

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DOIS MEIOS DE CULTURA PARA *Corymbia citriodora* IN VITRO

Ângela Simone Freitag¹, Felipe Uassurê Nery², Fabiana Ribeiro Rossi³, Antônio Natal Gonçalves⁴

¹Eng^a Florestal, Doutoranda em Recursos Florestais, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil - angelafloresta@usp.br

²Eng. Agrônomo, Mestrando em Recursos Florestais, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil - funery@usp.br

³Eng^a Agrônoma, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil - fabianarossi@yahoo.com.br

⁴Eng. Agrônomo, Dr., Depto. de Ciências Florestais, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, Brasil - natalgon@esalq.usp.br

Recebido para publicação: 10/11/2009 – Aceito para publicação: 19/07/2011

Resumo

O presente trabalho teve por objetivo comparar o crescimento e desenvolvimento de explantes caulinares de *C. citriodora* nos meios de cultura JADS e MS, mensurando-se a produção de biomassa total, proteínas totais e açúcares totais solúveis. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, organizados em esquema bifatorial, com parcela subdividida no tempo com três repetições por tratamento. Tratamentos: T1 (testemunha, 40 ml de meio por frasco); T2 (40 ml de meio por frasco e adição de 10 ml no dia 6); T3 (40 ml de meio por frasco e adição de 10 ml nos dias 6 e 9). Como subparcelas, sete épocas de avaliação (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18). Concluiu-se que para o meio JADS é mais recomendado que se efetuem duas adições de meio durante a fase desenvolvimento dos explantes. Já para o MS, aconselha-se não adicionar meio de cultura durante o desenvolvimento do *C. citriodora*.

Palavras-chave: JADS; MS; micropropagação; desenvolvimento.

Abstract

Comparative study between two environments for cultivation of Corymbia citriodora in vitro. This research aimed to compare growth and development of *C. citriodora* shoots in JADS and MS environments measuring the total dry weight, total proteins, and total soluble sugars. The experimental design employed was randomized blocks, arranged in bifactorial model, with timing split plots with three replications per treatment. Treatments: T1 (control, 40 ml of medium per bottle, without addition during the assessment), T2 (40 ml of medium per bottle adding 10 ml just on third day of assessment), T3 (40 ml of medium per bottle adding 10 ml on third and fourth days of assessment) as subplots, seven assessment periods (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18). As result, for the medium JADS it is recommended two additions of culture medium during the explants development. For MS it is not indicated add cultivating environment during *C. citriodora* development.

Keywords: JADS; MS; micropropagation; development.

INTRODUÇÃO

A micropropagação, termo sugerido por Hartman *et al.* (1990), compreende o cultivo asséptico de partes da planta em condições controladas de nutrição, luminosidade, fotoperíodo e temperatura. Essa técnica, segundo Titon *et al.* (2006), tem como vantagens a manutenção do genótipo e do fenótipo, conhecimento sobre mutações ou variedades genéticas selecionadas, excelente estado fitossanitário das plantas obtidas, rápida propagação clonal e produção em massa geneticamente idêntica e fisiologicamente uniforme.

Como forma de propagação vegetativa, baseada em técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, a micropropagação torna-se uma alternativa para a regeneração de plantas que apresentam dificuldades de reprodução natural e também onde os métodos convencionais de propagação vegetativa não se tornam viáveis (THORPE *et al.*, 1991).

A regeneração da cultura de tecidos vegetais é basicamente influenciada pelo genótipo, pelos meios de cultura, tipos de explante e condições de cultura (BRAVO, 2005). O tipo de explante, bem como a definição de seu estágio de desenvolvimento, é um dos fatores que determinam a capacidade de resposta *in vitro*. A micropropagação de *Eucalyptus*, atualmente, tem sido utilizada no rejuvenescimento de clones,

visando a formação de jardim microclonal, para produção de microestacas (SANTOS *et al.*, 2005), em que os meios de cultura mais utilizados são o JADS e o MS.

O meio MS caracteriza-se por apresentar concentração iônica total alta, sendo as concentrações de nitrogênio, potássio, zinco e cloro mais elevadas quando comparadas a outros meios de cultura (GABRIEL, 2009). Já o meio de cultura JADS, desenvolvido no Laboratório de Fisiologia das Árvores da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), é específico para o cultivo *in vitro* de *Eucalyptus grandis* Hill.

