

MIRANDA TITON

**INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA
EM *Eucalyptus grandis***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

T621i
2005

Titon, Miranda, 1975-

Indução de embriogênese somática em *Eucalyptus grandis* / Miranda Titon. – Viçosa : UFV, 2005.
xii, 107f. : il. ; 29cm.

Orientador: Aloisio Xavier

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Propagação. 2. *Eucalyptus grandis*.
3. Propagação vegetativa. 4. Clonagem. 5. Micropropagação. 6. Embriogênese somática. 7. Cultura de tecido.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDO adapt. CDD 634.9232328

MIRANDA TITON

INDUÇÃO DE EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA
EM *Eucalyptus grandis*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2005.

Prof. Wagner Campos Otoni
(Conselheiro)

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike
(Conselheiro)

Prof. José Mauro Gomes

Pesq. Ivar Wendling

Prof. Aloisio Xavier
(Orientador)

Aos meus pais Artemio e Julieta.

Ao Marcio Leles.

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda a sabedoria, por tudo.

À minha família, pelo apoio, pelo amor e pela compreensão.

Ao meu noivo Marcio, que vivenciou comigo todos os momentos deste curso, pelo carinho, apoio e compreensão.

Ao Seu Cícero e Dona Catarina, pela acolhida, pelo carinho e auxílio.

Ao professor Aloisio Xavier, pela paciência, pela dedicação e pela orientação segura e equilibrada, além da amizade que demonstrou durante a convivência deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade e apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Engenheiro Florestal Rodrigo Nascimento de Paula, à Ana Paula Andrade e ao Flávio Siqueira D'Ávila, pelo auxílio e pelo convívio durante a realização dos experimentos.

A todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), especialmente à Lili, por todo o aprendizado e pela oportunidade de convívio.

Aos meus conselheiros, Prof. Wagner Campos Otoni e Prof. Sérgio Yoshimitu Motoike e aos membros da banca examinadora, pelas críticas e sugestões.

Às amigas Renata, Tatiana, Solange, Fabiana e Andréa, pelo convívio agradável e por todo o carinho e apoio.

Aos amigos do grupo de Pesquisa e Desenvolvimento em Silvicultura Clonal, Elisa, Fabiana, Fernanda e Glêison, pela ajuda e troca de experiência.

Aos funcionários do Departamento de Engenharia Florestal, em especial à Rita, secretária do Curso de Pós-Graduação.

Às Faculdades Federais Integradas de Diamantina (FAFEID), pela oportunidade de ingressar na carreira do magistério.

A todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

MIRANDA TITON, filha de Artemio Titon e Julieta Regina Titon, nasceu em 23 de abril de 1975, em Francisco Beltrão, PR.

Em 1989, concluiu o 1º grau na Escola Estadual de 1º e 2º Graus Antonio Ometto, em Matupá, MT.

Em 1992, concluiu o Curso de Magistério na Escola Estadual de 1º e 2º Graus Antonio Ometto, em Matupá, MT.

Em 1998, diplomou-se Engenheira Florestal pela Universidade Federal de Mato Grosso, em Cuiabá, MT.

Em março de 2001 obteve o título de “Magister Scientiae” em Ciência Florestal, na área de concentração em Silvicultura, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em abril de 2001, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de Doutorado, na área de concentração em Silvicultura, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2005.

Em setembro de 2004, foi contratada como Professora Substituta pelo Departamento de Engenharia Florestal das Faculdades Federais Integradas de Diamantina – FAFEID, em Diamantina, MG.

CONTEÚDO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. MELHORAMENTO GENÉTICO E CLONAGEM DE <i>EUCALYPTUS</i>	3
2.2. MICROPROPAGAÇÃO DE <i>EUCALYPTUS</i>	5
2.3. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA	6
2.4. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM <i>EUCALYPTUS</i>	8
2.4.1. Iniciação das culturas embriogênicas	10
2.4.2. Manutenção, multiplicação e cultura massal.....	15
2.4.3. Maturação e germinação de embriões somáticos	20
2.4.4. Aclimação	21
2.4.5. Encapsulamento de embriões somáticos	22
2.4.6. Estabilidade genética e avaliações em campo	22
2.4.7. Aplicações da embriogênese somática na clonagem de <i>Eucalyptus</i>	23
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
Capítulo I	
EFEITO DO 2,4-D NA INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS EM COTILÉDONES E HIPOCÓTILOS DE <i>Eucalyptus grandis</i>	33
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	33
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1. MATERIAL EXPERIMENTAL	35

