

Avaliação do desenvolvimento de brotações de dez progênies de Eucalipto *in vitro*Development Evaluation of the shoots of ten *Eucalyptus* progenies *in vitro*Ângela Simone Freitag Lima<sup>1</sup>, Antônio Natal Gonçalves<sup>2</sup> e Daruska Cavalcante Cardim<sup>3</sup>**Resumo**

Este estudo teve como objetivo avaliar o desenvolvimento e qualidade de dez progênies de *Eucalyptus grandis* quanto à produção de massa fresca e seca e o número de brotos *in vitro*, durante as fases de multiplicação e alongamento. As brotações foram multiplicadas e alongadas em frascos com capacidade volumétrica de 220 mL, contendo 40 mL de meio de cultura JADS, suplementado com reguladores de crescimento. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com 10 tratamentos, com 13 e 5 repetições para fase de multiplicação e alongamento, respectivamente. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco contendo 40 mL de meio de cultura e 4 explantes (aglomerados de brotações) com aproximadamente 1,0 cm de diâmetro cada. Após 63 dias foram avaliadas, na fase de multiplicação, a produção de massa fresca e seca e na fase de alongamento, o número de brotações de cada unidade experimental. Dentre as 10 progênies de *Eucalyptus grandis* estudadas, as progênie 3, 6, 7 e 8 obtiveram bom desenvolvimento, se destacando para os trabalhos *in vitro*, para diferentes fins. a progênie 7 requer adição de AIA junto ao meio de cultura para fins de emissão de maior numero de brotações.

**Palavras-chave:** crescimento; multiplicação; alongamento; meio de cultura.

**Abstract**

This study aimed to evaluate the development and quality of ten progenies of *Eucalyptus grandis* for fresh and dry mass production and the number of shoots *in vitro* throughout the period of multiplication and elongation. The elongated shoots were grown in flasks and volumetric capacity of 220 ml, containing 40 ml of JADS culture medium supplemented with growth regulators. The experimental design for the analysis of multiplication was completely randomized with 10 treatments (10 progenies) and 13 repetitions, totaling 130 experimental units and for assessing elongation 10 treatments and 5 replications, totaling 50 experimental units. Each experimental unit consisted of a flask containing 40 ml of culture medium and 4 explants (shoot clusters) approximately of 1.0 cm diameter. After 63 days in the multiplication phase, the production of fresh and dry weight of each experimental unit, and the elongation phase, the number of shoots of each experimental unit, and the data obtained by explant were evaluated. Among the 10 progenies of *Eucalyptus grandis* studied, only 3, 6, 7 and 8 progenies had a good development, especially for *in vitro* work, for different purposes. The progeny 7 requires addition of AIA by the culture medium in order to produce a larger number of shoots.

**Keywords:** growth; multiplication; elongation; culture media.

**INTRODUÇÃO**

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 (FAO, 1981). Possui qualidades excelentes, superando qualquer outra espécie arbórea em relação ao incremento, quando as condições ambientais são adequadas, sendo esta a causa de sua grande aceitação. Dentre suas várias características está o hábito de desramar-se espontaneamente, o que dá origem a fustes lisos com aspecto colunar (MORA; GARCIA, 2000), destacando-se para serrarias e excelente para produção de celulose.

Fatores como reduzida produção de sementes dessa espécie dificultam a produção de mudas pela via sexual. Baseados nisso, alternativamente, devem ser pesquisados métodos de propagação assexuada, entre os quais vêm se sobressaindo, nos últimos anos, a micropropagação (ALFENAS et al., 2004).

<sup>1</sup>Doutora em Ciências Florestais. USP – Universidade de São Paulo / ESALQ – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Caixa Postal 9 – 13.400-970 - Piracicaba, SP, Brasil. Email: [drangelafloresta@gmail.com](mailto:drangelafloresta@gmail.com)

<sup>2</sup>Professor Doutor do Departamento de Ciências Florestais. USP – Universidade de São Paulo / ESALQ – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Caixa Postal 9 – 13.400-970 - Piracicaba, SP, Brasil. Email: [natalgon@usp.br](mailto:natalgon@usp.br)

<sup>3</sup>Mestre em Ciências Florestais. USP – Universidade de São Paulo / ESALQ – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Caixa Postal 9 – 13.400-970 - Piracicaba, SP, Brasil.

Devido a importância do *E. grandis*, muitos estudos sobre cultivo *in vitro* com *Eucalyptus grandis* e híbridos desta espécie têm sido conduzidos devido à importância que possuem termos de produtividade e características desejáveis à indústria de papel e celulose (LIMA, 2004).

