

DIFERENTES REGULADORES DE CRESCIMENTO E SEUS EFEITOS NA CULTURA DE ANTERAS EM EUCALIPTO

Samyra Alves Conde^{1*}; Rodrigo Dal Sasso Lourenço¹; Lucas Barbosa de Castro Rosmaninho¹; Martha Freire da Silva²; Lorena de Oliveira Moura¹; Heloísa Rocha do Nascimento¹ e Thais Roseli Corrêa³

¹ Universidade Federal de Viçosa-UFV, Departamento de Agronomia, Avenida da Agronomia, S/Nº- Campus UFV, Viçosa-MG,36570-900.E-mail:samyra.conde@ufv.br, rodrigodalsasso@gmail.com, lucas.rosmaninho@ufv.br, lorenaomoura@gmail.com, helornasc@gmail.com

² Universidade Estadual de Maringá-UEM, Campus Regional de Umuarama, Estrada da paca s/n, Umuarama-PR, 87502-970. E-mail: marthafreire86@gmail.com

³ Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, Centro de Ciências Agrárias, Avenida Lourenço Vieira da Silva, Jardim São Cristóvão, São Luís-MA,65055-310.E-mail: thaisroselicorrea@hotmail.com

*autor correspondente:samyra.conde@ufv.br

RESUMO: A produção de di-haploides pode contribuir para a obtenção de linhagens homocigotas a partir de genótipos de interesse de eucalipto, apesar de ser considerado recalcitrante à cultura *in vitro*. Objetivou-se com esse trabalho verificar o efeito de diferentes reguladores de crescimento na indução de calos a partir de anteras de eucalipto, determinar características de botões florais para a indução da androgênese e avaliar seu uso em outras fases de micrósporo na indução a regeneração *in vitro* desses explantes. Foram utilizados dez genótipos da empresa Cenibra, avaliando-se o calejamento e oxidação dos explantes, dos quais os genótipos 53, 217, 242 e 250/2 apresentaram maior calejamento. Os reguladores de crescimento 2,4-D e picloran foram eficientes na indução, enquanto NAA causou inibição. A manutenção subsequente dos calos em meios suplementados com o dobro da concentração de sacarose ou com TDZ e NAA, ou BAP e AIA resultaram em menor calejamento, maior oxidação em relação aos tratamentos iniciais de indução. Os botões florais foram caracterizados morfológicamente e associados com a fase do micrósporo. O estágio de botão floral com maior frequência de micrósporos entre tétrades e grãos de pólen coincide com o diâmetro imediatamente anterior a antese para os genótipos avaliados.

PALAVRAS-CHAVE: Cultura de tecidos, Melhoramento de plantas, Silvicultura.

DIFFERENT GROWTH REGULATORS AND THEIR EFFECTS ON ANTHER CULTURE IN EUCALYPTUS

ABSTRACT: The production of di-haploids may contribute to obtain homozygous strains from genotypes of eucalyptus interest, although it is considered recalcitrant to *in vitro* culture. The objective of this study was to verify the effect of different growth regulators on callus induction from eucalyptus anthers, to determine the characteristics of flower buds for the induction of androgenesis and evaluate its use in other stages of microspore in the inducing *in vitro* regeneration of these explants. Ten genotypes from Cenibra's company were submitted to analysis, evaluating the callus formation and oxidation of the explants, of which the genotypes 53, 217, 242 and 250/2 presented greater callus formation. The growth regulators 2,4-D and picloram were efficient in the induction of callus, while NAA inhibit the callus formation. The subsequent maintaining of the callus in supplemented mediums with double concentration of sucrose or with TDZ and NAA, or BAP and AIA resulted in less callus formation and greater

oxidation in relation to the initial treatments of induction. The floral buds were characterized morphologically and associated with a stage of microspore. The stage of floral bud with the biggest frequency of microspore between tetrads and pollen grains match with immediately previous diameter to the anthesis of evaluated genotypes.