2.2. OBTENÇÃO DOS EXPLANTES.....	35
2.3. INDUÇÃO DE CALOS.....	36
2.4. CONDUÇÃO E AVALIAÇÕES EXPERIMENTAIS.....	40
3. RESULTADOS	41
4. DISCUSSÃO	50
5. CONCLUSÕES.....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

Capítulo II

EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM <i>Eucalyptus grandis</i> : EFEITO DOS REGULADORES DE CRESCIMENTO DICAMBA E PICLORAM	58
RESUMO.....	58
ABSTRACT.....	58
1. INTRODUÇÃO.....	59
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
2.1. MATERIAL EXPERIMENTAL	60
2.2. OBTENÇÃO DOS EXPLANTES.....	60
2.3. INDUÇÃO DE CALOS.....	61
2.4. SUBCULTIVO DOS CALOS.....	62
2.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA	63
3. RESULTADOS	63
3.1. INDUÇÃO DE CALOS.....	63
3.2. SUBCULTIVO DOS CALOS.....	67
3.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA	67
4. DISCUSSÃO	68
5. CONCLUSÕES.....	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

Capítulo III

EFEITO DOS MEIOS DE CULTURA MS, WPM E JADS NA INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS EM EXPLANTES DE <i>Eucalyptus grandis</i> E <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	75
RESUMO.....	75
ABSTRACT.....	75
1. INTRODUÇÃO.....	76
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	77

2.1. MATERIAL EXPERIMENTAL	77
2.2. OBTENÇÃO DOS EXPLANTES.....	77
2.3. INDUÇÃO DE CALOS.....	78
2.3.1. Explante juvenil.....	78
2.3.2. Explante adulto.....	79
3. RESULTADOS	80
3.1. EXPLANTE JUVENIL	80
3.2. EXPLANTE ADULTO	83
4. DISCUSSÃO	85
5. CONCLUSÕES.....	87
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

Capítulo IV

EFEITO DE FONTES DE CARBOIDRATOS NA INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS EM COTILÉDONES DE <i>Eucalyptus grandis</i>	90
RESUMO.....	90
ABSTRACT.....	90
1. INTRODUÇÃO.....	91
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	92
2.1. MATERIAL EXPERIMENTAL	92
2.2. OBTENÇÃO DOS EXPLANTES.....	92
2.3. INDUÇÃO DE CALOS.....	93
2.3.1. Experimento 1	93
2.3.2. Experimento 2	94
2.3.3. Avaliações	94
3. RESULTADOS	95
3.1. EXPERIMENTO 1	95
3.2. EXPERIMENTO 2	98
4. DISCUSSÃO	100
5. CONCLUSÕES.....	103
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
4. CONCLUSÕES GERAIS	106

RESUMO

TITON, Miranda, D.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005.
Indução de embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. Orientador:
Aloisio Xavier. Conselheiros: Wagner Campos Otoni e Sérgio Yoshimitsu
Motoike.

O presente trabalho teve por objetivos: a) avaliar o efeito dos reguladores de crescimento 2,4-D, dicamba e picloram na indução de embriogênese somática em explantes juvenis de *Eucalyptus grandis*; b) avaliar o efeito dos meios de cultura MS, WPM e JADS na indução de calos embriogênicos em cotilédones de *E. grandis* e em folhas e entrenós de um clone híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis*; e c) avaliar o efeito de fontes de carboidratos na indução de calos embriogênicos em cotilédones de *E. grandis*. Os parâmetros avaliados foram o percentual de explantes calejados, a intensidade de calejamento, a oxidação, a massa fresca de calos, a rizogênese, a coloração e a textura dos calos, bem como a presença de estruturas embriogênicas. Nos experimentos em que se utilizou 2,4-D, melhores resultados de calogênese foram observados em cotilédones, nas concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹, sendo 30 dias no escuro o melhor tempo e condição de indução. Os calos apresentaram coloração amarelo-clara a amarelo-escura e textura semicompacta a semifriável, porém não foram observadas estruturas embriogênicas. Os tratamentos de subcultivo em meio contendo diferentes combinações de reguladores de crescimento, acrescidos de PVP ou carvão ativado, não mostraram resultados satisfatórios. As auxinas dicamba e picloram demonstraram-se promissoras no