Para que o desenvolvimento dos tecidos *in vitro* seja favorecido, a determinação da composição orgânica e mineral no meio de cultivo é especialmente importante, uma vez que os nutrientes precisam estar presentes em quantidades suficientes para manter seu crescimento e diferenciação (MEZZETTI *et al.*, 1991).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi comparar os meios de cultura JADS e MS quanto ao crescimento e desenvolvimento de explantes caulinares de *C. citriodora*, mensurados através da produção de biomassa total, proteínas totais e açúcares totais solúveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Fisiologia das Árvores do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba, Estado de São Paulo. O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso, organizado em esquema fatorial, com dois fatores, sendo 2 meios de cultura (JADS e MS) x sete épocas de avaliação (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18). Os tratamentos foram caracterizados por: T1 (controle); T2 (adição de 10 ml ao terceiro dia de avaliação); T3 (adição de 10 ml ao terceiro e quarto dias de avaliação).

Para cada tratamento foram preparados 14 frascos com capacidade de 100 ml, vedados com tampa de polipropileno, gerando um total de 184 frascos. Foram adicionados em cada frasco 40 ml de meio de cultura líquido (sem adição de ágar). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8 +/- 0,1 antes da autoclavagem. Em cada recipiente contendo meio de cultura líquido foi colocado um suporte de manta acrílica para a sustentação do explante medindo 4,5 cm de diâmetro e 0,5 de espessura.

Os meios de cultura (Tabela 1) juntamente com a manta acrílica foram esterilizados em autoclave a 121 °C sob pressão de 1,05 kg/cm², durante 20 minutos. Após o preparo do meio, foi feita a assepsia e repicagem dos explantes caulinares de *C. citriodora* e posterior alocação deles em número de quatro explantes por frasco.

Tabela 1. Sais e vitaminas utilizadas para o preparo dos meios de cultura JADS e MS.

Table 1. Salts and vitamins used to prepare MS and JADS environments.

Composição	Concentração (g.L ⁻¹)	
	JADS	MS
NH ₄ NO ₃	32,400	165,00
KNO ₃	80,900	190,00
Ca (NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	118,10	-
KH ₂ PO ₄	40,800	17,000
MgSO ₄ . 7H ₂ O	73,950	37,000
MnSO ₄ . 7H ₂ O	1,6900	1,6900
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,1250	0,0025
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,4320	0,8600
FeSO ₄ . 7H ₂ O	7,4500	2,7800
Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	5,5600	3,7300
H ₃ BO ₃	0,3100	0,6200
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,0150	0,0250
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,0250	0,0025
KI	0,0160	0,0830
Tiamina-HCl	0,0500	0,0200
Mio Inositol	5,0000	10,000
Glicina	0,1000	0,4000
Ácido Nicotínico	0,0250	0,1000
Piridoxina HCl	0,0250	0,1000
CaCl ₂ . 2H ₂ O	-	44,000

As culturas permaneceram em condições ambientais de crescimento à temperatura de 26 °C ±2 °C, fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa de 1000 lux, fornecida por luz branca fria localizada 30 cm acima do nível de cada prateleira, provenientes de 2 lâmpadas de 110 W cada uma, modelo H.O. marca Sylvania.

As amostragens das plantas para análises dos parâmetros fisiológicos, químicos e bioquímicos foram realizadas a cada três dias após a instalação do experimento. Foram coletados dois recipientes/tratamento/meio de cultura. Essas amostras foram pesadas, para obtenção da massa fresca, e após foram levadas para a estufa a 60 °C, até peso constante, para obtenção da massa seca.

Após a secagem e pesagem do material, obteve-se a massa seca em gramas. Posteriormente, o material foi moído em moinho tipo Willey, para obtenção de partículas homogêneas, acondicionado em frascos de vidro, devidamente tampados, identificados e armazenados em freezer a -20 °C. Com o material moído, determinaram-se os teores de proteínas totais solúveis (PTS) e açúcares totais solúveis (ATS) para cada dia de coleta, tanto da parte aérea como da radicular da planta.