KEY WORDS: Plant tissue culture, Plant breeding, Forestry.

INTRODUÇÃO

No Brasil e no mundo tem-se observado aumento na demanda por produtos florestais sendo que o gênero *Eucalyptus* apresenta algumas das espécies mais importantes para as indústrias de papel e celulose, carvão vegetal e madeira sólida. De acordo com a IBA (2023), no âmbito nacional, a área com florestas plantadas para fins industriais em 2021, foi de 7,53 milhões de hectares. As espécies do gênero *Eucalyptus* apresentam diferenças quanto à adaptação às condições climáticas, ao crescimento, a qualidade da madeira e a resistência a doenças. Fato este que permite aos melhoristas selecionar genótipos que atendam as demandas de produtividade do mercado.

A propagação vegetativa de eucalipto é rotineiramente realizada, o que facilita as estratégias de melhoramento visando o desenvolvimento de combinações genotípicas superiores (Assis, 1996). Por outro lado, o uso de híbridos de algumas espécies de *Eucalyptus* frequentemente resulta em ganhos significativos devido a seus valores heteróticos e ou a combinação de características (Zobel et al., 1987). Entretanto, não há estratégia de melhoramento adequada a todas as situações, visto que sua escolha é condicionada pela dimensão do empreendimento, recursos disponíveis, objetivos do programa, aspectos biológicos da espécie, dentre outros.

Em programas de melhoramento, técnicas de cultura de tecidos possibilitam a fixação do ganho genético pela captura dos componentes aditivos e não-aditivos da variância genética (Guerra et al., 1999). Apesar dos relatos de sucesso na propagação e regeneração (Prakash & Gurumurthi 2005; Titon et al., 2007; Bandeira et al., 2007) o eucalipto ainda é considerado recalcitrante ao cultivo *in vitro*. Dentre 15 espécies de eucalipto, para as quais a regeneração tem sido pesquisada nos últimos vinte anos, somente oito possuem protocolos de regeneração completos (Watt et al., 2003). Além disto, não há relatos da utilização da cultura de anteras ou micrósporos para o eucalipto.

A cultura de anteras e micrósporos é uma técnica da cultura de tecidos que permite a recuperação de linhagens endogâmicas, onde, mediante a duplicação cromossômica, é possível recuperar indivíduos totalmente homozigotos em uma única geração (di-haplóides). Relatos do sucesso da utilização desta técnica em diversas culturas são verificados na literatura (Dunwell, 2010), dentre os quais trabalhos com regeneração de lenhosas ou perenes como *Vitis* (Cardoso et al., 2010); *Cicer arietinum* (Grewal et al., 2009), *Populus* (Qu et al., 2007), *Malus x domestica* (Höfer, 2005). De modo semelhante, nos eventos de regeneração a serem obtidos por meio do uso desta técnica, a segregação transgressiva ou combinações de alelos pode ser verificada em indivíduos homozigotos apresentando características com potencial a ser explorado no melhoramento de eucalipto.

Vários aspectos pode ser influenciar a cultura de tecidos, conseqüentemente a cultura de anteras, dentre esses: a condição fisiológica da planta doadora, condições de estresse, o genótipo, condições de cultura, composição dos meios e balanço dos reguladores de crescimento (Milloni et al., 2001; Kumar et al.; 2002; D'onofrio & Morini 2004).

Essa variedade de fatores, que pode influenciar a morfogênese *in vitro*, corrobora para o estado de arte das técnicas envolvidas, enquanto as suas perspectivas e aplicações atestam sua peculiaridade como ferramenta aplicada à propagação e melhoramento de plantas. O uso destas técnicas biotecnológicas e de cultura de tecidos poderá resultar em significativo impacto no setor florestal acelerando o melhoramento genético.