desenvolvimento de um protocolo de embriogênese somática para *E. grandis*, sendo observadas estruturas semelhantes a embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento quando se utilizou 0,5 mg L⁻¹ de dicamba ou 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ de picloram, em explantes cotiledonares. Em relação aos meios de cultura MS, WPM e JADS, maior massa fresca de calos e menores percentuais de oxidação e de regeneração de raízes foram observados em cotilédones de *E. grandis*, utilizando-se o meio MS. Diferença expressiva foi observada em calos obtidos em folhas do clone híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis*, onde o meio WPM foi mais efetivo na formação de raízes em relação aos meios MS e JADS. Quanto à fonte de carboidrato, as combinações de glicose e sacarose com maltose ou frutose, em algumas situações, apresentaram maior percentual de calejamento e massa fresca de calos em relação à utilização de sacarose como única fonte de carboidrato. No entanto, quanto ao aspecto dos calos, melhores resultados foram obtidos quando se utilizaram 1,5 e 3% de sacarose, sendo observados calos de textura semifriável e de coloração amarelo-clara, enquanto em concentrações mais altas de sacarose houve tendência de maior compactação e oxidação. O glicerol promoveu aumento na massa fresca de calos nas concentrações de 0,5 e 1%, sendo, a partir dessa concentração, observado decréscimo dos valores desse parâmetro. Os resultados obtidos neste trabalho são concordantes com os da literatura existente, em que se relata a dificuldade de obtenção de um protocolo eficiente e reproduzível de embriogênese somática para espécies de *Eucalyptus*. Entretanto, em virtude da importância e do potencial de aplicação da embriogênese somática na silvicultura clonal, salienta-se a necessidade de realização de novos estudos relacionados a essa área de conhecimento, os quais envolvam espécies do gênero *Eucalyptus*.

ABSTRACT

TITON, Miranda, D.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2005. **Somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus grandis***. Adviser: Aloisio Xavier. Committee Members: Wagner Campos Otoni and Sérgio Yoshimitsu Motoike.

The present work had the following objectives: a) to evaluate the effect of the growth regulators 2,4-D, dicamba and picloram on the induction of somatic embryogenesis from juvenile explants of *Eucalyptus grandis*; b) to evaluate the effect of MS, WPM and JADS culture media, on embryogenic callus induction from cotyledons of *E. grandis* and leaves and stem internodes of a *E. urophylla* x *E. grandis* hybrid clone; and c) to evaluate the effect of carbohydrate sources on the embryogenic callus induction from cotyledons of *E. grandis*. The appraised parameters were the percentage of explant producing calli, the intensity of callus formation, oxidation, callus fresh weight, rhizogenesis, callus coloration and texture, as well as the presence of embryogenic structures. In experiments with 2,4-D the best results for callus production were found with cotyledons, being 5 and 10 mg L⁻¹ and 30 days in the dark the best time and induction conditions. Callus coloration varied from light yellow to dark yellow and semi-compact to semi-friable texture, however no embryogenic structures were observed. Subculture in medium containing different combinations of growth regulators, added of PVP or activated charcoal, did not give good results. Dicamba and picloram showed potential for developing a protocol for somatic embryogenesis of *E. grandis*, producing

structures similar to somatic embryos in different developmental stages with dicamba (0.5 mg L^{-1}) or picloram (5.0 and 10.0 mg L^{-1}), from cotyledon explants. In relation to the culture media MS, WPM and JADS, larger callus fresh weight and smaller percent of oxidation and root regeneration were observed in cotyledons of *E. grandis* with MS medium. Significant difference was observed in calli obtained from leaves of *E. urophylla* x *E. grandis* hybrid, where WPM medium was more effective for root formation compared to MS and JADS. Regarding to the carbohydrate source, the combinations of glucose and sucrose with maltose or fructose, in some situations, presented larger percent of callus production and callus fresh weight compared to the use of sucrose as only carbohydrate source. However, in relation to the callus aspect, better results were obtained with 1,5 and 3% of sucrose, giving semi-friable light-yellow calli, whereas in higher sucrose concentrations there was a tendency for increased hardness and oxidation. Glycerol at 0,5 and 1% increased callus fresh weight, but higher concentrations lowered these values. The results obtained in this work agrees with the existent literature on the difficulty of obtaining an efficient and reproducible protocol for somatic embryogenesis of *Eucalyptus* species. However, because of the importance and potential for application of somatic embryogenesis in clonal silviculture, it is emphasized the need for new studies on this area, involving species of the *Eucalyptus*.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As espécies de *Eucalyptus* estão entre as árvores mais plantadas em todo o mundo, principalmente devido às suas características de rápido crescimento e de adaptação a uma grande variedade de condições de solo e clima. Atualmente, o Brasil conta com aproximadamente três milhões de hectares plantados, demonstrando que o gênero apresenta múltiplos usos, sendo um forte substituto das madeiras de espécies tropicais.