A determinação dos teores de PTS foi feita pelo método de Bradford (1976). A extração das proteínas foi feita com 50 mg de matéria seca mais 0,5 mL de tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5. Depois de agitação vigorosa (vórtex), o material foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante colhido como extrato. A reação foi feita com 0,1 mL de extrato mais 5 mL de reagente de Bradford. A leitura colorimétrica da reação foi feita em espectrofotômetro modelo "ultrospec 2100 pro" a 595 nm. Os teores de PTS foram calculados pela interpolação dos resultados na curva-padrão de albumina de soro bovino (BSA). Os resultados foram expressos em mg de PTS·g⁻¹ms.

A determinação dos teores de ATS foi feita pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956). A extração dos açúcares foi feita em duas etapas. Inicialmente, 50 mg de massa seca mais 2,5 ml de água deionizada. Depois de agitação vigorosa (vórtex), a mistura foi incubada em banho-maria a 60 °C por 30 minutos, seguida por centrifugação a 3.000 g por 15 minutos e coleta do sobrenadante como extrato 1. Na segunda etapa, o sedimento foi submetido novamente à mesma extração e o sobrenadante foi coletado como extrato 2. Os extratos 1 e 2 foram misturados, gerando o extrato final. A reação foi feita adicionando 0,5 mL de extrato, diluído de zero a dez vezes, conforme os teores de ATS, acrescentado de 0,5 mL de solução de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A leitura colorimétrica da reação, depois de resfriada em temperatura ambiente, foi feita em espectrofotômetro modelo "ultrospec 2100 pro" a 490 nm. Os teores de ATS foram calculados pela interpolação dos resultados na curva-padrão de glicose. Os resultados foram expressos em mg de glicose·g⁻¹ms.

Os efeitos dos tratamentos foram avaliados mediante análise de variância, e as médias dos tratamentos, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Massa seca

Na tabela 2, podem ser visualizados os valores de massa fresca e massa seca de explantes de *C. citriodora*, nos meios de cultura MS e JADS, coletados de três em três dias.

Nos tratamentos com meio JADS, o desenvolvimento dos explantes foi crescente dentro e entre tratamentos, para a massa fresca (Tabela 2). No entanto, quando se avalia a massa fresca entre tratamentos, verifica-se que o tratamento T2 apresentou maior massa seca em relação aos demais. Já dentro dos tratamentos, o crescimento foi crescente.

Com relação ao T3 do meio JADS, a adição de mais meio acarretou em uma diminuição da massa fresca, a qual foi verificada na quinta época de avaliação. No entanto, esse decréscimo não foi verificado na massa seca. Isso é explicado por Kozai *et al.* (1991), que afirmam que o crescimento fotoautotrófico é também favorecido pela ausência de sacarose no meio, ou seja, baixas quantidades de açúcares favorecem o aumento da massa seca e da massa fresca. O mesmo comportamento não é verificado para a massa seca, que teve o decréscimo observado após a primeira adição de meio e não na segunda. Na tabela 3 está representada a média percentual dos três tratamentos para os meios de cultura MS e JADS.

Conforme os resultados encontrados, houve diferença entre os tratamentos T1 e T2, enquanto que T3 não apresentou diferença entre tratamentos para ambos os meios.

Tabela 2. Valores de massa fresca e massa seca (g) dos explantes de *C. citriodora* para os meios de cultura MS e JADS.

Table 2. Fresh and dry mass values (g) from *C. citriodora* explants in three different treatments in MS and JADS environments.

Dias de coleta	T1		T2		T3	
	Massa fresca	Massa seca	Massa fresca	Massa seca	Massa fresca	Massa seca
Meio MS						
0	3,09	0,25	3,09	0,25	3,09	0,25
3	3,94	0,35	3,94	0,35	3,94	0,35
6	4,94	0,46	9,14	0,76	8,17	0,64
9	6,38	0,53	7,86	0,61	8,23	0,59
12	6,37	0,57	14,32	1,03	11,56	0,77
15	5,32	0,52	15,99	1,18	11,95	0,84
18	11,06	1,02	16,13	1,49	18,18	1,53
Total	41,1	3,7	70,47	5,67	65,12	4,97
Meio JADS						
0	1,51	0,15	3,09	0,25	3,09	0,25
3	1,69	0,17	3,94	0,35	3,94	0,35
6	3,86	0,32	4,24	0,34	6,07	0,48
9	5,17	0,42	5,86	0,40	7,4	0,46
12	5,59	0,45	8,93	0,69	6,53	0,48
15	8,57	0,72	8,6	0,67	11,76	0,82
18	6,66	1,16	12,12	1,14	14,24	0,74
Total	33,05	3,39	46,78	3,84	53,03	3,58

T1: tratamentos sem adição de meio; T2: adição de 10 ml de meio ao terceiro dia de avaliação; T3: adição de 10 ml de meio ao terceiro e quarto dias de avaliação.