A resposta de explantes em sistema de cultivo *in vitro* depende do genótipo (SOBROSA; CORDER, 2003; GEORGE; DEBERGH, 2008), do valor nutricional do meio de cultura e sua capacidade de difusão, às condições ambientais e micro ambientais para o crescimento (SANKARA-RAO; VENKATESWARA, 1985). Ainda, segundo Carvalho et al. (2010), o crescimento ou não de uma gema é uma resposta à combinação de fatores relativos ao ambiente (ecodormência), à influência de outro órgão do vegetal (paradormência) ou a eventos bioquímicos e fisiológicos que acontecem no interior da gema (endodormência) onde atuam os reguladores de crescimento ou hormônios vegetais.

Reguladores vegetais são substâncias sintéticas que aplicadas exogenamente possuem ações similares aos grupos de hormônios vegetais conhecidos (auxinas, giberelinas, citocininas, retardadores, inibidores e etileno) (DAVIES, 2004). Os reguladores vegetais podem atuar diretamente nas diferentes estruturas celulares e nelas provocar alterações físicas, químicas e metabólicas (CASTRO; VIEIRA, 2001). Sua função é transportar informações e coordenar o desenvolvimento vegetal (HINOJOSA, 2000).

Segundo Caldas et al. (1990), a composição e concentração hormonais no meio são fatores determinantes do crescimento e do padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas da cultura de tecidos. Dentre os reguladores de crescimento, as citocininas são substâncias que estão diretamente relacionadas com a divisão celular. Entre as citocininas mais utilizadas *in vitro*, a 6-bencilaminopurina (BAP), tem se demonstrado a mais eficiente na emissão e desenvolvimento de explantes.

Existem ainda, outros fatores como tipo e tamanho do explante, frequência de subculturas e cuidados no procedimento de repicagem que, segundo Correia et al. (1995), influenciam na multiplicação de gemas *in vitro*.

Entre os processos utilizados para obtenção e produção de *in vitro*, merecem destacam-se a fase multiplicação e a fase de alongamento de explantes. A fase de multiplicação é uma etapa da micropropagação na qual o objetivo principal visa obter um maior número de brotações através de sucessivos sub-cultivos (DEBERGH; READ, 1990).

Poucos estudos foram realizados sobre a fase de alongamento de *Eucalyptus grandis*. Entretanto, esta etapa é necessária para o sucesso do cultivo *in vitro* desta espécie (CORREIA et al., 1995), pois as brotações multiplicadas sem a fase de alongamento, apresentam pequeno comprimento e poderão apresentar reduzida rizogênese, se forem diretamente cultivadas em meios de enraizamento, ou dar origem a mudas de baixa qualidade para a fase, posterior, de aclimatização (SILVA et al., 2004).

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).

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, número de brotos, entre outros), superfície (área foliar), peso e unidades estruturais.

Baseado nisso, presente trabalho tem por objetivo avaliar o desenvolvimento e qualidade de dez progênes *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden quanto a produção de massa fresca e seca e o número de brotos, na técnica de cultura *in vitro*, utilizando o meio de cultura JADS, durante as fases de multiplicação e alongamento, respectivamente.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Fisiologia das Árvores localizado no Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", campus da Universidade de São Paulo (USP), situado no Município de Piracicaba, Estado de São Paulo.

Os explantes de progênes de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden utilizados na instalação dos experimentos foram obtidos por cultura de brotações mantidas até a 14<sup>a</sup> semana de cultivo *in vitro*. Estas brotação foram originadas de hipocótilos distais de 19 plântulas de 20 dias de idade de dez progênes visando determinar a produção de massa fresca e seca.

As brotações foram multiplicadas e alongadas em frascos com capacidade volumétrica de 220 mL, contendo 40 mL de meio de cultura JADS. Nas fases de multiplicação e alongamento, o meio foi suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (benzilaminopurina) e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIA (ácido indolacético) e apenas com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, respectivamente (CORREIA et al., 1995).

Os materiais inoculados *in vitro* foram mantidos em sala de crescimento a 93 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de radiação foto sinteticamente ativa (PAR), sob fotoperíodo de 12 horas e com intervalo de iluminação das 6 às 18 h e temperatura de 25 ± 5 °C.