Os métodos clássicos de melhoramento florestal têm dado ênfase à produção de árvores e populações geneticamente superiores, com características que atendam à demanda quantitativa e qualitativa de serviços, bens e produtos obtidos das florestas. Entretanto, uma limitação aos métodos convencionais é o longo tempo requerido para obtenção dessas populações melhoradas, justificando, em parte, a adoção de técnicas de clonagem.

A clonagem de *Eucalyptus* no Brasil foi implementada em escala comercial na década de 1970, sendo seu sucesso reconhecido inclusive no exterior (Zobel, 1993). Em relação ao processo de produção de mudas clonais, consideráveis avanços, principalmente em relação ao percentual e à qualidade de enraizamento, assim como na redução do tempo para a formação da muda, foram obtidos nos últimos anos com o desenvolvimento das técnicas de microestaquia (Assis et al., 1992; Xavier e Comério, 1996) e miniestaquia (Xavier e Wendling, 1998; Wendling et al., 2000).

Entre as alternativas apontadas para a maximização da clonagem e promissoras no processo de propagação vegetativa de material genético selecionado está o uso da embriogênese somática. Como técnica de propagação, a embriogênese somática apresenta-se como ferramenta indicada na obtenção de mudas clonais, visto esta explorar o máximo da juvenilidade e pela possibilidade de propagação em larga escala. Aliado a isso, a técnica também possibilita a regeneração e multiplicação de plantas transformadas geneticamente ou obtidas por hibridação somática.

Nos últimos anos, a embriogênese somática tem sido reportada para várias espécies de *Eucalyptus*, como *E. citriodora* (Muralidharan e Mascarenhas, 1987; 1995), *E. nitens* (Ruaud et al., 1997; Bandyopadhyay et al., 1999; Bandyopadhyay e Hamill, 2000), *E. grandis* (Watt et al., 1991; Major et al., 1997), *E. urophylla* (Tibok et al., 1995; Arruda et al., 2000), *E. dunnii* (Termignoni et al., 1996) e *E. globulus* (Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002). No entanto, a maioria dos autores relata a dificuldade de obtenção de um protocolo eficiente e reproduzível de regeneração de *Eucalyptus* por embriogênese somática, uma vez que ainda existem problemas básicos a serem solucionados, como o número reduzido de embriões formados e a baixa taxa de conversão dos embriões em plantas.

Considerando a importância e o potencial de aplicação da embriogênese somática na propagação clonal, bem como a carência de uma metodologia eficiente para *Eucalyptus*, o presente trabalho teve por objetivo avaliar:

- O efeito dos reguladores de crescimento 2,4-D, dicamba e picloram na indução de embriogênese somática em explantes juvenis de *Eucalyptus grandis*.
- O efeito dos meios de cultura MS, WPM e JADS na indução de calos embriogênicos em cotilédones de *E. grandis* e em folhas e entrenós de um clone híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis*.
- O efeito de fontes de carboidratos na indução de calos embriogênicos em cotilédones de *E. grandis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Melhoramento genético e clonagem de *Eucalyptus*

No Brasil, espécies do gênero *Eucalyptus* são melhoradas por várias empresas florestais privadas, que, via de regra, estão associadas a indústrias de papel e celulose, de móveis, siderúrgicas, entre outras. Também várias universidades e instituições públicas e privadas colaboram de alguma forma com o melhoramento do *Eucalyptus* (Resende, 1999).

Atualmente, a estratégia de melhoramento genético baseia-se no melhoramento de espécies associado com a exploração de híbridos interespecíficos e a clonagem em escala comercial, visando produzir, capturar e multiplicar combinações superiores, no sentido de aumentar a eficiência dos programas de melhoramento (Resende, 1999; Silva et al., 2003).