Devido ao elevado potencial de aplicação da cultura de anteras em *Eucalyptus*, este trabalho teve por objetivos verificar o efeito de diferentes reguladores de crescimento na indução de calos a partir de anteras de eucalipto, determinar características de botões florais que possam estar associadas à presença de células no estágio ótimo (micrósporo uninucleado) para a indução da androgênese em eucalipto e avaliar a possibilidade do uso de outras fases de micrósporo na indução a regeneração *in vitro* a partir destes explantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Botões florais de dez genótipos comerciais da empresa Cenibra, dos quais se tem informações quanto ao sucesso na obtenção de progênies mediante a autofecundação, foram utilizados nos experimentos de cultura de anteras. O experimento foi realizado duas etapas,

onde a utilização dos mesmos genótipos ficou vinculada à disponibilidade dos botões florais. Para as coletas em campo nas áreas de plantio comercial, os botões foram mantidos em gelo sendo em seguida conservados a 4 °C por 4 a 6 dias, antes da excisão das anteras.

Dois destes genótipos (242 e 250/2) foram utilizados para a determinação dos estágios dos micrósporos e associação com o desenvolvimento do botão floral. Os botões florais foram enviados sob refrigeração para o Laboratório de Anatomia Vegetal e Morfogênese/UFV, onde foram separados por tamanho. O botão recém-aberto foi considerado como referência para a classe de maior diâmetro, enquanto as demais classes foram estipuladas com base nos tamanhos intermediários entre o botão recém-formado e o de maior diâmetro.

Cultura de anteras

Sob condições assépticas, os botões florais foram submetidos a processo de desinfecção que constou de imersão em álcool etílico 70% (v/v) por 20s e hipoclorito de sódio a 2% (v/v) por 10 min, sendo posteriormente submetidos a três enxagues em água deionizada e autoclavada.

Os estames foram obtidos e as anteras inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura. Os meios de cultura foram baseados no meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementados com 2,5 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 10 mg L⁻¹ tiamina, 1,2 mg L⁻¹ piridoxina, 100 mg L⁻¹ mio-inositol, 3% (p:v) sacarose, 800 mg L⁻¹ PVP, gelificado com 0,6% de Agar e o pH ajustado para 5,7 ± 0,1. As placas com a cultura de anteras serão mantidas no escuro a 24 ± 2 °C.

Os meios de cultivo inicial (calejamento) foram suplementados com (MA) 3,0 mg L⁻¹ de picloran, (MB) 3,0 mg L⁻¹ de 2,4-D ou (MC) 3,0 mg L⁻¹ de ANA. Os explantes foram recultivados a cada 28-30 dias. Após um período de 90 dias, metade das dos explantes ou calos das placas foram transferidos para o mesmo meio inicial e a outra metade foram transferidos para meio MS contendo: (I) sem reguladores; (II) 0,4 mg L⁻¹ de BAP e 0,4 mg L⁻¹ BSAA; e (III) 0,5 mg L⁻¹ TDZ e 0,5 mg L⁻¹ ANA (Alves et al. 2004).

A avaliação do calejamento e oxidação foi realizada por três avaliadores independentes quando foram atribuídas notas: 1 – calejamento/oxidação pouco(a) ou ausente, 2 - calejamento/oxidação intermediário e 3 – muito calejamento/oxidação. A referência para as notas foram: 1 – a ausência ou pouco calejamento na superfície das anteras; 2 – calo com até

2,5 vezes o tamanho do explante (antera); e 3 – calos com dimensões superiores a 2,5 vezes o tamanho do explante original (antera).

Caracterização morfológica dos botões e associação com fase do micrósporo

Os Botões foram mantidos a 4°C por uma semana e separados por classes de diâmetro. Amostras de botões e anteras foram fixadas em etanol 100% e ácido acético glacial, na proporção de 3:1 e mantidos a -20°C. Foram avaliados 3 botões por classe de diâmetro e entre 30 e 100 anteras por amostra, de acordo com a disponibilidade delas. As anteras foram retiradas e fotografadas em lupa, enquanto, para a avaliação dos micrósporos, seções dos botões foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica).