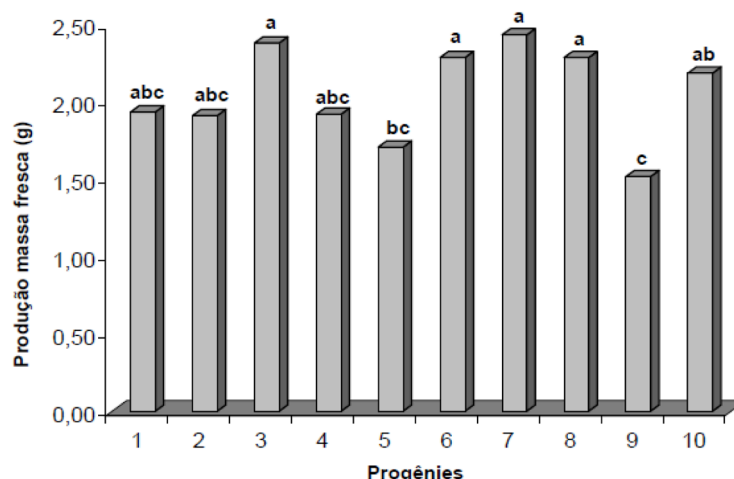
O delineamento experimental para a análise da multiplicação foi inteiramente casualizado com 10 tratamentos (10 progênies) e 13 repetições, totalizando 130 unidades experimentais e, para a avaliação de alongamento, 10 tratamentos e 5 repetições, totalizando 50 unidades experimentais. Cada unidade experimental foi constituída por um frasco contendo 40 mL de meio de cultura e 4 explantes (aglomerados de brotações) com aproximadamente 1,0 cm de diâmetro cada.

As avaliações foram realizadas aos 63 dias após introdução do material *in vitro*. Na fase de multiplicação foi avaliada a produção de massa fresca e seca de cada unidade experimental e, na fase de alongamento, o número de brotações de cada unidade experimental, sendo os dados obtidos por explante.

Os dados foram submetidos à análise de variância com auxílio do software SAS (SAS INSTITUTE, INC, 1997), adotando-se o intervalo de confiança da média ( $\alpha=0,95$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 01, são observadas as médias da produção de massa fresca de brotações das progênies de *E. grandis*, seguidas da análise estatística.



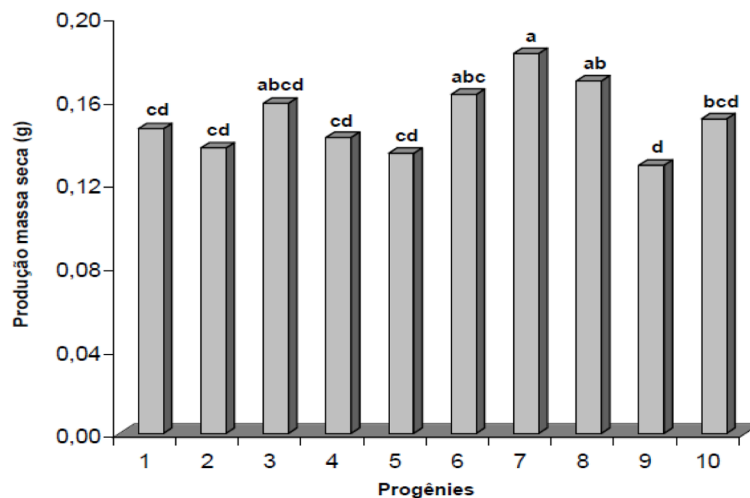
**Figura 1.** Produção de massa fresca de brotações de dez progênies de *E. grandis* na fase de multiplicação em meio de cultura JADS, aos 63 dias de cultivo. Piracicaba, 2006. Letras iguais não apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Figure 1.** Fresh mass production of shoots of ten progenies of *E. grandis* in the multiplication phase in JADS culture medium, after 63 days of cultivation. Piracicaba, 2006. Figures followed by the same letter do not differ significantly at 5% probability by the Tukey test.

Pode-se observar que houve diferença significativa entre os tratamentos. As progênies 7, seguidas das progênies 3, 6, e 8 foram estatisticamente superiores quanto a produção de massa fresca, enquanto que a progênie 9 apresentou estatisticamente, menor produção de massa fresca durante o período observado. As demais progênies, embora tenham obtido menor produção de massa fresca, não apresentaram diferença significativas entre as mais produtivas.