Das alternativas de grande importância e de grande impacto dentro dos programas de melhoramento genético, a hibridação interespecífica é, sem dúvida, uma das estratégias mais seguras para obter as características desejáveis, considerando-se a velocidade de geração desses indivíduos e, especialmente, a velocidade de integração deles no processo produtivo. O cruzamento de espécies que possuem características superiores, diferenciadas entre si, permite produzir árvores especialmente projetadas para determinada finalidade, com maior quantidade de atributos desejados. Aliado a isso, a capacidade do gênero *Eucalyptus* de produzir híbridos férteis possibilita o cruzamento de híbridos entre si ou com

outras espécies, no sentido de obter composições gênicas múltiplas e em diferentes proporções (Silva et al., 2003).

A propagação clonal apresenta a habilidade de capturar o potencial genético total dos materiais selecionados, ou seja, os componentes da variância genética aditiva e não-aditiva, resultando em maiores ganhos dentro de uma mesma geração de seleção (Eldridge et al., 1993). Com a reprodução sexuada, somente o potencial genético aditivo é capturado, e a segregação e recombinação gênica verificadas em espécies alógamas resultam em alto grau de variabilidade, enquanto a reprodução por vias vegetativas resulta em uniformidade de crescimento, forma, qualidades tecnológicas, bem como em uma série de outras características selecionadas ou não (Assis, 1996).

Das técnicas de propagação vegetativa de *Eucalyptus* desenvolvidas em escala comercial, a estaquia é a mais amplamente utilizada, pelo fato de seus princípios já serem bem conhecidos, o que permitiu o desenvolvimento da silvicultura clonal intensiva em diversas partes do mundo (Xavier, 2003).

Devido às dificuldades de enraizamento encontradas na propagação por estaquia de algumas espécies e clones de *Eucalyptus*, principalmente no que envolve material adulto (Assis, 1997), técnicas da cultura de tecidos, como a micropropagação, vêm sendo utilizadas no rejuvenescimento de clones, restaurando, dessa maneira, sua competência para o enraizamento. O aprimoramento no enraizamento de estacas tem sido conseguido também com o desenvolvimento da microestaquia (Assis et al., 1992; Xavier e Comério, 1996) e da miniestaquia (Xavier e Wendling, 1998; Wendling et al., 2000), que possibilitaram consideráveis ganhos, principalmente quanto ao aumento dos percentuais e da qualidade de enraizamento e à redução do tempo para a formação da muda (Xavier et al., 2001; Titon et al., 2002; 2003).

Entretanto, ainda residem dificuldades que têm limitado a propagação de forma plena na silvicultura clonal, conduzindo à busca de novas tecnologias, como a embriogênese somática. Como técnica de propagação, a embriogênese somática, a princípio, apresenta-se como ferramenta indicada na obtenção de mudas clonais, visto esta explorar o máximo da juvenilidade e pelo seu potencial de utilização em

larga escala mediante a utilização de sementes sintéticas. Além disso, a embriogênese somática constitui-se numa técnica básica para outras aplicações biotecnológicas, incluindo transformação genética, hibridação somática e preservação de germoplasma.

Nas últimas décadas, a formação de embriões somáticos ou estruturas embriogênicas tem sido reportada para um grande número de espécies lenhosas, incluindo algumas do gênero *Eucalyptus*.

2.2. Micropropagação de *Eucalyptus*

A micropropagação compreende o cultivo asséptico de partes das plantas em condições controladas de nutrição, umidade, luz e temperatura e constitui a aplicação mais direta da cultura de tecidos vegetais (Hartmann et al., 1997; Grattapaglia e Machado, 1998). Ela pode ser alcançada por meio de proliferação de gemas axilares, iniciação de gemas adventícias (organogênese) ou embriogênese somática.

Watt et al. (2003), em sua revisão sobre micropropagação de *Eucalyptus*, listaram 65 trabalhos realizados na última década, totalizando 20 espécies e 6 híbridos, sendo as espécies *E. globulus*, *E. grandis*, *E. nitens* e o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* os mais pesquisados. A organogênese direta contribuiu com 32 trabalhos; a organogênese indireta com 25; e somente 8 trabalhos enfocaram a embriogênese somática. Os explantes mais comumente utilizados foram plântulas e gemas axilares obtidas de plantas crescendo em campo (61% e 21%, respectivamente).