As seções dos botões foram cortadas transversalmente, os cortes corados com Azul de Toluidina por 8 min e as lâminas montadas com resina sintética (Permout, Fisher). Após montagem das lâminas, foi realizada a documentação fotográfica onde cada repetição foi representada por 30 campos. Toda a documentação fotográfica do laminário (microscopia de luz) foi realizada no microscópio (Olympus AX70) equipado com sistema U-Photo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cultura de anteras

Dentre os genótipos avaliados, os clones 53, 217, 242 e 250/2 apresentaram maior calejamento (Figura 1) e menor oxidação dos explantes (Figura 1, Tabela 1B). O NAA pouco ou nada favoreceu a indução de calos (Figuras 1A e 1B). Picloran (Figuras 1C a 1I) e 2,4-D apresentaram resultados semelhantes, se destacando quanto à indução de calos. Os calos apresentavam textura friável e coloração de branco à marrom. Diferenças na capacidade de regeneração atribuídas ao genótipo foram também observadas para outras espécies (Zhao et al., 2014; Cheng et al., 2013; Dunwell, 2010). Mesmo considerando a ausência de eventos de regeneração a adequações do protocolo são necessárias devido à diferença nas respostas de calejamento em função do genótipo.

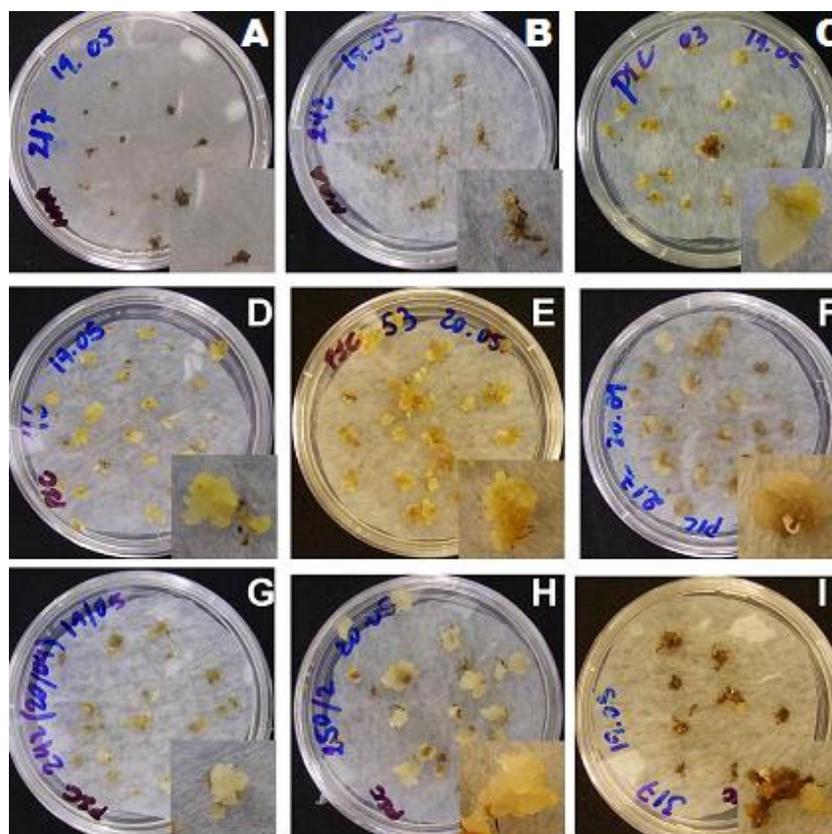


Figura 1- Placas, e detalhes, contendo anteras calejando em algumas combinações de genótipo e tratamento ao final do 2º subcultivo (60 dias). A – anteras do clone 217 em meio MS com NAA, B - anteras do clone 242 em meio MS com NAA, C - anteras do clone 03 em meio MS com picloran, D - anteras do clone 46 em meio MS com picloran, E - anteras do clone 53 em meio MS com picloran, F - anteras do clone 217 em meio MS com picloran, G - anteras do clone 242 em meio MS com picloran, H - anteras do clone 250/2 em meio MS com picloran, I - anteras do clone 317 em meio MS com picloran. Barra = 1 cm.