Dentre os tratamentos com maior produção de massa fresca, as progênies 3 e 7 apresentaram-se 37,65% maiores em produção de massa fresca em relação à progênie 9, com menor crescimento. Tais resultados, mesmo com uma estreita diferença significativas em relação aos demais genótipos testados, demonstram que há influência do genótipo na capacidade organogênica ente as progênies de uma mesma espécie Correia et al. (1995) multiplicando brotações de cinco clones híbridos de uma mesma espécie de *Eucalyptus*, também observaram variações significativas nas produções de massa fresca entre os clones.

Na Figura 02, são apresentadas as médias de produção de massa seca de brotações das progênies de *E. grandis* na fase de multiplicação.



**Figura 2.** Produção de massa seca de brotações de dez progênies de *E. grandis* na fase de multiplicação em meio de cultura JADS, aos 63 dias de cultivo. Piracicaba, 2006. Letras iguais não apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Figure 2.** Dry mass production of shoots of ten progenies of *E. grandis* in the multiplication phase in JADS culture medium, after 63 days of cultivation. Piracicaba, 2006. Figures followed by the same letter do not differ significantly at 5% probability by the Tukey test.

Observou-se que a progênie 7, mesmo apresentando uma produção de massa seca superior as demais (0,18 g), estatisticamente, essa diferença não foi significativa. Ou seja, ao optar por uma progênie baseado na produção de massa seca, tanto as progênies 7 como a 3, 6 e 8 se encontram aprovadas pois a produção foi de 0,18 g, 0,1584 g, 0,1626 g e 0,1691 g, respectivamente. A menor produção de massa seca foi encontrada na progênie 9 (0,1287 g).

A superioridade de produção de massa seca encontrada na progênie 7 correspondeu a 29,4% com relação à menor produção de massa seca. Nos estudos conduzidos por 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*, aos 21 dias de crescimento. Estes pesquisadores apenas corroboram com este estudo, permitindo-se afirmar que indivíduos oriundos de cruzamentos ambientais ou *in vitro*, pertencentes a uma mesma espécie podem apresentar variações quanto ao desenvolvimento, principalmente no que diz respeito a produção de massa fresca e seca.

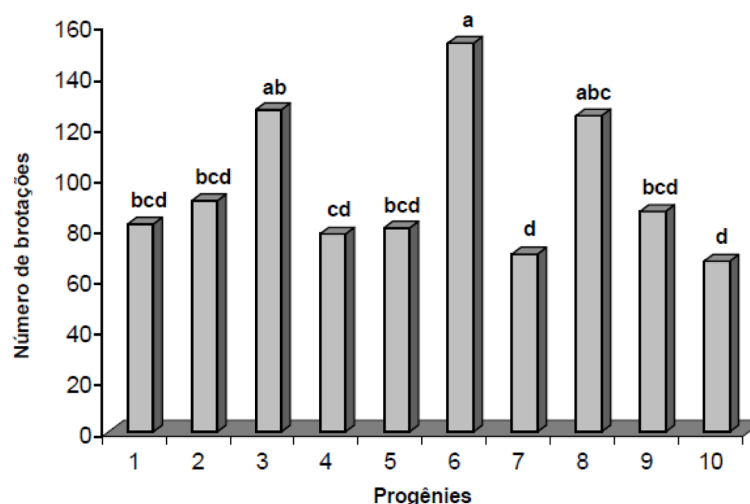
Após avaliação das Figuras 01 e 02, constatou-se que as progênies 3, 6, 7 e 8 apresentaram maior produção de biomassa, podendo ser destacadas como apta ao cultivo *in vitro*. Estes dados são corroborados por Ramage e Williams (2003), pois segundo esses autores, o que se busca na melhoria do cultivo *in vitro* são os ganhos de biomassa e qualidade da cultura, contribuindo para aumentar o rendimento nas fases de multiplicação e alongamento das brotações. Essa melhoria no processo pode favorecer o aumento do enraizamento de brotações *in vitro* ou *in vivo*, por meio de mini estaquia ou micro estaquia, e no índice de mudas de qualidade (XAVIER et al., 2001).

Na Figura 3, pode-se observar a média do número de brotações em dez progênies de *E. grandis* em fase de alongamento em meio de cultura JADS.

A maior média no número de brotações foi encontrada na progênie 6 (153 brotações) seguidas pelas progênies 3 e 8, sendo a progênie 6, 43,92% superior quando comparado com a progênie 7 que, nas avaliações de multiplicação, foi estatisticamente superior às demais. As progênies 7 e 10, foram estatisticamente inferiores quanto ao número de brotos, com 70 e 67 brotações, respectivamente.

