigos e companheiros de Laboratório Diva, Wirifran, Juliana, pela ajuda e companheirismo durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos tão antigos do Departamento de Genética e meus eternos orientadores, Mateus, professora Betty, professor Ando, Rainério e Inês, que me ensinaram a amar a pesquisa e a não desistir nunca dessa mágica da ciência.

Aos outros tantos amigos do caminho, obrigada pela simples presença e o sorriso de vocês, talvez nem saibam o quanto isso foi incentivador.

**A todos vocês, meu mais sincero agradecimento.**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT .....	8
1 INTRODUÇÃO .....	9
2 DESENVOLVIMENTO .....	11
2.1 Gênero Eucalyptus.....	11
2.2 Eucalyptus grandis .....	11
2.3 Micropropagação.....	12
2.4 Multiplicação de gemas .....	13
2.5 Alongamento de brotações.....	14
2.6 Enraizamento de brotações.....	14
2.7 Efeito do genótipo e a cultura in vitro .....	16
2.8 Material e métodos .....	17
2.8.1 Fonte do material vegetal .....	17
2.8.2 Seleção de material e meio de cultura .....	18
2.8.3 Experimentos realizados e delineamentos .....	19
2.8.3.1 Primeiro experimento (multiplicação) .....	19
2.8.3.2 Segundo experimento (alongamento) .....	20
2.8.4 Análise estatística .....	21
2.9 Resultados e discussão.....	22
2.9.1 Multiplicação.....	22
2.9.1.1 Observações visuais .....	24
2.9.2 Alongamento .....	27
2.9.2.1 Observações Visuais.....	32
3 CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

## RESUMO

### **Crescimento e desenvolvimento de brotações de progênies de *Eucalyptus grandis in vitro*.**

O objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento e desenvolvimento de brotações de progênies de *Eucalyptus grandis in vitro*. Brotações oriundas de explantes de hipocótilos distais de 10 progênies foram utilizadas no meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995). Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 tratamentos (10 progênies). No meio de cultura suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIA, efetuaram-se 3 subcultivos e aos 63 dias foram avaliadas as massas fresca e seca. O meio de cultura com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP foi utilizado no alongamento das brotações e em brotações individualizadas. No alongamento de brotações, procederam-se 3 subcultivos, e aos 63 dias foram avaliadas as massas fresca e seca e número de brotações. No alongamento de brotações individualizadas, aos 21 dias foram avaliadas a altura e a ocorrência de raízes. Existiram respostas diferenciadas das progênies; algumas progênies mostraram maior produção de massa fresca e seca e outras se destacaram no alongamento e enraizamento in vitro.

Palavras-chave: *Eucalyptus*; progênies; crescimento; desenvolvimento; alongamento; enraizamento; *in vitro*



## ABSTRACT

### **Growth and development of *Eucalyptus grandis* progeny shoots *in vitro***

The aim of this work was to evaluate the growth and development of *eucalyptus grandis* progeny shoots *in vitro*. Shoots from distal hypocotyl explants of 10 progenies were cultivated in the JADS (CORREIA et al., 1995) tissue culture medium. The culture medium was supplemented with 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de IAA. Three subcultures where made and at 63<sup>rd</sup> day of culture, the fresh and oven dry weight and number of shoots were evaluated. At the elongation phase, using the culture medium supplemented with 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, three subcultures were made and at the 63<sup>rd</sup> day of culture, fresh and oven dry weight, shoot height and rooting percentage were evaluated. There were differentiated progeny responses. Some showed higher fresh and oven dry weight production and others showed higher elongation rates and rooting percentage.

Keywords: *Eucalyptus*; progenies; growth; development; elongation; rooting; *in vitro*

## 1 INTRODUÇÃO

“Ainda realizando, ainda buscando,  
aprende a trabalhar  
e a esperar “.

**Henry W. Longfellow**

O desenvolvimento da tecnologia silvicultural no Brasil nas últimas décadas e as condições naturais favoráveis propiciou, além dos ganhos de produtividade, o encurtamento dos ciclos de rotação das florestas cultivadas, conseguindo, com isso, reduzir os custos de produção dos reflorestamentos. O menor custo da madeira reflorestada no Brasil, em relação aos países do hemisfério norte, cria importantes vantagens de custos na produção industrial dos produtos de origem florestal, podendo ser até 25% mais baixos, no caso da celulose (HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000). Em consequência desse avanço, as conquistas da biotecnologia no setor da produção florestal possibilitaram o estabelecimento de um programa de clonagem e multiplicação *in vitro*, que são um caminho para alcançar rapidamente os ganhos de produtividade desejados (XAVIER; COMÉRIO, 1996).

A micropropagação de eucalipto foi desenvolvida em mais de 55 espécies, e em um grande número de híbridos, utilizando técnicas convencionais de organogênese a partir de tecidos juvenis como cotilédones e embriões, e de árvores adultas empregando brotos epicórmicos, nós e rebrotações como fonte de explantes (JONES ; VAN STADEN, 1997). A aplicação em escala comercial destas técnicas vêm-se limitadas por fatores como as baixas taxas de multiplicação, qualidade dos explantes, e altos custos ocasionados pelo uso intensivo de mão-de-obra nas etapas de multiplicação e enraizamento (McCOMB; BENNETT, 1986).

A variabilidade genética existente na população de melhoramento é a matéria prima sobre a qual são realizados processos de seleção e recombinação, com a finalidade de obter variedades, ou híbridos, capazes de apresentar maior rendimento possível, com produtos de alta qualidade e capazes de se adaptar às condições de um determinado ambiente, além de exibirem resistência às principais pragas e doenças.

Entretanto, para a otimização da micropropagação depende a melhor interação entre o potencial do genótipo e os fatores ambientais.

Como fator ambiental de maior importância no método *in vitro*, destaca-se o meio de cultura, sua especificidade com as exigências nutricionais da espécie e/ou clone e a capacidade de difusão para influenciar no crescimento e desenvolvimento, aumentando o desempenho em todas as fases da micropropagação (CORREIA et al., 1995).

Muitas são as dificuldades encontradas para propagação *in vitro*, sendo muitas vezes associadas à falta de conhecimento sobre fisiologia do crescimento e desenvolvimento da cultura *in vitro* da espécie.

Segundo Benincasa (1988), a partir dos dados de crescimento pode-se estimar, as causas de crescimento entre plantas geneticamente diferentes ou entre plantas crescendo em ambientes diferentes. O crescimento de uma planta pode ser estudado através de medidas de diferentes tipos: lineares (altura, comprimento entre outros), superfície (área foliar), peso e unidades estruturais. Com o presente trabalho, procurou-se levantar as relações entre as diferentes progênies e seu diferencial em crescimento e desenvolvimento na técnica de cultura *in vitro* do *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Gênero *Eucalyptus*

De ocorrência natural na Austrália, este gênero possui cerca de 600 espécies adaptadas às diversas condições de clima e solo. Dentro dessa grande diversidade, somente duas espécies não são originárias da Austrália: o *Eucalyptus urophylla* e o *Eucalyptus deglupta* (MORA; GARCIA, 2000).

Na grande maioria de espécies desse gênero, são conhecidas como árvores típicas de florestas altas, com 30 a 50 m de altura e de florestas abertas, com árvores de 10 a 25 m de altura. Aproximadamente, 30 a 40 espécies são arbustivas (MORA; GARCIA, 2000). Situadas na faixa compreendida entre as latitudes 9°N e 44°S, encontram-se amplamente espalhadas na natureza em altitudes que variam de 30 até 1000 m (ELDRIDGE et al., 1994).

O Brasil encontra-se entre os maiores produtores mundiais de eucalipto, e sua destinação serve basicamente à produção de celulose e papel e ao carvão que abastece as siderúrgicas, gerando um grande número de empregos diretos e indiretos. Entre as centenas de espécies do gênero *Eucalyptus*, cerca de trinta têm mostrado potencial para cultivos de alta produtividade. Entretanto, estima-se que apenas dez espécies são exploradas na plantação mundial ocupada pela cultura do eucalipto (MORA; GARCIA, 2000).

### 2.2 *Eucalyptus grandis*

O *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden é uma espécie nativa do Norte de Nova Gales do Sul e da costa sul de Queensland, na Austrália. Distribui-se principalmente entre as latitudes 26 a 32° S e altitudes de 0-300 m e se adapta muito bem em regiões com precipitação entre 1000 e 1750 mm com valores de temperatura médias máximas entre 29-32°C e médias mínimas entre 5° e 6°C (FAO, 1981).

A madeira desta espécie é considerada medianamente leve e fácil de trabalhar em operações de usinagem, sendo considerada de baixa estabilidade dimensional e de elevada permeabilidade. É uma das espécies mais versáteis e indicadas para usos

múltiplos apresentando, no entanto, problemas de empenamento, contrações e rachaduras nas operações de desdobro e secagem (EYRE, 1980).

Muitos estudos sobre cultivo *in vitro* com *Eucalyptus grandis* e híbridos com esta espécie têm sido conduzidos devido à importância que possui, em termos de produtividade e características desejáveis a indústria de papel e celulose (CORREIA et al., 1995; HIGASHI, 1996; LANGER, 2000; BASSO et al., 2003; LIMA, 2004; VERA BRAVO, 2005).

### **2.3 Micropropagação**

Com a crescente demanda de produtos florestais e o interesse de manutenção das florestas nativas, há a necessidade constante de desenvolvimento de técnicas visando o aumento da produtividade das florestas. Dentre várias técnicas, a micropropagação tem sido a de maior impacto nas técnicas de cultura de tecidos com aplicação no setor florestal (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990; HIGASHI; SILVEIRA; GONÇALVES, 2000). Esta importância está relacionada à possibilidade de propagar genótipos desejáveis sem a perda da árvore matriz, obtendo alta taxa de multiplicação com uso da reversão à juvenilidade, reduzindo o tempo para obter-se este genótipo e estabelecendo-se alternativas a estratégia do melhoramento genético (GONÇALVES, 1982).

Segundo Mullins et al. (1997), os procedimentos convencionais de micropropagação em eucalipto se dão pela ativação de gemas axilares em cultura.