Ao final do terceiro sub-cultivo, foi realizado o teste de Azul de Evans/Carmim acético, onde foi verificada a presença de setores do calo com características meristemáticas (Figura 2). No entanto, eventos de organogênese adventícia ou embriogênese somática foram ausentes. Considerando a presença de setores com resultados positivo e negativo para este teste e a observação de grãos de pólen não germinados (Figura 2D), o calejamento observado foi atribuído à origem somática. Ao final do quarto subcultivo, os dados de calejamento e oxidação foram reunidos de acordo com os meios iniciais e meios subsequentes quando da introdução ao cultivo *in vitro* (Tabela 1A). Subcultivos adicionais foram realizados, porém os explantes ou calos mantiveram apenas o calejamento ou oxidaram.

Tabela 1-Médias das avaliações tomadas por três amostras independentes quanto a oxidação e ao calejamento tomados por médias dos tratamentos, ao final de 120 dias (1A) e 60 dias (1B) de cultivo. 1- pouco (a) ou ausente, 2 - intermediário e 3- muito. * - Explantes totalmente oxidados ou não respondentes.

1A	TRAT	Oxidação	TRAT	Calejamento
	TDZ/NAA	2.6	TDZ/NAA	1.5
	SAC	3.0	SAC	1.0
	BAP/IAA	2.5	BAP/IAA	1.5
	2,4-D	2.2	2,4-D	1.6
	PIC	1.2	PIC	2.5
	NAA	3.0*	NAA	1.0*
1B	TRAT	Oxidação	TRAT	Calejamento
	PIC	2.1	PIC	1.8
	2,4-D	2.4	2,4-D	1.3
	NAA	3.0*	NAA	1.0*

Embora obtenção de reação positiva para o teste com Carmim acético, eventos de regeneração não foram recuperados, reforçando a ideia de recalcitrância do eucalipto à cultura *in vitro*. Apesar do estabelecimento de protocolos e sucesso da cultura de anteras de *Capsicum annuum*, Cheng et al. (2013) argumentam que o genótipo é ainda o mais importante e comumente limitante fator para a androgênese de pimentão. Alguns genótipos responderam melhor aos pre-tratamentos, demandando condições diferentes dentro da mesma espécie.

As combinações de reguladores de crescimento ou sua ausência em meio com o dobro da concentração de sacarose resultaram em aumento da oxidação e redução do calejamento em comparação aos tratamentos com os reguladores 2,4-D e picloran isoladamente (Tabela 1A). Por outro lado, o NAA não promoveu crescimento de calos significativo ao final do experimento. É de suma importância o papel das interações entre os componentes do meio de cultura, sendo os principais os reguladores de crescimento, pois esses disparam as divisões celulares morfogênicas (Fernandes, 1987).

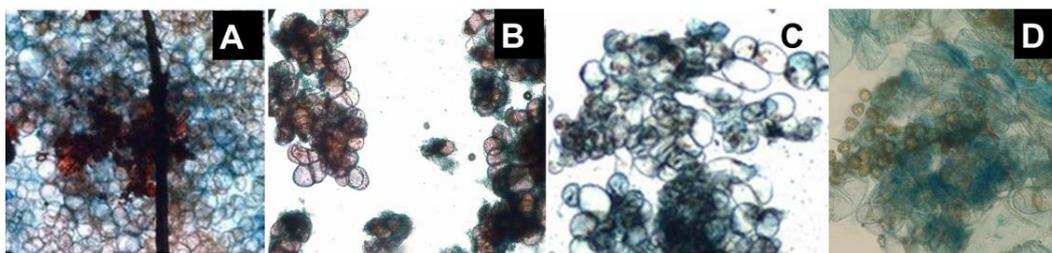


Figura 2- Teste com os corantes Carmin acético e azul de Evans para os calos obtidos a partir das anteras. A a C - Os setores avermelhados indicam células com características meristemáticas (em divisão) e em azul as células não responsivas. D – detalhe de grãos de pólen sem sinais de germinação do tubo polínico ou resposta morfogênica. Barra = 100 μ m.