Entre as principais vantagens da micropropagação estão a rapidez em relação a outros métodos de multiplicação vegetativa e a possibilidade de sua utilização quando a propagação por técnicas convencionais for muito difícil ou impossível de ser realizada (Chaperon, 1987; Bonga e Von Aderkas, 1992; George, 1993). Em adição, técnicas de transformação genética são dependentes do cultivo *in vitro* para regeneração e multiplicação dos novos genótipos (Watt et al., 1999).

A micropropagação é uma técnica que pode ser usada tanto no resgate quanto no rejuvenescimento de árvores adultas (Gonçalves, 1982; Hackett, 1987; Bonga e Von Aderkas, 1992; Hackett e Murray, 1993). De modo geral, o rejuvenescimento ou, pelo menos, o restabelecimento da competência para o enraizamento em *Eucalyptus* é obtido após 10 a 12 subcultivos (Assis, 1996). Uma aplicação direta do rejuvenescimento pela micropropagação seriada na área florestal é a microestaquia, a qual é baseada no máximo aproveitamento da juvenilidade dos tecidos vegetais (Assis et al., 1992; Xavier e Comério, 1996).

Quanto ao processo de produção de mudas, a microestaquia apresentou resultados superiores aos da miniestaquia, como o melhor desempenho e velocidade de enraizamento e a qualidade do sistema radicular de clones de *Eucalyptus* (Xavier et al., 2001; Titon et al., 2002). Em termos práticos, a microestaquia aumentou a eficiência de enraizamento, acelerando o processo de produção de mudas em viveiro, reduzindo o tempo de enraizamento em casa de vegetação, disponibilizando, assim, as estruturas de enraizamento mais rapidamente e, ao mesmo tempo, formando mudas com maior vigor vegetativo (Titon et al., 2002).

Avaliações em campo realizadas com plantas de *Eucalyptus* micropropagadas por meio de proliferação de gemas axilares indicaram que estas exibiram taxas de crescimento e uniformidade comparáveis ou superiores às aquelas obtidas de sementes ou produzidas pela estaquia (Rockwood e Warrag, 1994; Watt et al., 1995). De acordo com Oliveira (2003), as técnicas de micropropagação e microestaquia apresentaram melhor desempenho silvicultural em fase inicial de crescimento, em relação à miniestaquia e estaquia, em avaliações realizadas até os 24 meses de idade em teste clonal.

2.3. Embriogênese somática

A embriogênese somática pode ser descrita como o processo pelo qual células haplóides ou somáticas desenvolvem estruturas semelhantes a embriões zigóticos, por meio de uma seqüência ordenada de estádios embriogênicos característicos, sem ocorrência de fusão dos gametas (Guerra et al., 1999; Jiménez,

2001). Durante o seu desenvolvimento, embriões somáticos passam por estádios similares àqueles observados na embriogênese zigótica, caracterizando-se como estrutura bipolar sem nenhuma conexão vascular com o tecido materno (Howell, 1998; Vicient e Martinez, 1998).

A embriogênese somática pode ser natural ou *in vitro*. No primeiro caso, células dos tecidos embrionários podem ser direcionadas para esta rota de desenvolvimento, como acontece com o sistema da embriogenia adventícia ou nucelar em *Citrus* spp., onde os embriões apomíticos originam-se por gemação a partir de células do nucelo. Esses embriões apomíticos são geneticamente idênticos à planta-mãe, tendo como consequência desse fenômeno a perpetuação de populações clonais por meio de semente (Guerra et al., 1999).

Na embriogênese somática *in vitro* ou induzida, células de diferentes estádios de diferenciação podem ser induzidas por estímulos ambientais ou químicos e, se reprogramadas, adquirirem novas competências morfogenéticas (Guerra et al., 1999). O método mais usual para indução da competência embriogênica consiste na exposição de explantes a altas concentrações de auxinas durante períodos variáveis de tempo e, então, transferência de células para meio livre de auxinas (Vicient e Martinez, 1998).