Protocolos eficientes de micropropagação de eucalipto pela via organogênica foram apresentados por Azmi et al. (1997); Bandyopadhyay et al. (1999); Chen; Tsay e Chung (1996); Ho et al. (1998); Mullins et al. (1997), Subbaiah e Minocha (1990) e Tibok et al. (1995), os quais utilizaram materiais juvenis como fonte de explantes, a exemplo de cotilédones e hipocótilos. Trabalhos de organogênese *in vitro* utilizando explantes foliares de clones micropropagados de *Eucalyptus grandis* foram realizados por Lainé e David (1994), os quais constataram a existência de diferenças no requerimento com relação aos reguladores de crescimento, para organogênese, entre os diferentes clones, e que o tamanho do explante não afeta a habilidade destes de produzir gemas. Esses autores verificaram, também, que as condições de luminosidade constituem importante

parâmetro, sendo os melhores resultados obtidos na ausência de luz nas primeiras quatro semanas de cultivo.

Normalmente, na propagação *in vitro* os reguladores de crescimento constituem-se numa primeira etapa a ser abordada, em que o modo de interação entre auxinas e citocininas é freqüentemente dependente da espécie da planta e do tipo de tecido utilizado na cultura (COENEN; LOMAX, 1997; PIERIK, 1997; PEREZ; KERBAUY, 2004). A maneira complexa com que os reguladores de crescimento e as células se interagem indica que, se o tecido não está em um estágio responsivo, ele não irá responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações esses reguladores são utilizados. A ausência na resposta a um regulador de crescimento é freqüentemente um problema maior quando explantes de plantas adultas são utilizados, em comparação com material juvenil (BONGA; von ADERKAS, 1992).

Apesar do freqüente uso da micropropagação como meio de diminuição do tempo de reprodução das mudas selecionadas para o plantio, têm-se encontrado nessa técnica problemas relacionados às exigências de manipulação contínua do material *in vitro*, o que dificulta as etapas de operacionalização, conseqüentemente elevando o custo do sistema (AITKEN-CHRISTIE; KOSAI; TAKAYAMA, 1995).

## **2. 4 Multiplicação de gemas**

A multiplicação é uma etapa da micropropagação na qual o objetivo principal visa obter um maior número de brotações através de sucessivos subcultivos (DEBERGH; READ, 1990).

Fontes de explantes de material juvenil de *Eucalyptus grandis* têm apresentado maior proliferação de gemas *in vitro* do que quando obtidas de material adulto (FURZE; CRESSWELL, 1985; SITA; RANI, 1986). Todavia, as taxas de multiplicação estão relacionadas ao potencial genético do material, ao valor nutricional do meio de cultura e sua capacidade de difusão, às condições ambientais e microambientais para o crescimento (SANKARA-RAO; VENKATESWARA, 1985; CORREIA et al., 1995).

Em culturas estabelecidas, fatores como tipo e tamanho do explante, freqüência de subculturas e cuidados no procedimento de repicagem, influenciam na multiplicação de gemas *in vitro* (CORREIA et al., 1995).

Para a estimulação e proliferação de gemas axilares, o BAP tem sido o regulador de crescimento mais utilizado em meio de cultura, para espécies de *Eucalyptus* (NICCOL; REGAN; DE FILIPPIS, 1994; SANKARA-RAO, 1988; TRINDADE et al., 1990).

## 2. 5 Alongamento de brotações

Poucos estudos foram realizados sobre a fase de alongamento de *Eucalyptus grandis*. Entretanto, esta etapa parece ser necessária para o sucesso do cultivo *in vitro* desta espécie (CORREIA et al., 1995).

Um dos fatores que afeta o alongamento de brotações está relacionado ao efeito residual do BAP utilizado durante a fase de multiplicação de gemas em subculturas sucessivas (GRATTAPAGLIA et al., 1987).

Carvalho (1988) trabalhando com meio de cultura sólido suplementado com 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA obteve brotações com altura média de 1,0 cm.

Toth; Vieira e Gonçalves (1993) estudando o alongamento de brotações em clones de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, avaliados aos 30 dias, obtiveram crescimento em altura de 3,0 cm, cultivados em meio de cultura sólido, Gonçalves (1982) modificado.

Joshi et al. (2003) obtiveram brotações de *Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus grandis* alongadas quando cultivadas em meio de cultura sem adição de reguladores de crescimento. Resultados similares foram alcançados em *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus tereticornis* e *Eucalyptus tereticornis* (BISHT et al.,2000).

## 2.6 Enraizamento de brotações

A fase de enraizamento caracteriza-se pela formação de raízes adventícias nas partes aéreas do caule provenientes da multiplicação. A rizogênese ocorre de uma a

três semanas e segundo Hartmann e Kester (1990), divide-se em iniciação e alongação das raízes. A duração destas fases pode variar de uma a três semanas. Para as duas fases iniciais, a presença da auxina é fundamental, enquanto, na última, torna-se inibidora (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990, 1998). Experimentos com enraizamento *in vitro* foram realizados por Teo e Chan (1994), utilizando microestacas de *Carica papaya* L., após três a quatro dias de tratamento com AIB. A extremidade basal da microestaca apresentou aparência de calo e deste tecido surgiram indicações de raiz. Entretanto, o processo de enraizamento foi verificado entre sete e oito dias.

A habilidade dos tecidos de plantas em desenvolver raízes *in vitro* depende das interações entre os fatores exógenos e endógenos. Estudos mostraram que o papel das auxinas tornou-se bem estabelecido como os principais fatores envolvidos na diferenciação e alongamento das células da raiz, bem como a formação de raízes adventícias (EVANS, 1985). O mecanismo de ação destes compostos permanece controverso, apesar dos novos enfoques através da biologia molecular (KRIEKEN; BRETELER; VISSER, 1991).

O AIB tem sido utilizado com muita freqüência no enraizamento de *Eucalyptus* e outras espécies lenhosas (BENNET et al., 1994; BURGER, 1987; FRANCKET; BOULAY, 1982).

Para evitar a inibição do enraizamento pela presença constante da auxina no meio, tem sido adotada a estratégia de manter os explantes por um período curto na presença desta substância. Em seguida, faz-se a inoculação em um novo meio sem regulador de crescimento (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

A redução à metade ou a 3/4 da concentração de sais no meio é relatada para a melhoria do enraizamento *in vitro* (MACHNIK; ORLIKOWSKA, 1981; TRAVERS; STARBUCK; NATARELLA, 1985; ZIMMERMAN ; BROOME, 1981).

Segundo estudos de Sasse (1995), os índices de enraizamento de estacas de *Eucalyptus globulus* variam de 5 a 90%, com média de 47% de enraizamento, em virtude da variabilidade genética dos diferentes clones.

Para a sobrevivência e crescimento de uma planta nas novas condições ambientais, a obtenção de um sistema radicular bem desenvolvido é de grande importância. O tipo do sistema de raízes, obtido no enraizamento *in vitro*, também



determina o sucesso do transplante (GRATTAPLAGIA; MACHADO, 1990). Para Debergh (1991), o processo de enraizamento é muito complexo incluindo fatores fisiológicos, bioquímicos e biológicos que interagem com os fatores ambientais. Além disso, a complexidade é aumentada pela multiplicidade de espécies e cultivares acompanhadas pela variabilidade biológica.

Para uma micropropagação bem sucedida, três dificuldades principais precisam ser vencidas: estabelecimento de explantes primários em cultura; desenvolvimento do meio de cultura ideal e condições ambientais que proporcionem altas taxas de multiplicação e indução do enraizamento. Embora considerável progresso tenha sido conseguido com relação aos dois primeiros itens, o enraizamento ainda permanece um problema na propagação de árvores *in vitro* (ABDULLAH; GRACE; YEOMAN, 1989; BAJAJ, 1986; VIETEZ; SANCHEZ; SAN-JOSE, 1989).

## **2.7 Efeito do genótipo e a cultura *in vitro***

Vários autores têm estudado o efeito do genótipo para diferentes características em espécies de *eucalyptus*, sendo possível detectar variação genética entre e dentro de procedências e famílias (MARCAR et al., 2002).

A otimização da produção de brotações pode ser feita através da manipulação do meio, do ambiente, do *background* genético ou do estágio de desenvolvimento. Os efeitos do genótipo e do ambiente podem afetar significativamente a formação de gemas (ARENA; CASO, 1992; SHARMA; RAMAMURTHY, 2000;; PÉREZ-TORNERO; BURGOS, 2000; VERA BRAVO, 2005).

Sobrosa e Corder (2003), estudando a variação genética entre e dentro de famílias de polinização aberta de uma população de *Eucalyptus grandis*, aos 27 anos de idade, para proliferação de gemas e produção de raízes adventícias *in vitro* observaram que os efeitos do genótipo e do ambiente foram significativos na formação de gemas e de raízes.

Tang e Ouyang (1999) também determinaram a influência dos meios de cultura sobre a organogênese de 6 progênes de *Pinus taeda* L. e encontraram 3 famílias que se destacaram quanto à regeneração.

Silva et al. (1995) estudaram o efeito da idade das raízes emergidas *in vitro*, substratos e espécies (pau-santo, mandioca, batata-doce e amora preta) na capacidade de aclimatização *ex vitro*. Os resultados demonstraram que o maior índice de sobrevivência está ligado à espécie, não sofrendo influência de nenhum substrato e nem da idade da raiz.

Num estudo de estabelecimento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*, observou-se que há uma correlação já no primeiro subcultivo, entre o genótipo e o alto potencial das culturas na multiplicação *in vitro*. O genótipo apresentou efeito altamente significativo em relação ao número de brotos, altura média dos brotos e ao número de brotos >20mm por explante (SILVA et al., 2003; VERA BRAVO, 2005).