Caracterização morfológica dos botões e associação com fase do microsporo

Os genótipos avaliados apresentaram diferentes tamanhos de botões e anteras (Figura 3). Foi verificado um aumento do comprimento das anteras em botões sucessivamente maiores para os dois clones avaliados (Figura 3). O saco polínico estava em formação em botões de 4,51 a 5,00 e bem delimitado abrigando microsporócitos em desenvolvimento em botões de 5,01 a 5,50. As tétrades e grãos de pólen estavam presentes nos botões com diâmetro superior a 5,51 mm (Figura 3).

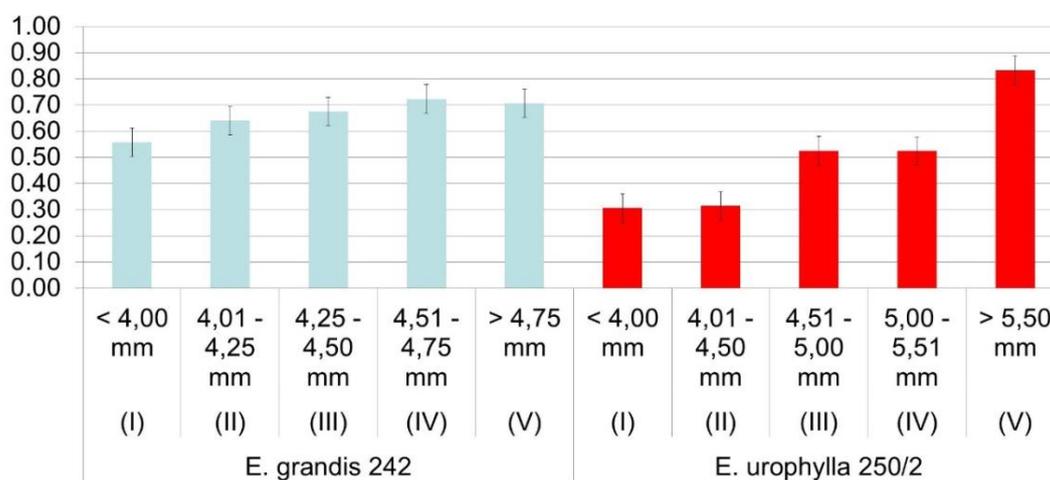


Figura 3 – Média do comprimento médio das anteras encontradas por classe de diâmetro de botões para os clones 242 e 250/2.

As duas primeiras classes de diâmetro dos botões apresentaram microsporócitos ou tétrades. Contudo, as anteras de das demais classes de botões do clone 250/2 (Figura 4) e 242

(dados não apresentados) apresentavam dimensões crescentes e grãos de pólen formados. A parte basal do opérculo interno dos botões florais do clone 250/2 apresentou-se ligeiramente maior que a do externo, coincidindo com o diâmetro de botões apresentando os estágios de tetrade a grãos de pólen. Isso não foi observado para o clone 242.