Tabela 3. Média da porcentagem de massa seca (%) de explantes de *C. citriodora* cultivado nos meios de cultura MS e JADS, com sete avaliações.

Table 3. Dry mass percentage mean (%) of *C. citriodora* explants cultivated in culture medium MS and JADS with seven assessments.

Tratamentos	Massa seca	CV	DMS
Meio MS			
T2	12,06 a		
T3	11,40 ab	9,9	1,52
T1	10,23 b		
Meio JADS			
T2	13,22 a		
T3	11,45 ab	19,36	3,02
T1	9,64 b		

T1: tratamentos sem adição de meio; T2: adição de 10 ml de meio ao terceiro dia de avaliação; T3: adição de 10 ml de meio ao terceiro e quarto dias de avaliação.

Teores de proteínas totais solúveis (PTS)

Na figura 1 são apresentados os teores de proteínas totais solúveis encontrados em *C. citriodora* cultivado *in vitro* no meio de cultura MS.

Os menores teores de PTS foram encontrados no tratamento T1, o qual apresentou também poucas variações ao longo das avaliações. Já os tratamentos T2 e T3 apresentaram variações bem mais acentuadas, com valores mínimos de 4,0 mg.g.ms⁻¹ para o tratamento T3, a valores máximos de 45,5 mg.ms⁻¹ para o tratamento T2. No entanto, mesmo o tratamento T2 apresentando maiores quantidades totais de PTS que o T3, o tratamento T3 foi o que, ao final das avaliações, gerou um gráfico pelo qual é possível inferir que, se continuássemos com as avaliações de suas taxas de proteínas, estas continuariam a aumentar.

Após a adição de mais meio, ao terceiro dia de avaliação, houve um decréscimo no tratamento T2 e um breve aumento no tratamento T3. A partir disso, constata-se que, quanto mais nutrientes são

disponíveis aos explantes, menores são as taxas de proteínas acumuladas. Ou seja, à medida que a concentração de nutrientes do meio de cultura diminui, a planta é estimulada e sua capacidade de produzir e fixar proteínas em seus tecidos aumenta. Essa afirmação é ratificada por Sircelj *et al.* (2005) em experimentos com milho e em cultivares de maçã, onde verificaram que, sob condições de estresse hídrico, houve um aumento gradativo no teor de carboidratos solúveis. Tais aumentos na quantidade de proteínas totais solúveis após um estresse também foram observados por Costa *et al.* (2008) e Lobato *et al.* (2008) estudando cultivares de ervilha.

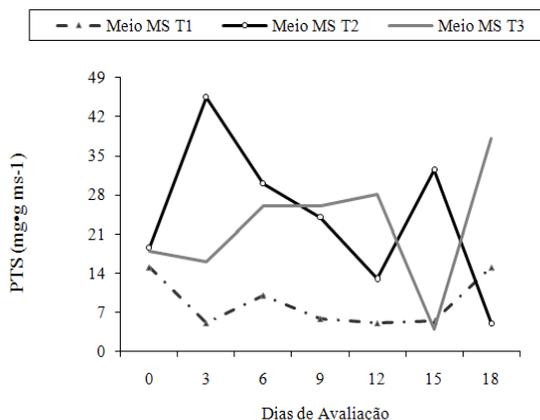


Figura 1. Teores de proteínas totais solúveis (mg.g.ms^{-1}) em explantes de *C. citriodora* cultivado *in vitro* em meio de cultura MS, durante sete épocas de avaliação.

Figure 1. Content of total soluble proteins (mg.g.ms^{-1}) in *C. citriodora* cultivated *in vitro* in MS environment, during seven assessment periods.

Na figura 2, são apresentados graficamente os teores de PTS para *C. citriodora* produzida *in vitro* em meio de cultura JADS, com sete avaliações.