## **2.8 Material e métodos**

### **2.8.1 Fonte do material vegetal**

Brotações (aglomerado de gemas ou nós epicórmicos) de progênes de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden mantidas *in vitro* no Laboratório de Fisiologia das Árvores - Departamento de Ciências Florestais - ESALQ/USP - foram utilizadas como fonte de explante padrão (Figura 1). Esse material foi proveniente de regenerações *in vitro* de sementes de árvores matrizes de 23 anos de idade de dez progênes de *Eucalyptus grandis* de polinização aberta, que fazem parte da População Base de Origem Atherton QLD/Austrália, propriedade do IPEF, e encontra-se na Estação Experimental de Ciências Florestais de Anhembi, SP, Brasil.

A Estação Experimental está situada a 22°47' de Latitude Sul e 48°09' de Longitude Oeste, com uma altitude de 500 m, clima Cwa com verões quentes e chuvosos, invernos moderadamente frios e secos e com temperatura média anual de 21 °C e precipitação média anual de 1.350 mm.



Figura 1 - Brotações de *Eucalyptus grandis* derivadas regeneração de hipocótilos distais de plântulas obtidas a partir da germinação de sementes *in vitro*

### 2.8.2 Seleção de material e meio de cultura

O material foi selecionado a partir de frutos de dez progênies selecionadas aleatoriamente, coletados em janeiro de 2004, e as sementes foram separadas segundo processo corrente do IPEF e mantidas em geladeira a temperatura de 5°C em sacos plásticos vedados. As sementes foram desinfestadas com água sanitária comercial 100% (2-2,5% p/v de NaOCl) com adição de 10 gotas de Tween 20 a cada 30 mL do produto, durante 1 hora e seguido, por seis lavagens com água destilada e esterilizada.

As sementes foram inoculadas em frascos com capacidade volumétrica de 220 mL contendo 40 mL de meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995) e 0,5% de ágar. O pH do meio foi ajustado a 5,8 antes da esterilização em autoclave a 121 °C durante 20 min. Os explantes inoculados para regenerar *in vitro* foram mantidos em sala de crescimento durante os primeiros 4 dias no escuro, posteriormente, permaneceram a 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiação fotosinteticamente ativa (PAR), sob fotoperíodo de 12 h e temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Os explantes utilizados na instalação dos experimentos (Figura 1) foram brotações ou nós epicórmicos originários da regeneração de hipocótilos distais de

plântulas de 20 dias de idade na 14ª semana de cultivo *in vitro*, obtidas de acordo com a metodologia de Vera Bravo (2005).

As brotações foram multiplicadas em frascos com capacidade volumétrica de 220 mL, contendo 40 mL de meio de cultura JADS (CORREIA et al, 1995), suplementado com reguladores de crescimento dependendo do experimento realizado, além das vitaminas e aminoácidos: meso inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), tiamina ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), piridoxina ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido nicotínico ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) e pantetonato de cálcio ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ). A concentração de sacarose no meio foi de  $30 \text{ g L}^{-1}$  e de  $5 \text{ g L}^{-1}$  de ágar, com pH ajustado a 5,8, anteriormente a esterilização em autoclave a  $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. Os materiais inoculados *in vitro* foram mantidos em sala de crescimento a  $93 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de radiação fotosinteticamente ativa (PAR), sob fotoperíodo de 12 horas com intervalo de iluminação das 6 às 18 h e temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### **2.8.3 Experimentos realizados e delineamentos**

#### **2.8.3.1 Primeiro experimento (multiplicação)**

O experimento foi instalado com cultura de brotações mantidas no 14º cultivo oriundas de hipocótilos distais de dez progênes visando determinar a produção de massa fresca e seca.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 tratamentos (10 progênes) e 13 repetições, totalizando 130 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco contendo 40 mL de meio de cultura suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP (benzilaminopurina) e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA (ácido indolacético) e 4 explantes (aglomerados de brotações com aproximadamente 1,0 cm de diâmetro cada).

O experimento foi conduzido em sala de crescimento de acordo com o item 2.8.2. As culturas do experimento foram subcultivadas por três vezes em intervalos de 21 dias cada. Aos 63 dias foram avaliadas as produções de massas fresca e seca de cada unidade experimental sendo que cada explante foi pesado individualmente.

### **2.8.3.2 Segundo experimento (alongamento)**

O experimento foi instalado com cultura de brotações mantidas no 14º cultivo oriundas de hipocótilos distais de dez progênes visando determinar a produção de massa fresca, massa seca e números de brotações.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 tratamentos (10 progênes) e 5 repetições, totalizando 50 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco contendo 40 mL de meio de cultura suplementado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 4 explantes (aglomerados de brotações com aproximadamente 1,0 cm de diâmetro cada).

O experimento foi mantido em sala de crescimento de acordo com o item 2.8.2. As culturas do experimento foram subcultivadas por três vezes em intervalos de 21 dias cada. Aos 63 dias, foram avaliados as produções de massas frescas e secas, e número de brotações de cada unidade experimental, sendo os dados obtidos em cada explante.

### **2.8.3.3 Terceiro experimento (alongamento)**

O experimento foi instalado com cultura de brotações mantidas no 14º cultivo oriundas de hipocótilos distais de dez progênes visando o alongamento das brotações.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com 10 tratamentos (10 progênes) e 10 repetições totalizando 100 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco contendo 40 mL de meio de cultura suplementado com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 15 explantes (brotação individualizada ≤ 1,0 cm) (Figura 2).

O experimento foi conduzido em sala de crescimento de acordo com o item 2.8.2. Aos 21 dias, avaliaram-se a altura e a ocorrência de enraizamento de cada brotação e o valor médio foi considerado para a análise.

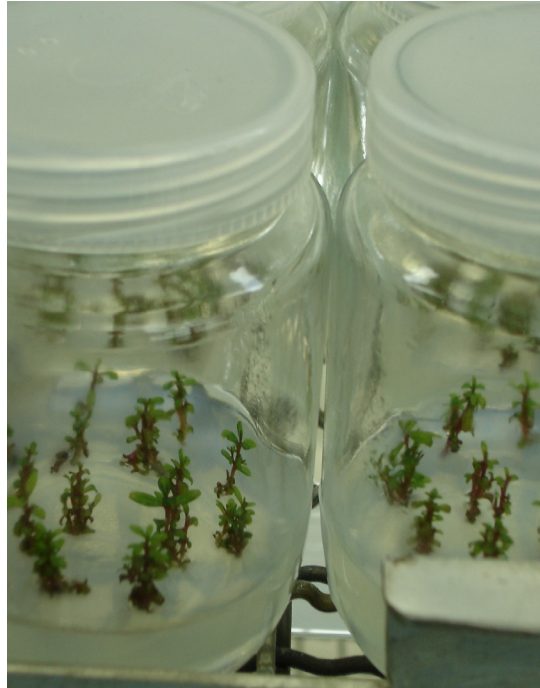


Figura 2 - Brotações individualizadas de *Eucalyptus grandis* na fase de alongamento *in vitro*

#### 2.8.4 Análise estatística

As produções de massas frescas, massas secas, quantidade de brotações por explante, altura das brotações das progênies foram avaliadas através da análise da variância ( $p \leq 0,01$ ) e teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

As variáveis foram avaliadas efetuando-se uma análise exploratória dos dados para averiguação das pressuposições de homogeneidade de variâncias, independência de erros, distribuição normal dos erros e observações discrepantes.

As análises estatísticas foram realizadas no sistema computacional estatístico SAS (SAS INSTITUTE, INC, 1997).

Para a variável porcentagem de enraizamento das progênies calculou-se o intervalo de confiança da média ( $\alpha = 0,95$ ).

## 2.9 Resultados e discussão

### 2.9.1 Multiplicação

Os resultados da análise de variância para a produção de massa fresca e produção de massa seca das progênes encontram-se indicados na Tabela 1. As progênes apresentaram diferença significativa pelo teste F ( $p < 0,01$ ).

Tabela 1 - Resumo das análises de variância para produção de massa fresca e produção de massa seca de 10 progênes de *Eucalyptus grandis* na fase de multiplicação de brotações

Fontes de variação	G L	Quadrados médios	
		Produção de massa fresca	Produção de massa seca
Progênes	9	1,2072	0,0037
Resíduo	120	0,2060	0,0005
F		5,86 **	6,84 **
CV (%)		22,09	15,43
Média geral (g)		2,0551	0,1511

\*\* significativo pelo teste F,  $p < 0,01$ ;

Os dados de produção de massa fresca apresentaram maior amplitude quando comparado à amplitude dos dados de produção de massa seca. Isto poderia justificar o maior coeficiente de variação observado na variável produção de massa fresca do que para a produção de massa seca (Tabela 1). Resultados similares a este, foram encontrados por Correia et al. (1995) e Langer (2000) cultivando *in vitro* híbridos de *Eucalyptus grandis*. Adicionalmente à variabilidade genética (RAMAGE; WILLIAMS, 2002; Vera Bravo, 2005), a fonte de variação do crescimento *in vitro* entre os explantes pode estar relacionada com o tamanho do explante inicial e com a posição deste explante quando seccionado no explante de origem (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Entretanto, a razão entre as médias gerais da produção de massa seca / produção de massa fresca (7,35 % de massa seca por explante), aos 21 dias de cultivo, foi considerada adequada (EPSTEIN; BLOOM, 2005).

Na Figura 3, pode-se observar que a maior produção de massa fresca foi obtida na progênie 7 (2,43 g), a qual diferiu estatisticamente ( $p=0,05$ ) das progênies 5 (1,70 g) e 9 (1,52 g). A progênie 9 apresentou a menor produção de massa fresca não diferindo estatisticamente apenas ( $p=0,05$ ) da progênie 5. A superioridade de produção de massa fresca encontrada na progênie 7 correspondeu 37,65% com relação à menor produção de massa fresca. Correia et al. (1995) multiplicando brotações de cinco clones híbridos de *Eucalyptus*, também observaram variação nas produções de massa fresca entre os clones.