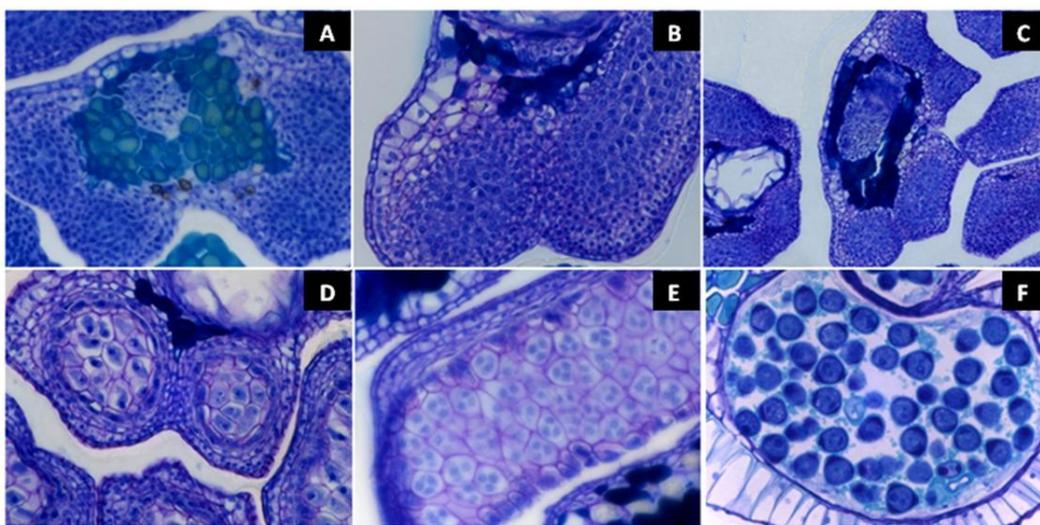


Figura 4 - Cortes de anteras de botões florais do clone 250/2 em classes de diâmetro crescentes. A – Classe <4,00 mm: ausência de microsporócitos; B e C – Classe de 4,01 a 4,50 mm: saco polínico em formação; D – Classe de 4,51 a 5,00 mm: microsporócitos em desenvolvimento e saco polínico bem delimitado; E – Classe de 5,01 a 5,50 mm: tétrades; F – Classe >5,51 mm: grãos de pólen formados. A, B, D, E e F: Aumento de 40x. C: Aumento de 20x.

O clone 250/2 apresentou maiores valores para as classes de diâmetro dos botões, porém, menores dimensões das anteras, exceto pela classe de botões de maior diâmetro. Para este genótipo, microsporócitos estavam ausentes nas anteras dos botões com menos de 4,00 e em diferenciação na classe de 4,01 a 4,50. Os dois genótipos avaliados quanto ao desenvolvimento do botão floral, anteras e micrósporos evidenciaram um comportamento diferenciado. A diferença no tamanho entre os grãos de pólen dentro de um mesmo estágio de desenvolvimento da antera ou botão também foi observada. Esta observação demonstra a necessidade da determinação de características dos botões para cada clone de forma isolada no objetivo de se aumentar a frequência de micrósporos em um estágio de desenvolvimento mais favorável à androgênese.

Apesar de as tétrades e grãos de pólen estarem presentes nos botões classificados na maior classe de diâmetro, a presença destes estágios em menor frequência em classes de diâmetro menor sugere que outros fatores podem também estar influenciando o desenvolvimento dos micrósporos. Estas diferenças também podem ser derivadas de uma característica inerente aos clones avaliados ou função de uma condição de maior estresse resultando na aceleração do desenvolvimento dos grãos de pólen.

Existem relatos de que o tamanho do micrósporo ou grão de pólen pode favorecer o processo de regeneração via androgênese e a associação ao estágio de desenvolvimento do micrósporo uninucleado como mais adequado para a regeneração (Ibrahim et al. 2014; Dunwell, 2010).

CONCLUSÕES

Dentre os dez genótipos avaliados, os clones 53, 217, 242 e 250/2 apresentaram maior calejamento.

Os indutores de crescimento 2,4-D e o picloran foram mais efetivos na indução enquanto NAA inibiu o calejamento na concentração avaliada.

O estágio de botão floral com maior frequência de micrósporos entre tétrades e grãos de pólen coincide com o diâmetro imediatamente anterior a antese para os genótipos avaliados.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho contou com apoio da Cenibra, CNPq e Universidade Federal de Viçosa.

REFERÊNCIAS

ASSIS, T. F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, v. 18, p. 32-51, 1996.