Os resultados aqui encontrados são corroborados por Ponte et al. (2001), em seus estudos cultivando *Eucalyptus globulus* oriundos de sementes em meio de cultura MS com BAP (0,2 mg L<sup>-1</sup>). Estes 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.

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 (PÉREZ-TORNERO; BURGOS, 2000; PÉREZ-TORNERO et al., 2000).



**Figura 3.** Número de brotações de dez progênes de *E. grandis* na fase de alongamento em meio de cultura JADS, aos 63 dias de cultivo. Piracicaba, 2006. Letras iguais não apresentam diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Figure 3.** Number of shoots of ten progenies of *E. grandis* in the elongation phase in JADS culture medium, after 63 days of cultivation. Piracicaba, 2006. Figures followed by the same letter do not differ significantly at 5% probability by the Tukey test.

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 et al. (1993), estudando o alongamento de brotações em clones de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, avaliados aos 30 dias, constatou que os explantes apresentaram crescimento em altura de 3,0 cm, cultivados em meio de cultura sólido.

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).

Muitos fatores podem influenciar o crescimento e desenvolvimento das brotações. Dentre os principais fatores, podem-se destacar a aeração no meio de cultura e controle de seu fluxo, o tempo período, a qualidade e a intensidade de luz e fotoperíodo (CORREIA et al., 1995; WILLIAMS, 1995; RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

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, 2000).

## CONCLUSÕES

Dentre as 10 progênes de *Eucalyptus grandis* estudadas, as progênes 3, 6, 7 e 8 obtiveram bom desenvolvimento, se destacando para os trabalhos *in vitro*, para diferentes fins. Ambas apresentaram-se aptas para fins de crescimento desde que o meio seja suplementado apenas com BAP. No entanto, a progênie 7, apresentou-se apta aos trabalhos de multiplicação desde que haja suplementação do meio com BAP e com AIA, devido a sua baixa e missão de brotações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa: UFV, 2004. 442 p.

BENINCASA, M. M. P. Análise de crescimento de plantas (noções básicas). Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42 p.

- 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. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. **Tree Physiology**, Victoria, v. 20, n. 14, p. 921-928. 2000.
- CALDAS, L. S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p. 37-70.
- CARVALHO, D. **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. Lavras, 1988.
- CARVALHO, R. I. N.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F.; SANTOS, J. M.; PEREIRA, G. P. Estádios de brotação de gemas de fruteiras de clima temperado para o teste biológico de avaliação de dormência. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 93-100, jan./mar. 2010.
- CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 132 p.
- 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, n. 48/49, p. 107-116, 1995.
- DAVIES, P. J. **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action**. 3.ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. 750 p.
- DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMANN, P. C. (Ed.) **Micropropagation – Technology and application**. Kluwer: Academic Publishers, 1990. p. 1-13.
- FAO. **El eucalipto en la repoblación forestal**. Roma, 1981. 747 p.
- GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, A. M.; DE KLERK, G. J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3.ed. Dordrecht: Springer, 2008. v. 1. p. 29-64.
- 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.
- 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.
- HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 205 p.
- JOSHI, I.; BISHT, P.; SHARMA, V. K.; UNİYAL, 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.

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.

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

PÉREZ-TORNERO, O.; BURGOS, L. Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 63, n. 2, 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.

PONTE, E. M.; MATTEI, V. L.; PETERS, J. A.; ASSIS, T. F. Multiplicação e Enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus globulus* subesp. *globulus* Labill. **Revista Árvore**, Viçosa, 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**, Raleigh, v. 38, n. 2, 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**, Heidelberg, v. 21, n. 11, p. 1047-1053, 2003.

SANKARA-RAO, K.; VENKATESWARA, R. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Eucalyptus grandis* L. **Plant Science**, Amsterdam, v. 40, n. 1, p. 51-55, 1985.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT® user guide**: version 6.08. Carrey, 1997. v. 2, 846 p.

SILVA, H. D.; FERREIRA, C. A.; CORRÊA, R. S.; BELLOTE, A. F. J.; TUSSOLINI, E. L. Alocação de biomassa e ajuste de equações para estimativa de biomassa em compartimentos aéreos de *Eucalyptus benthamii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 49, p.83-95, 2004.

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**, Seropédica, v. 10, n. 1, p. 58-68, 2003.

TOTH, V. D. R.; VIEIRA, J. D.; GONÇALVES, 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, 1, 1993, Brasília. **Anais...** Brasília: Redbio, 1993. p. 110-103.

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.; 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.

Recebido em 28/08/2014

Aceito para publicação em 11/08/2015