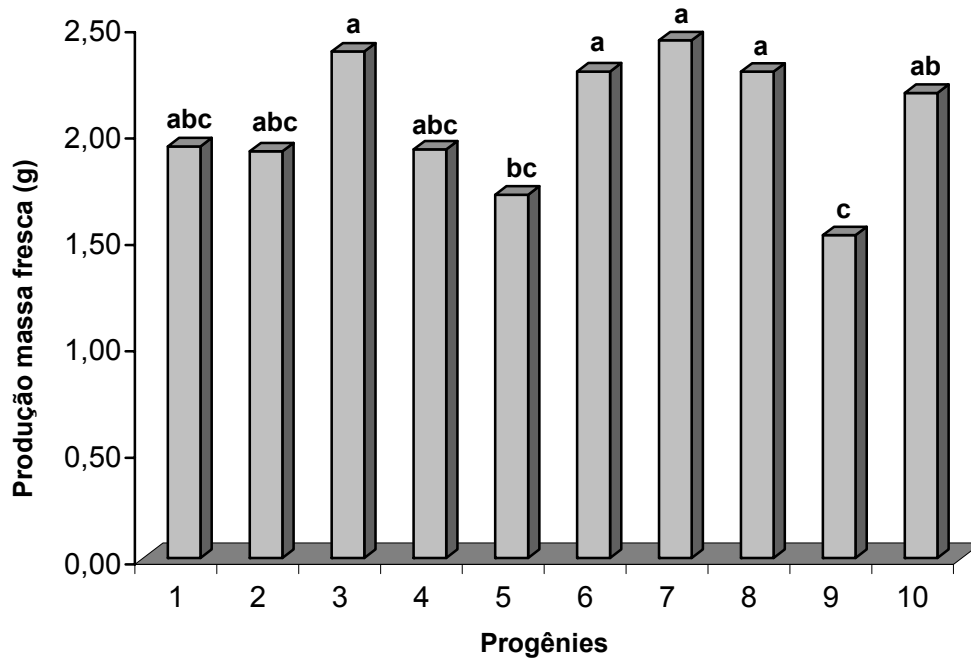


Figura 3 – Médias da produção de massa fresca de brotações de dez progênies de *Eucalyptus grandis* na fase de multiplicação em meio de cultura JADS  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA aos 63 dias de cultivo. Letras iguais não apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Na Figura 4, observa-se que a maior produção de massa seca corresponde à progênie 7 (0,18 g), não sendo significativa ( $p=0,05$ ) em relação à progênie 3 (0,1584 g), progênie 6 (0,1626 g) e progênie 8 (0,1691 g). A menor produção de massa seca foi encontrada na progênie 9 (0,1287 g), diferenciando apenas das médias das progênies



6, 7 e 8 ( $p=0,05$ ). A superioridade de produção de massa seca encontrada na progênie correspondeu a 29,4% com relação à menor produção de massa seca. Nos estudos conduzidos por Correia et al. (1995), Higashi (1996) e Lima (2004) foram observadas, na fase de multiplicação de brotações, diferenças significativas na produção de massa seca entre clones híbridos de *Eucalyptus*.

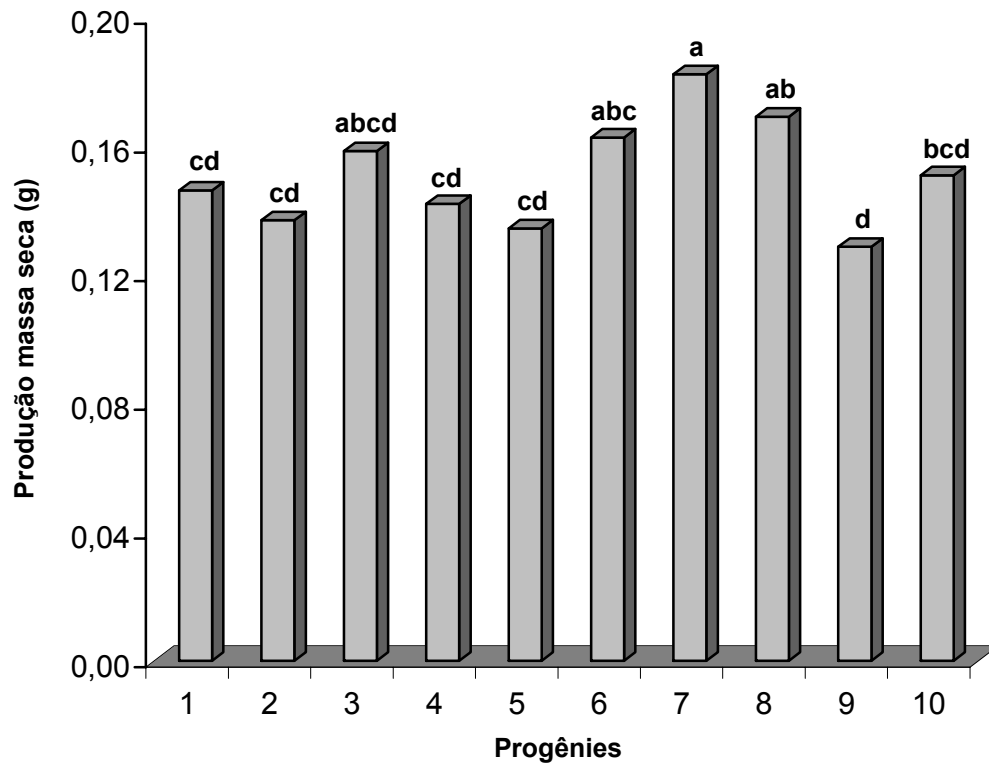


Figura 4 – Médias da produção de massa seca de brotações de dez progênies de *Eucalyptus grandis* na fase de multiplicação em meio de cultura JADS suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA aos 63 dias de cultivo. Letras iguais não apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

### 2.9.1.1 Observações visuais

O que se busca na melhoria do cultivo *in vitro* são os ganhos de biomassa e qualidade da cultura, que contribuam para aumentar o rendimento nas fases de multiplicação e alongamento das brotações (CORREIA et al., 1995; RAMAGE; WILLIAMS, 2003). Essa melhoria no processo pode favorecer o aumento do

enraizamento de brotações *in vitro* ou *in vivo*, por meio de miniestaquia ou microestaquia, e no índice de mudas de qualidade (XAVIER et al., 2001).

Ao observar as progênies, foi possível notar diferenças nas suas respostas morfogênicas (Tabela 2).

Tabela 2 – Características dos explantes observadas visualmente relativas ao crescimento, textura do tecido vegetal e vigor das brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* na fase de multiplicação aos 63 dias de cultivo

Progênies*	Crescimento das brotações	Textura do tecido vegetal e vigor
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aglomerado homogêneo, compacto, uniforme</li> <li>•Crescimento médio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Maciez reduzida</li> <li>•Vigor: ruim</li> </ul>
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aglomerado heterogêneo, menos compacto, uniforme</li> <li>•Crescimento médio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Macia</li> <li>•Vigor: regular</li> </ul>
3	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme</li> <li>•Crescimento médio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Macia</li> <li>•Vigor: bom</li> </ul>
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aglomerado heterogêneo, compacto, uniforme</li> <li>•Crescimento médio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Macia</li> <li>•Vigor: bom</li> </ul>
5	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme</li> <li>•Crescimento médio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Macia</li> <li>•Vigor: bom</li> </ul>
6	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aglomerado homogêneo, menos compacto, uniforme</li> <li>•Crescimento intenso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Maciez reduzida</li> <li>•Vigor: regular</li> </ul>
7	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aglomerado heterogêneo, compacto, desuniforme</li> <li>•Crescimento reduzido</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Macia</li> <li>•Vigor: regular</li> </ul>
8	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aglomerado heterogêneo, menos compacto, desuniforme</li> <li>•Crescimento médio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Macia</li> <li>•Vigor: regular</li> </ul>
9	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aglomerado homogêneo, compacto, uniforme</li> <li>•Crescimento médio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Maciez reduzida</li> <li>•Vigor: ruim</li> </ul>
10	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Aglomerado homogêneo, altamente compacto, uniforme</li> <li>•Crescimento reduzido</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Maciez reduzida</li> <li>•Vigor: ruim</li> </ul>