BANDEIRA, F. S.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; LANI, E. R. G. Aclimatização ex vitro de plantas propagadas pela enxertia in vitro de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Revista Árvore**, v. 31, p.773-781, 2007.

CARDOSO, H. G.; CAMPOS, M. C.; PAIS, M. S.; PEIXE, A. Use of morphometric parameters for tracking ovule and microspore evolution in grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. "Aragonez") and evaluation of their potential to improve in vitro somatic embryogenesis efficiency from gametophyte tissues. **In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant**, v. 46, p.499–508, 2010.

CHENG, Y.; MA, R. L.; JIAO, Y. S.; QIAO, N.; LI, T. T. Impact of genotype, plant growth regulators and activated charcoal on embryogenesis induction in microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). **South African Journal of Botany**, v. 88, p. 306–309, 2013.

D'ONOFRIO, C. & MORINI, S. Simultaneous regeneration of different morphogenic structures from quince leaves as affected by growth regulator combination and treatment length. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 321-325, 2003/4.

DUNWELL, J. M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 377–424, 2010.

FERNANDES, M. I. B. de M. Perspectivas da biotecnologia para o melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, p. 881-896, 1987.

GREWAL, R. K.; LULSDORF, M.; CROSER, J.; OCHATT, S.; VANDENBERG, A.; WARKENTIN, T. D. Doubled-haploid production in chickpea (*Cicer arietinum* L.): role of stress treatments. **Plant Cell Reports**, v. 28, p.1289–1299, 2009.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B.; TORRES, A.; CALDAS, L.; BUSO, J. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres et al., **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, vol. 2, p. 533-568, 1999.

HÖFER, M. Regeneration of androgenic embryos in apple (*Malus x domestica* Borkh.) via anther and microspore culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, p. 709-716, 2005.

INDUSTRIA BRASILEIRA DE ARVORES PLANTADAS-IBÁ. Brasília, DF: 2017. Disponível em: <<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022>> Acesso em: 02 de setembro de 2023.

IBRAHIM, A. M.; KAYAT, F. B.; HUSSIN, Z. E. S. M.; SUSANTO, D.; ARIFFULAH, M. Determination of Suitable Microspore Stage and Callus Induction from Anthers of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). **The Scientific World Journal**, 2014.

KUMAR, A.; PALNI, L. M. S.; SOOD, A.; SHARMA, M.; PALNI, U. T.; GUPTA, A. K. Heat-shock somatic embryogenesis in callus cultures of gladiolus in the presence of high sucrose. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 77, p. 73-78, 2002.

MILIONI, D.; FRANZ, G.; SUNG, R.; HATZOPOULOS, P. Gene expression during heat – shock in embryogenic carrot cell lines. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, p. 221-228, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Somatic embryogenesis, and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis* Sm. **Current Science**, v. 88, p. 1311-1316, 2005.

QU, G. Z.; LIU, G. F.; WANG, Y. C.; JIANG, J.; WANG, M. H. Efficient Tissue Culture and Agrobacterium-mediated transformation of haploid Poplar derived from anthers. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, p. 559–563, 2007.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v. 31, p. 417-426, 2007.

WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. C.; MOKOTEDI, M. E. O.; JAIN, S. M. Micropropagation of *Eucalyptus*. In: Jain S.M., Ishii K. (eds.). Micropropagation of Woody Trees and Fruits, **Forestry Sciences**, v. 75, p. 217-244, 2003.

ZHAO, L.; LIU, L.; WANG, J.; GUO, H.; GU, J.; ZHAO, S.; LI, J.; XIE, Y. Development of a new wheat germplasm with high anther culture ability by using a combination of gamma-ray irradiation and anther culture. **Journal of Science Food and Agriculture**, 2014.

ZOBEL, B. J.; WYK, G. V.; STAHL, P. **Growing exotic forests**. John Wiley and Sons, New York, 1987.