Formas direta ou indireta podem ocorrer no processo de embriogênese somática. Na forma direta, os embriões somáticos formam-se diretamente sobre a superfície dos explantes. Já na embriogênese indireta, calos embriogênicos são induzidos e na sua superfície são formados os embriões somáticos (George, 1993). A embriogênese somática indireta é o método mais comum de regeneração de embriões somáticos para usos práticos e tem sido descrita em centenas de espécies (Bajaj, 1995).

Material genético, tipos de explante, condições de cultura como a luz (intensidade, qualidade e fotoperíodo), concentração do meio basal (sacarose, nível de nitrogênio e composição), elementos minerais, agentes gelificantes, reguladores de crescimento e pH do meio de cultura são importantes fatores que afetam o processo de embriogênese somática.

O fator genético é de extrema relevância, uma vez que diferentes genótipos podem apresentar requerimentos diferentes de cultura para a indução de estruturas embriogênicas (Tautorus et al., 1991; Komamine et al., 1992). Além do material genético, é importante definir o tipo de explante a ser utilizado e a época de coleta, uma vez que vários tecidos da mesma planta ou tecidos em diferentes estádios de desenvolvimento podem resultar em diferentes respostas quanto à indução de tecido embriogênico (Vendrame, 1994).

Os tecidos utilizados como fonte de explantes para obtenção de embriões somáticos têm sido variados: discos foliares, segmentos internodais, hipocótilos, cotilédones e tecidos florais. De forma geral, os tecidos derivados de embriões imaturos têm apresentado melhores respostas à indução de embriogênese.

Esforços para induzir embriogênese somática têm sido descritos para muitas espécies de interesse econômico. As metodologias utilizadas envolvem mudanças no meio de cultura, estabelecimento de diferentes tipos ou concentrações de reguladores de crescimento e/ou controle de outras condições de cultura, como a densidade de células, nutrientes ou iluminação. A característica notável da embriogênese somática é que simples manipulações podem desencadear séries de eventos que levam à formação do embrião (Howell, 1998).

2.4. Embriogênese somática em *Eucalyptus*

A regeneração de plantas por embriogênese somática já foi relatada para mais de 50 espécies lenhosas, sendo aproximadamente 20 famílias de angiospermas e mais de uma dúzia de espécies de coníferas (Haines, 1994). Contudo, tratando-se de espécies florestais, maiores avanços foram alcançados em coníferas, particularmente *Abies*, *Picea* e *Pinus* (Watt et al., 1999).

Muralidharan e Mascarenhas (1995), em sua revisão, citam os primeiros trabalhos de embriogênese somática realizados com *Eucalyptus*: Lakshmi Sita (1981) descreveu a formação de estruturas semelhantes a embriões em cultura de suspensão celular de *E. citriodora* e *E. grandis* derivados de explantes caulinares de árvores maduras. No entanto, não foi relatado o posterior desenvolvimento de

embriões ou plantas. Ouyang et al. (1981), cultivando explantes de plântulas de um cultivar de *Eucalyptus* denominado “Leichow nº 1”, obtiveram inicialmente uma massa celular embriogênica, da qual foram obtidos embriões somáticos diferenciados que, posteriormente, originaram plantas. Boulay (1987) também induziu embriogênese somática em calos derivados de hipocótilos e entrenós de *E. gunnii*.

Muralidharan e Mascarenhas (1987) desenvolveram um sistema de indução direta de embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de sementes maduras de *E. citriodora*. Posteriormente, este sistema foi otimizado, resultando em alta frequência de embriogênese somática secundária sem o envolvimento da fase de calo, e a cultura embriogênica foi mantida durante longo período (Muralidharan et al., 1989; Muralidharan e Mascarenhas, 1995).

Nos últimos anos, a embriogênese somática foi também relatada para *E. grandis* (Watt et al., 1991; Major et al., 1997), *E. dunnii* (Termignoni et al., 1996), *E. nitens* (Ruaud et al., 1997; Bandyopadhyay et al., 1999; Bandyopadhyay e Hamill, 2000), *E. urophylla* (Tibok et al., 1995; Arruda et al., 2000) e *E. globulus* (Nugent et al., 1997, 2001; Bandyopadhyay et al., 1999; Pinto et al., 2002). No entanto, um dos principais entraves da propagação clonal via embriogênese somática é a baixa taxa de conversão de embriões somáticos em plantas. Em *E. grandis*, um baixo número de plantas regeneradas foi obtido a partir de folhas de plantas jovens (Watt et al., 1991). Em *E. dunnii*, Termignoni et al. (1996) produziram embriões a partir de plântulas com três dias de germinação, mas o desenvolvimento de cotilédones foi bastante reduzido. Mais recentemente, no Brasil, Termignoni et al. (1998) obtiveram alta frequência de plantas regeneradas a partir de explantes de árvores maduras, porém detalhes do protocolo desenvolvido não foram fornecidos (Patente N^o PI 9801485-4 INPI). Pinto et al. (2002) também observaram a conversão de embriões somáticos em plantas em *E. globulus*. Em outras espécies de *Eucalyptus*, somente estruturas semelhantes a embriões ou embriões somáticos em estádios iniciais foram produzidos.