\* as ilustrações das progênies encontram-se na Figura 5

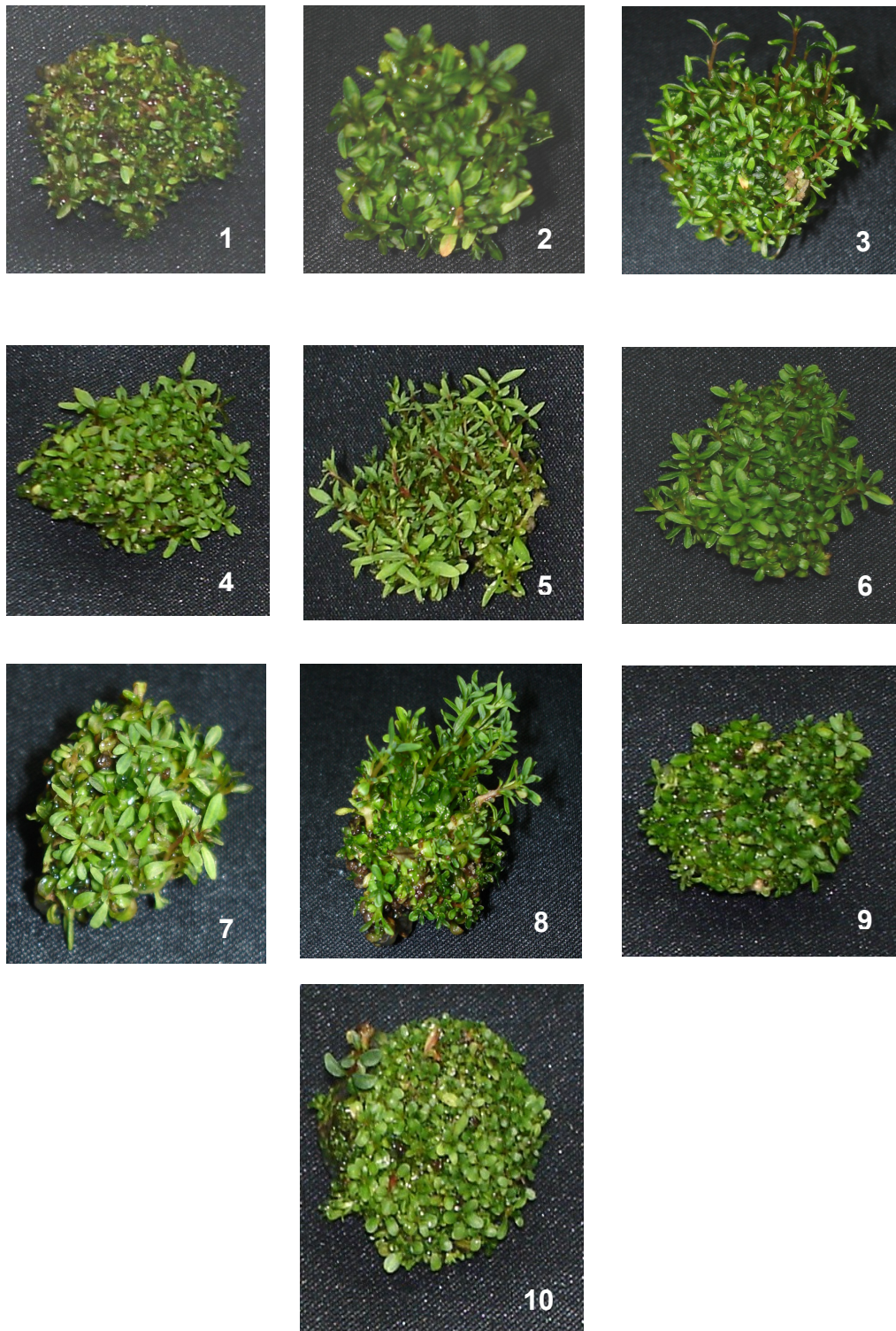


Figura 5 – Características de crescimento das brotações na fase de multiplicação em meio de cultura JADS suplementados com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA em diferentes progênies. Os números indicados na figura correspondem ao número das progênies

Além da especificidade hormonal e nutricional do meio de cultura para a espécie, progênie e/ou clone, fatores ambientais como: aeração no meio de cultura e controle de seu fluxo, o termoperíodo, a qualidade e intensidade de luz e fotoperíodo podem estar influenciando o crescimento e desenvolvimento das brotações (CORREIA et al., 1995; WILLIAMS, 1995; RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

### 2.9.2 Alongamento

Na Tabela 3, pode-se observar que a produção de massa fresca não apresentou diferença significativa enquanto a produção de massa seca ( $p < 0,05$ ) e número de brotações ( $p < 0,01$ ) foram significativos pelo teste F durante a fase de alongamento das brotações.

Tabela 3 - Resumo das análises de variância para produção de massa fresca, produção de massa seca e número de brotações de 10 progênies de *Eucalyptus grandis* na fase de alongamento das brotações

Fontes de variação	G L	Quadrados médios		
		Produção massa fresca	Produção massa seca	Número de brotações
Progênies	9	0,2978	0,0028	4112,0555
Resíduo	40	0,1662	0,0013	513,4500
F		1,79 <sup>ns</sup>	2,13 <sup>*</sup>	8,01 <sup>**</sup>
CV (%)		18,45	19,09	23,63
Média geral		2,2094 g	0,1896 g	95,90

<sup>ns</sup> não significativo pelo teste F; <sup>\*\*</sup> significativo pelo teste F,  $p < 0,01$ ; <sup>\*</sup> significativo pelo teste F,  $p < 0,05$ ;

A produção de massa seca na fase de alongamento apresentou pouca variação entre as progênies. Houve diferença estatística ( $p = 0,05$ ) apenas entre a maior média para a produção de massa seca obtida na progênie 7 (0,22 g), e a menor média alcançada na progênie 2 (0,14 g), representando 36,6% a mais de produção de massa seca na progênie 7 com relação a menor média (Figura 6).

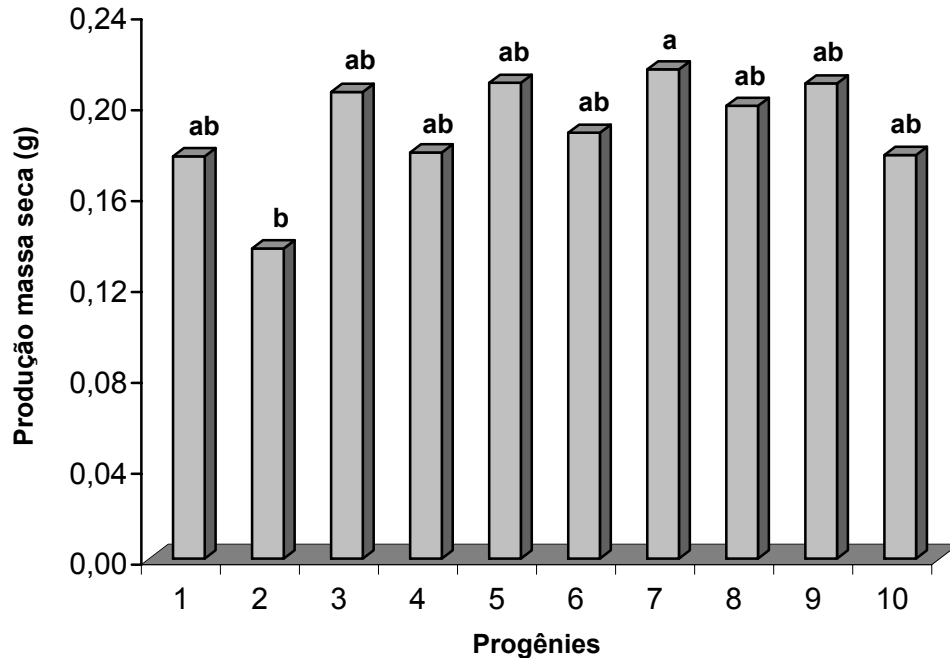


Figura 6 - Médias da produção de massa seca de brotações de dez progênies de *Eucalyptus grandis* na fase de alongamento em meio de cultura JADS suplementado com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP aos 63 dias de cultivo. Letras iguais não apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

A progênie 2 mostra-se sensível à redução de BAP na fase de alongamento tanto na condução do experimento de brotações como das brotações individualizadas sugerindo que esta progênie apresente características genéticas que favorecem menor produção de massa seca ou que a mesma tenha exigências nutricionais diferenciadas das demais progênies e o meio de cultura utilizado esteja limitando o crescimento das brotações. Parfitt e Almehdi (1986) observaram que em alguns cultivares de pêssigo podem ocorrer biossíntese diferencial de hormônios endógenos e/ou eficiência diferencial na absorção e metabolização dos compostos presentes no meio de cultura.

Sabe-se que a constituição basal do meio de cultura, o tipo e a concentração dos reguladores de crescimento são fatores determinantes para a obtenção de altas taxas de multiplicação *in vitro* entre diferentes genótipos (ARENA; CASO, 1992; PÉREZ-TORNERO; BURGOS, 2000; PÉREZ-TORNERO et al., 2000).

A maneira complexa com que os reguladores de crescimento e as células se interagem indica que, se o tecido não está em um estágio responsivo, ele não irá

responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações esses reguladores são utilizados. A ausência na resposta a um regulador de crescimento é freqüentemente um problema maior quando explantes de plantas adultas são utilizados, em comparação com material juvenil (BONGA; VON ADERKAS, 1992).

A maior média para número de brotações foi encontrada na progênie 6 (153 brotações), a qual não diferenciou estatisticamente ( $p=0,05$ ) das demais progênies, exceto para as progênies 7 (70 brotações) e 10 (67 brotações). A maior média observada na progênie 6 corresponde a 43,92% a mais do número de brotações quando comparado ao menor valor obtido na progênie 10 (67 brotações) (Figura 7).

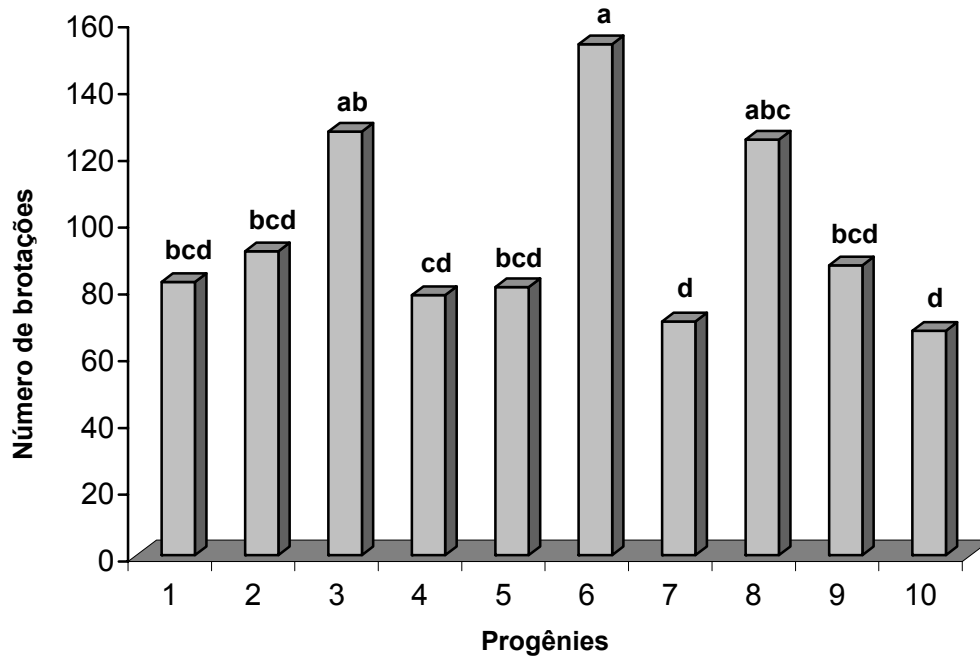


Figura 7 - Médias do número de brotações de dez progênies de *Eucalyptus grandis* na fase de alongamento em meio de cultura JADS suplementado com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP aos 63 dias de cultivo. Letras iguais não apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Ponte et al. (2001), cultivando *Eucalyptus globulus* oriundos de sementes em meio de cultura MS com BAP ( $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) também observaram diferenças significativas para número de brotações por explante quando comparado às culturas mantidas em meios de cultura suplementados com níveis mais elevados de BAP.