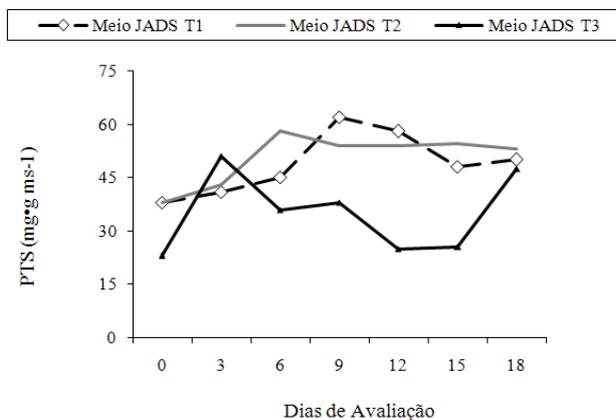


Figura 2. Teores de proteínas totais solúveis (mg.g.ms^{-1}) em explantes de *C. citriodora* cultivado *in vitro* em meio de cultura JADS, durante sete épocas de avaliação.

Figure 2. Content of total soluble proteins (mg.g.ms^{-1}) in *C. citriodora* explants *in vitro* in JADS environment, during seven assessment periods.

Os maiores teores de PTS foram observados no tratamento T2, e os menores teores no tratamento T3 (Figura 2). No tratamento T1, foram observadas elevações nos teores de PTS entre o 9° e o

12º dia de avaliação, diminuindo novamente após essa data. Esses picos nos teores de PTS em T1 se devem principalmente à falta de água e de nutrientes, que foram se exaurindo ao longo do período de cultivo. Segundo Silva *et al.* (2009), essa redução na tolerância por parte dos calos de *C. citriodora* propiciou maior acúmulo de açúcares e aminoácidos, como forma de reduzir os efeitos do estresse nutricional.

Stefanuto (2002), analisando as concentrações de proteínas em *E. grandis*, verificou que a adição de meio de cultura contendo cálcio ocasionou uma redução na quantidade de prolina, constituinte das proteínas. Esses acúmulos de prolina, segundo Stewart *et al.* (1966), são efeitos secundários em resposta ao estresse.

Teores de açúcares totais solúveis (ATS)

Na tabela 4 são apresentados os valores encontrados para os teores de açúcares totais solúveis (ATS) encontrados em *C. citriodora* cultivado *in vitro* em meio de cultura MS e JADS, durante as sete épocas de avaliação, dados em miligramas (mg) de ATS por gramas (g) de massa seca.

Em geral, os explantes de *C. citriodora* cultivados em meio MS apresentaram maior teor total de ATS, com exceção de T2, onde os teores foram maiores no meio JADS (Tabela 4). As quantidades totais de ATS no meio de cultura MS tiveram comportamento menos discrepante em relação ao meio JADS.

Tabela 4. Teores de ATS em explantes de *C. citriodora* cultivado *in vitro* em meio de cultura MS e JADS, durante sete épocas de avaliação (mg.g.ms⁻¹).

Table 4. Content of total soluble sugars in *C. citriodora*, cultivated *in vitro* in MS and JADS environments, during seven assessment periods (mg.g.ms⁻¹).

Dias de coleta	MS			JADS		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
0	432,00	440,00	420,80	436,80	376,00	432,00
3	425,60	480,00	489,60	344,00	488,80	476,80
6	443,20	398,40	543,20	506,40	700,80	489,60
9	552,80	483,20	472,80	336,00	386,40	406,40
12	415,20	561,60	486,40	335,20	467,20	436,80
15	344,00	532,80	412,00	429,60	552,00	541,60
18	419,20	545,60	489,60	377,60	561,60	528,00
Total	3032,00	3441,60	3314,40	2765,60	3532,80	3311,20

T1: tratamentos sem adição de meio; T2: adição de 10 ml de meio ao terceiro dia de avaliação; T3: adição de 10 ml de meio ao terceiro e quarto dias de avaliação.

Com relação ao meio MS, o tratamento T2 apresentou uma leve redução no 3º dia de avaliação para os teores de ATS, voltando a aumentar a partir do dia 9, época em que houve adição de 10 ml. Já o tratamento T1 teve quantidades irregulares nos teores de ATS durante todo o período de avaliação, gerando uma readequação na assimilação e armazenamento de compostos. No tratamento T3, a adição de duas doses de meio não gerou resposta significativa no aumento do ATS.