Verifica-se na Tabela 4 que a análise de variância apresentou diferença significativa pelo teste F ( $p < 0,05$ ) para a altura das brotações.

Tabela 4 - Resumo das análises de variância para altura das brotações de 10 progênies de *Eucalyptus grandis* na fase de alongamento de brotações individualizadas

Fontes de variação	G L	Quadrados médios
		Altura das brotações
Progênies	9	0,6156
Resíduo	90	0,2931
F		2,10 *
CV (%)		36,68
Média geral (cm)		1,48

\* significativo pelo teste F,  $p < 0,05$

No teste de comparações de médias (Tukey  $p=0,05$ ), nota-se que houve diferença apenas entre a progênie 5 (2,06 cm) e a progênie 2 (1,19 cm). A progênie 5 destacou-se por apresentar 42,23% de brotações com maiores alturas com relação a progênie 2 (Figura 8).

Adicionalmente, a progênie 5 apresentou a maior porcentagem de brotações enraizadas (48,0%) como pode ser visto na Figura 9. As progênies 7 (47,3%) e 10 (32,0%) também se destacaram entre as demais para o enraizamento.

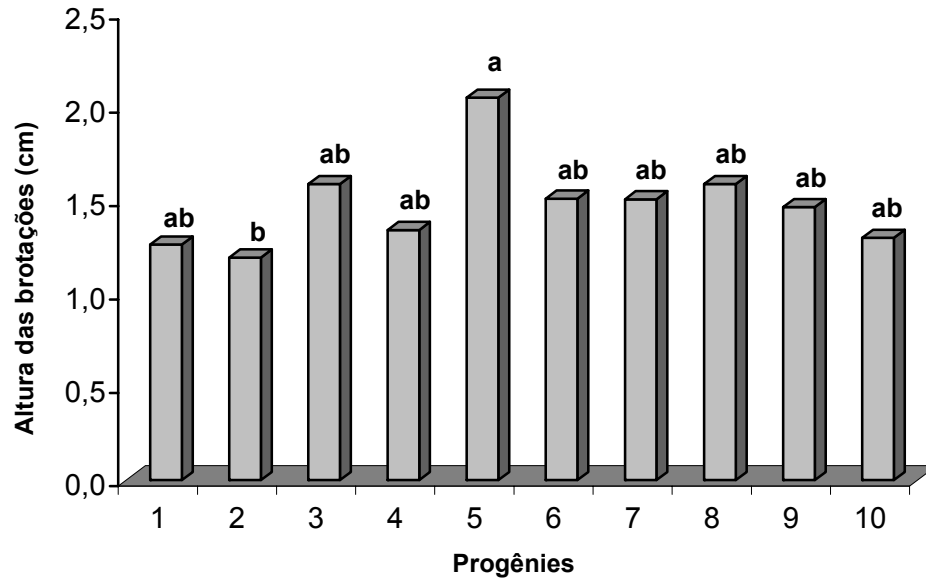


Figura 8 - Médias da altura de brotações de dez progênie de *Eucalyptus grandis* na fase de alongamento em meio de cultura JADS aos 21 dias de cultivo. Letras iguais não apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

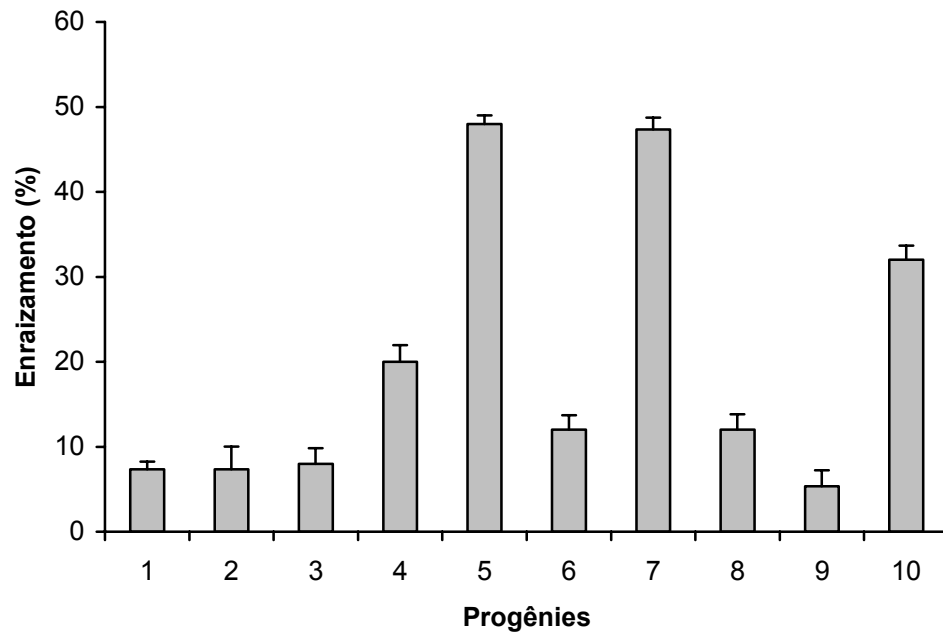


Figura 9 - Porcentagem de enraizamento de dez progênie de *Eucalyptus grandis* na fase de alongamento em meio de cultura JADS com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP aos 21 dias de cultivo. As barras são os intervalos de confiança para a média a 95%



O maior enraizamento e altura das brotações observados na progênie 5, que coincide com a maior altura da parte aérea das brotações individualizadas sugere que a relação auxina/citocinina, favorável à auxina, tenha contribuído para esta resposta. Estudos mostram que o modo de interação entre auxinas e citocininas é freqüentemente dependente da espécie da planta e do tipo de tecido utilizado na cultura (COENEN e LOMAX, 1997; PIERIK, 1997).

Dentre as substâncias reguladoras de crescimento, as auxinas exógenas têm participação fundamental no processo da rizogênese, principalmente nas espécies lenhosas que possuem dificuldades para enraizarem (GASPAR; HOFINGER, 1988). Para Grattapaglia e Machado (1998) esta dificuldade é maior quando comparada com as espécies herbáceas, e, esta dificuldade aumenta quando se utiliza material menos juvenil (HU; WANG, 1983).

### **2.9.2.1 Observações Visuais**

Ao observar as progênies, foi possível notar diferenças nas suas respostas morfogênicas (Tabela 5).

A altura média dos brotos apresentou diferenças visuais significativas em resposta à redução do BAP, como observaram Rogalski et al. (2003) na multiplicação *in vitro* da ameixeira 'santa rosa', evidenciando que há uma correlação negativa entre a altura dos brotos e a concentração de BAP, ou seja, o aumento nos níveis de BAP reduziram o crescimento dos brotos. A altura média dos brotos é uma variável determinada principalmente pela concentração e tipo do regulador de crescimento (HARADA; MURAI, 1996; LEONTIEV-ORLOV et al., 2000), meios de cultura (ARENA; CASO, 1992; PÉREZ-TORNERO; BURGOS, 2000; PÉREZ-TORNERO et al., 2000) e genótipo (ARENA; CASO, 1992; PÉREZ-TORNERO; BURGOS, 2000). A variável altura das brotações é de grande importância para a próxima fase da micropropagação, o enraizamento *in vitro* e também dependente do genótipo da espécie (SILVA et al., 2003).

A ausência de raízes secundárias, também observada por Rogalski et al. (2003), pode estar relacionado com a utilização da agar como agente geleificante. Leite (1995)

verificou que o enraizamento de pereira (*Pyrus communis* L.) foi mais eficaz na presença de vermiculita do que em agar.

Para Debergh e Maene (1981), é difícil induzir sistema radicular eficiente *in vitro*, devido, justamente, à falta de pêlos absorventes e sugeriram que o ágar seja substituído no meio por outra fonte como substratos artificiais, entre eles a vermiculita.

Tabela 5 – Características dos explantes observadas visualmente relativas à raiz, parte aérea, textura do tecido e vigor das brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em fase de alongamento individualizado aos 21 dias de cultivo

(continua)				
Progênes	Figura	Raiz	Parte Aérea	Textura do tecido vegetal/vigor
1	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Baixa ocorrência</li> <li>•Menor média de comprimento</li> <li>•Fraca, raízes secundárias inexistentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Folhas Pequenas e amareladas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Maciez reduzida</li> <li>•Vigor: ruim</li> </ul>
2	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Baixa ocorrência</li> <li>•Médio comprimento</li> <li>•Bom aspecto, poucas raízes secundárias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Baixo crescimento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Macia</li> <li>•Vigor: regular</li> </ul>
3	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Baixa ocorrência</li> <li>•Baixo comprimento</li> <li>•Bom aspecto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Pequenas e médias</li> <li>•Presença de lâminas foliares encurvadas para cima</li> <li>•Alta presença de calosidade branco-amarelada, friável</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maciez reduzida</li> <li>•Vigor: regular</li> </ul>
4	10	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Média ocorrência</li> <li>•Médio comprimento</li> <li>•Bom aspecto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Grandes</li> <li>•Calosidade friável ao longo das extensões da haste</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Macia</li> <li>•Vigor: bom</li> </ul>
5	11	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Maior ocorrência</li> <li>•Médio comprimento</li> <li>•Bom aspecto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Médias e grandes</li> <li>•Ausência de calosidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Macia</li> <li>•Vigor: bom</li> </ul>
6	11	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Baixa ocorrência</li> <li>•Alto comprimento</li> <li>•Fraco, raízes finas e frágeis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Pequenas e médias</li> <li>•Lâminas foliares tortuosas</li> <li>•Calosidade pouco friável presente na parte inferior da folha</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Maciez reduzida</li> <li>•Vigor: regular</li> <li>•Folhas quebradiças</li> </ul>
7	11	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Alta ocorrência</li> <li>•Médio comprimento</li> <li>•Bom aspecto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Médias e grandes</li> <li>•Caule avermelhado característico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Macia</li> <li>•Vigor: bom</li> </ul>

Tabela 5 – Características dos explantes observadas visualmente relativas à raiz, parte aérea, textura do tecido e vigor das brotações de *Eucalyptus grandis* cultivadas *in vitro* em fase de alongamento individualizado aos 21 dias de cultivo

(conclusão)				
8	11 e 12	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Baixa ocorrência</li> <li>•Médio comprimento</li> <li>•Fraca, raízes secundárias inexistentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Pequenas e grandes</li> <li>• Base bem oxidada</li> <li>• Ausência de calosidade</li> <li>• Aglomerado de brotações na base</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Macia</li> <li>•Vigor: bom</li> </ul>
9	11 e 12	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Menor ocorrência</li> <li>•Maior média de comprimento</li> <li>•Bom desenvolvimento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Pequenas e grandes</li> <li>• Baixa incidência de calosidade nas folhas</li> <li>•Calosidade amarelada, friável</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Macia</li> <li>•Vigor:bom</li> </ul>
10	12	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Média ocorrência</li> <li>•Médio comprimento</li> <li>•Boa, poucas raízes secundárias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Médias e grandes</li> <li>• Presença concentrada de calosidade na base da haste</li> <li>• Calosidade no terço superior</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Macia</li> <li>•Vigor: bom</li> </ul>



Figura 10 – Características de crescimento das brotações individualizadas na fase de alongamento em meio de cultura JADS com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP em diferentes progênies. Os números indicados na figura correspondem ao número das progênies



Figura 11 – Características de crescimento das brotações individualizadas na fase de alongamento em meio de cultura JADS com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP em diferentes progênies. Os números indicados na figura correspondem ao número das progênies

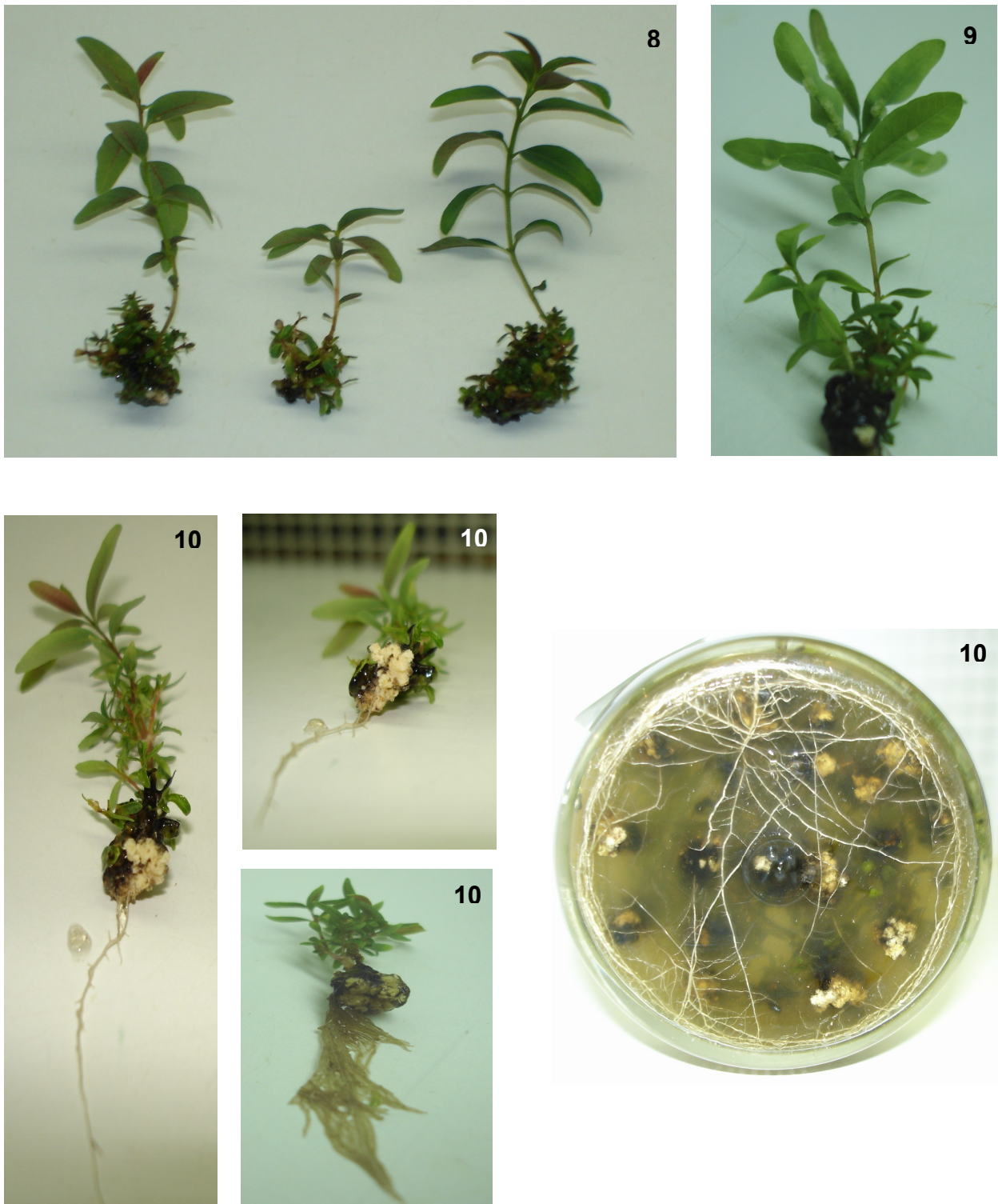


Figura 12 – Características de crescimento das brotações na fase de alongamento individualizado em meio de cultura JADS com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP em diferentes progênies. Os números indicados na figura correspondem ao número das progênies

### **3 CONCLUSÃO**

Existiram respostas diferenciadas das progênies.

Algumas progênies mostraram potencial diferenciado para a produção de massa fresca e seca e outras se destacaram no alongamento e enraizamento *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A.A.; GRACE, J.; YEOMAN, M.M. Rooting and establishment of Calabrian pine plantlets propagated *in vitro*: influence of growth substances, rooting medium and origin of explant. **New Phytologist**, New York, v. 113, n. 2, p. 193-202. 1989.
- AITKEN-CHRISTIE, J.; KOSAI, T.; TAKAYAMA, S. Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. In: AITKEN-CHRISTIE, J., T. KOZAI, M.A.L. SMITH (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 1-18.
- ARENA, M.E.; CASO, O.H. Factores que afectan la multiplicación *invitro* de los brotes de portainjertos de *Prunus* **PHYTON**, Buenos Aires, v.53, p.29-38, 1992.
- AZMI A.; NOIN M.; LANDRÉ P.; PROUTEAU M.; BOUDET A.M.; CHIRQUI D. High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulos* Labill. hypocotails: ontogenesis and level of the regenerants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 51, n. 1, p. 9-16., Jan. 1997.
- BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology of tree improvement for rapid propagation and biomass energy production. In: BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. 1986, Springer Verlag, Berlin. **Anais...** Springer Verlag, Berlin: Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1986. v. 1 , p. 49-64.
- BANDYOPADHYAY, S.; CANE, K.; RASMUSEN, G.; HAMILL, J.D. Efficient plant regeneration from seedlings explants of two commercially important temperate eucalypt species – *E. nitens* and *E. globulus*. **Plant Science**, Washington, v. 140, n. 2, p. 189-198, Jan. 1999.
- BASSO, L.H.M.; GONÇALVES, A.N.; SILVEIRA, L.V.A.; LIMA, G.P.P. Efeito do alumínio no crescimento de brotações de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 63, p. 167-77, jun., 2003.
- BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas (noções básicas)**. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42 p.
- BENNET, I.J.; McCOMB, J.A.; TONKIN, C.M.; McDAVID, D.A.I. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. **Annals of Botany**, Oxford, v. 74, p. 53-58, 1994.
- BISHT, P.; JOSHI, I.; CHAUHAN, J.M.S.; SHARMA, V. K. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* DEHN. *Eucalyptus tereticornis* Sm. x). **Indian Journal of Forestry**, India, v. 23, n. 2, p. 28-32, 2000.



BONGA, J.M.; von ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236 p.

BOX , G.E.P.; COX, D.R. "An analysis of transformation" (With discussion), **Journal of the Royal Statistical Society (B)**, Bristol, v.26, n.2, p.211-252, 1964.

BURGER, D.W. *In vitro* micropropagation of *Eucalyptus sederoxylon*. **Hortscience**, Alexandria, v. 22, n. 3, p. 496-497, June 1987.

CARVALHO, D. de. **Micropropagação de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, através da cultura *in vitro* de segmentos nodais**. 1988. 79 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Lavras, MG, 1988.

CHEN, Z.Z.; TSAY, J.Y.; CHUNG, J.D. Callus culture of *Eucalyptus grandis* x *urophylla* and preliminary studies on organogênese and *Agrobacterium*-mediated transformation. **Taiwan Journal Forestry Science**, Taiwan, v.11, n.1, p. 43-52, 1996.

COENEN, C.; LOMAX, T.L. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. **Trends in Plant Science**, Germany, v.2, n.9, p. 351-356, 1997.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.T.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, Piracicaba, v. 48/49, p. 107-116, 1995.

DEBERGH, P.C. Acclimatization Techniques of Plants from *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Holanda, n. 289, p. 291-300, 1991.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. Amscheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 14, p. 335-345, 1981.

DEBERGH, P.C.; READ, P.E. **Micropropagation**. In: DEBERGH, P.C; ZIMMERMANN, P.C. (ED.s) *Micropropagation – Technology and application*. Kluwer: Academic Puyblshers,1990. p. 1-13.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C.; VAN WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. New York: Oxford University Press, 1994. 288 p.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2<sup>nd</sup> ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. 400 p.

EVANS, M.L. The Action of auxin on plant cell elongation. **CRC Critical Reviews in Plant Science**, Whashington, v. 2, n.4, p. 317-365, 1985.

EYRE, F. H. **Forest cover types of the United States and Canada**. Washington, DC: Society of American Foresters, 1980. 148 p.

FAO. **El eucalipto en la repoblación forestal**. Roma, 1981. 747 p.

FRANCLET, A.; BOULAY, M. Micropropagation of frost resistant Eucalypts clones.