No meio JADS, assim como no meio MS, o tratamento T2 foi o que apresentou maior teor total de ATS, enquanto que o menor teor foi encontrado no tratamento T1. A adição de mais meio durante o experimento, tanto para o meio JADS como para o MS, proporcionou um aumento nos teores de ATS. Trevisan (2005) cita que açúcares e proteínas são dois dos mais importantes solutos orgânicos acumulados em plantas superiores sob condições de estresse. A proteína é reconhecidamente um indicador de estresse, e os açúcares, os precursores necessários como fonte de C e H para a síntese do aminoácido.

CONCLUSÕES

Visando a obtenção de mudas, conclui-se que, para o meio JADS, é mais recomendado que se efetuem duas adições de meio de cultura durante a fase de desenvolvimento dos explantes. Já para o MS, não é indicado efetuar a adição de meio de cultura durante o desenvolvimento do *C. citriodora*.

REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248 - 254, 1976.
- BRAVO, C. D. V. **Controle genético e histogênese na regeneração de progênies de *Eucalyptus grandis***. 2005. 80 p. Dissertação (Mestrado em Silvicultura e Manejo Florestal) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- COSTA, R. C. L.; LOBATO, A. K. S.; OLIVEIRA NETO, C. F.; MAIA, P. S. P.; ALVES, G. A. R.; LAUGHINGHOUSE, H. D. Biochemical and physiological responses in two *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Cultivars under water stress. **Journal of Agronomy**, v. 7, p. 98 - 101, 2008.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; FRED. SMITH, F. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistri**, New York, v. 28, p. 350 - 356, 1956.
- GABRIEL, M. V. **Otimização da multiplicação de brotações de *Eucalyptus globulus* Labill. in vitro**. 2009. 101 p. Dissertação (Mestrado em Silvicultura e Manejo Florestal) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- HARTMANN, T. H.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T. **Plant propagation: principles and practices**. New Jersey: Prentice Hall, 1990. 647 p.
- KOZAI, T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, K.; WATANABE, L. Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 25, n. 2, p. 107 - 115, 1991.
- LIMA, M. M; GONÇALVES, A. N. Efeito do Thidiazuron na multiplicação *in vitro* de gemas de um clone de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus tereticornis* *Effect of Thidiazuron on in vitro shoot multiplication of Eucalyptus grandis x Eucalyptus tereticornis*. **SCIENTIA FORESTALIS**. n. 53, p. 49 - 56, 1998.
- LOBATO, A. K. S.; OLIVEIRA NETO, C. F.; COSTA, R. C. L.; SANTOS FILHO, B. G.; CRUZ, F. J. R.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. Biochemical and physiological behavior of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. under stress during the vegetative phase. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 7, p. 44 - 49, 2008.
- MEZZETTI, B.; ROSATI, P.; CASALICCHIO, G. *Actinidia delliciosa* C. F. Liang *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 25, p. 91 - 98, 1991.
- SANTOS, A. P. dos; XAVIER, A.; OLIVEIRA, M. L.; REIS, G. G. dos. Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones de *Eucalyptus grandis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 68, p. 29 - 38, 2005.
- SILVA, E. S. A.; SOUZA, C. M. de A.; ROCHA NETO, O. G. da; FIGUEIREDO, F. J. C. Parâmetros bioquímicos de plantas de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C.DC.) em diferentes condições de cultivo no município de Igarapé-Açu, PA. **Revista Ciência Agrária**, Belém, n. 51, p. 171 - 189, 2009.
- SIRCELJ, H.; TAUSZ, M.; GRILL, D.; BATIC, F. Biochemical responses in leaves of two apple tree cultivars subjected to progressing drought. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 1308 - 1318, 2005.
- STEFANUTO, V. A. **Efeito do cálcio na homeostase de brotações de um clone de *Eucalyptus grandis* Hill (ex Maiden) sob condições de deficiência hídrica induzida in vitro**. Piracicaba, 2002. 65 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- STEWART, C. R.; MORRIS, C. J.; THOMPSON, J. F. Changes in aminoacid content of excised leaves during incubation II. Role of sugar in the accumulation in wilted barley leaves. **Plant Physiology**, v. 41, p. 1585 - 1590, 1966.

THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 311 - 336.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Clonal propagation of *Eucalyptus grandis* using the mini-cutting and micro-cutting techniques. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 71, p. 109 - 117, 2006.

TREVISAN, R. **Análises histológicas e bioquímicas em calos de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake cultivados *in vitro* sob interação nutricional de boro e cálcio**. Piracicaba, 2005. 192 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.