**Australian Forestry Research**, Camberra, v. 13, n. 1, p. 83-89., Mar. 1982.

FURZE, M.J.; CRESSWELL, C.F. Micropropagation of *Eucalyptus grandis* and *E. nitens* using tissue culture techniques. **South African Forestry Journal**, South Africa, v. 135, n. 12, p. 20-23, 1985.

GASPAR, T.; HOFINGER, M. Auxin metabolism during adventitious rooting. In: DAVIS, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**.

Portlant: Discorides, 1988. p. 117-131.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.

GONÇALVES, A.N. **Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophilla* S.**

**T. Blake in vitro**. 1982. 97 p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Escola

Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1982.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L.S. (Ed.) **Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas**. Brasília:

EMBRAPA, CNPH, 1990. p. 99-169.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**.

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

GRATTAPAGLIA, D.; ASSIS, T.F.; CALDAS, L.S. Efeito residual de BAP (6-benzilaminopurina) e NAA (ácido naftalenoacético) na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2, 1987, Brasília. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 1987. p. 8.

HARADA, H.; MURAI, Y. Micropropagation of *Prunus mume* **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.46, p.265-267, 1996.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E. **Propagación de plantas-Principios y praticas**.

México: Continental, 1990. 760 p.

HIGASHI, E.N. **Diagnose da eficiência de nutrientes minerais em três híbridos de *Eucalyptus* spp. Cultivados in vitro**. 1996. 90 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, L.V. de A.; GONÇALVES, A.N. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil.** Piracicaba: IPEF, 2000. 11 p. (Circular Técnica do IPEF, 192)

HO, C.K.; CHANG, S.H.; TSAY, J.Y.; TSAI, C.J.; CHIANG, V.L.; CHEN, Z.Z. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.17, p. 675–680, 1998.

HU, C.Y.; WANG, P. J. Meristem shoot tip and bud culture. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell cultures.** New York: Macmillan, 1983. v. 1, p. 177-227.

JONES, N.B.; VAN STADEN, J. Micropropagation of *Eucalyptus*.. In: Y.P.S. BAJAJ (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**, Vol. 39, 1997, Springer Verlag, Berlin: High-tech and micropropagation V, 1997, p. 286-330.

JOSHI, I.; BISHT, P; SHARMA, V.K.; UNIYAL, D.P. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. x *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v.52, n.3/4, p. 110-113, 2003.

KRIEKEN, W.M.; BRETELER, H.; VISSER, M.H.M. Indolebutyric acid - induced root formation in apple tissue culture. Design for an experimental system, auxin metabolism and isolation of cDNA clones related to root initiation. **Acta Horticulturae**, Switzerland, n.289, p. 343–344, Apr. 1991.

LAINÉ, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 13, p. 473–476, 1994.

LEITE, G. B. **Efeito de reguladores de crescimento, substrato, sacarose e intensidade luminosa na micropropagação de pereira (*Pyrus communis* L.) cv. Bartlett e do clone OHxF97.** 1995. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fruticultura) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 1995.

LEONTIEV-ORLOV, O.; ROGALSKI, M.; MOSSI, A.J.; CANSIAN, R.L. 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus* sp.), **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.6, p.63-67, 2000.

LIMA, M.L. **Respostas de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* a dose de potássio *in vitro*.** 2004. 73 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

LANGER, M. **Estudos e análises dos efeitos do cálcio sobre o crescimento inicial do híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis in vitro*.** 2000. 101 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

MACHNIK, B.; ORLIKOWSKA, T. *In vitro* propagation of P22 Malus clonal rootstock. **Fruticulture Science Report**, Barcelona, v. 8, n. 4, p. 173-177, 1981.

MARCAR, N.E.; CRAWFORD, D.F.; SAUNDERS, A. Genetic variation among and within provenances and families of *Eucalyptus grandis* W. Hill and *Eucalyptus globulus* Labill subspecies *globulus* seedlings in response to salinity and waterlogging. **Forest Ecology and Management**, Kingston, v.162, n.5, p.231-249, 2002.

McCOMB, J.A.; BENNETT, I.J. *Eucalyptus* (*Eucalyptus* spp.). In: Y.P.S. BAJAJ (Ed.). **Biotechnology in agriculture and forestry**, Berlin: Trees 1, 1986. v. 1, p. 340-362.

MORA, A.L.; GARCIA, C.H. **A cultura do Eucalipto no Brasil**. São Paulo: SBS, 2000. 112 p.

MULLINS, K.V.; LLEWELLYN, D.J.; HARTNEY, V.J.; STRAUSS, S; DENNIS, S.E. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 787-791, 1997.

NICCOL, R.J.; REGAN, P.A.; DE FILIPPIS, L.F. Simplified protocol for the micropropagation of selected *Eucalyptus* and *Banksia* species. **Australian Forestry**, Melbourne, v. 57, n. 4, p. 143-147, 1994.

PARFITT, D.E.; ALMEHDI, A.A. *In vitro* propagation of peach: II. A medium for *in vitro* multiplication of 56 peach cultivars, **Fruit Varieties Journal**, Netherlands, v.40, n.2, p.46-47, 1986.

PEREZ, L.E.P.; KERBAUY, G.B. Citocininas. In: KERBAUY, G.B. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 250-278.

PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.63, p.133-141, 2000.

PÉREZ-TORNERO, O.; LÓPEZ, J.M.; EGEA, J.; BURGOS, L. Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.) cv. Canino, **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Ashford, v. 75, n.3, p.283-286, 2000.

PIERIK, R.L.M. ***In vitro* culture of higher plants**. 4<sup>th</sup> ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997. 348 p.

PONTE, E.M. Del ; MATTEI, V.L.; PETERS, J. A. ; ASSIS, T. F. . Multiplicação e Enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subesp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2001.

RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. ***In Vitro Cellular and Development Biology***, Oxon, v. 38, p. 115-124, 2002.

- RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral uptake in tobacco leaf discs during different development stages of shoot organogenesis. **Plant Cell Reports**, New York, v. 21, p. 1047-1053, 2003.
- ROGALSKI, M.; GUERRA, P.M.; SILVA, A.L. Multiplicação *in vitro* da ameixeira 'santa rosa': efeito da citocinina BAP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 25, n. 2, p. 365-367, 2003. SANKARA-RAO, K. *In vitro* meristem cloning of *Eucalyptus tereticornis* Sm. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 7, p. 546-549, 1988.
- SANKARA-RAO, K.; VENKATESWARA, R. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Eucalyptus grandis* L. **Plant Science**, Tamilnadu, v.40, n.1, p. 51-55, 1985.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT<sup>®</sup> user guide: version 6.08. Carrey, 1997. v. 2, 846 p.
- SASSE, J. Problems with propagation of *Eucalyptus globulus* by stem cuttings. In: IUFRO-CRC FOR TEMPERATE HARDWOOD FORESTRY, 1995. **Proceedings...** Hobart, Australia: CRCTHF-IUFRO Conference 1995. p. 319-320.
- SHARMA, S.K. & RAMAMURTHY, U. Micropropagation of 4 years old elite *Eucalyptus tereticornis*. **Trees. Plant Cell Reports**, New Delhi, v. 19, n.5, p.511-518, 2000.
- SILVA, A.L.; ROGALSKI, M.; MORAES, L.A. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 25, n. 2, p.297-300, 2003
- SILVA, A.T.; PASQUAL, M.; ISHIDA, J.S; ANTUNES, L.E.C. Aclimação de plantas provenientes da cultura *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 49-53, 1995.
- SITA, G.L.; RANI, B.S. *In vitro* propagation of *Eucalyptus grandis* L. by tissue culture. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 4, n. 2, p. 63-65, 1985.
- SOBROSA, R.C.; CORDER, M.P.M. Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas e raízes adventícias em *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden *in vitro*. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 58-68, 2003.
- SUBBAIAH, M.M.; MINOCHA, S.C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 9, n. 7, p. 370-373, 1990.
- TANG, W.; OUYANG, F. Plant regeneration via organogenesis from six families of loblolly pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.58, n.3, p.223-226, 1999.

- TEO, C.K.H.; CHAN, L.K. The effects of agar content, nutrient concentration, genotype and light intensity on the *in vitro* rooting of papaya microcuttings. **Journal of Horticultural Science**, Nigeria, v. 69, n. 2, p. 267-273, 1994.
- TIBOK, A.; BLACKHALL, N.W.; POWER, J.B.; DAVEY, M.R. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. **Plant Science**, Washington, v. 110, n. 1, p. 139-145, 1995.
- TOTH, V.D.R.; VIEIRA, J.D.; GONCALVES, A.N. Effect of the interaction auxin and sterbids in the elongation and rooting of hibrid clones of *Eucalyptus in vitro*. In: Encontro brasileiro de biotecnologia vegetal, 1993, Brasília: **Anais**, 1993. p. 110-103.
- TRAVERS, J.N.; STARBUCK, C.J.; NATARELLA, N.J. Effects of culture medium on *in vitro* rooting of Antonovka 313 apple. **HortScience**, Alexandria, v. 20, n. 6, p. 1051-1052, Dec. 1985.
- TRINDADE, H.; FERREIRA, J.G.; PAIS, M.S.; ALONI, R. The role of cytokinin and auxin in rapid multiplication of shoots of *Eucalyptus globulus* grown *in vitro*. **Australian Forestry**, Melbourne, v. 53, n. 3, p. 221-223, 1990.
- VERA BRAVO, C.D. **Controle genético e histogênese da regeneração de progênies de *Eucalyptus grandis in vitro***. 2005. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- VIETEZ, A.M.; SANCHEZ, C.; SAN-JOSE, C. Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 41, n. 1/2, p. 151-159, 1989.
- WILLIAMS, R.R. The chemical micro-environment. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M.A.L. (Ed.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 405-439.
- XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.
- XAVIER, A.; ANDRADE, H.B.; OLIVEIRA, M.L.; WENDLING, I. Desempenho do enraizamento de microestaquias e miniestaquias de clones de híbridos de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 25, n. 4, p. 403-411, 2001.
- ZIMMERMANN, R.H.; BROOME, O.C. Phoroglucinol and *in vitro* rooting of the apple cultivar cuttings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 5, p. 648-652, 1981.