2.4.1. Iniciação das culturas embriogênicas

2.4.1.1. Obtenção dos explantes

Para sua viabilidade comercial, a propagação clonal via embriogênese somática deve produzir grande número de plantas, ter um custo efetivo e utilizar explantes de árvores de alto valor genético. Um dos maiores problemas encontrados pelos pesquisadores do gênero *Eucalyptus* é que, assim como para a maioria das espécies florestais, respostas favoráveis são obtidas somente em material juvenil de origem seminal ou tecidos embriogênicos (Tibok et al., 1995; Major et al., 1997; Ruaud et al., 1997; Bandyopadhyay et al., 1999; Arruda et al., 2001; Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002), os quais não foram ainda testados em campo. Esses explantes, para a micropropagação, podem ser úteis em programas cujo ganho genético é marginal, mas são inadequados para a propagação clonal (Watt et al., 1999).

Em *E. citriodora*, alta produção de embriões somáticos foi obtida de sementes armazenadas a 4 °C durante dois anos, as quais tiveram seus tegumentos removidos e ficaram embebidas durante 48 horas antes da inoculação (Muralidharan e Mascarenhas, 1987, 1995). Termignoni et al. (1996) testaram o potencial dos explantes obtidos de plântulas de *E. dunnii* recém-germinadas *in vitro* de várias idades e obtiveram melhores resultados em plântulas com três dias de germinação. Posteriormente, a metodologia foi ajustada para explantes obtidos de clones selecionados (Patente N^o PI 9801485-4 INPI).

Trabalhando com *E. grandis*, Watt et al. (1991) utilizaram explantes foliares de plantas germinadas e multiplicadas *in vitro* (“seedling leaves”). Blakeway et al. (1993) investigaram um protocolo para material adulto de clones selecionados e híbridos de *E. grandis*, utilizando três tipos de explantes: folhas de plantas adultas micropropagadas por meio de proliferação de gemas axilares; folhas jovens obtidas de brotações epicórmicas de clones de um ano de idade mantidos em casa de vegetação; e calos produzidos de cultura de suspensão de células embriogênicas.

2.4.1.2. Desinfestação

Um dos maiores obstáculos para a micropropagação de árvores adultas de *Eucalyptus* é a obtenção de tecidos assépticos, uma vez que plantas crescendo em campo estão sujeitas, principalmente, aos microrganismos de solo. O armazenamento inadequado das sementes também é responsável pela proliferação de fungos. Tais contaminações são sistêmicas, não sendo prontamente erradicadas com procedimentos de desinfestação superficial, como a imersão em solução de hipoclorito de sódio ou de cálcio (George, 1993). Nesses casos, é necessário o tratamento com antibióticos e fungicidas antes ou durante o primeiro estágio da cultura (Watt et al., 1999).

Existem diversos trabalhos na literatura que descrevem a utilização de agentes antibacterianos e antifúngicos. Particularmente para *E. grandis*, a desinfestação foi efetiva utilizando-se fungicida (1 g L^{-1} de “benomyl” - Benlate[®]) no meio de germinação das sementes, seguido do tratamento com $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de penicilina e estreptomicina durante três dias. Para segmentos nodais e brotações epicórmicas, a desinfestação consistiu na exposição dos explantes a 1 g L^{-1} de “benomyl” e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de “chlorothalonil” (Bravo[®]), durante 30 minutos. Em casos mais severos, $0,36 \text{ g L}^{-1}$ de “promamocarb hydrochloride” (Previcur[®]) ou $0,0025 \text{ g L}^{-1}$ de “amphotericin B” foram adicionados ao meio sem detrimento das culturas subseqüentes (Watt et al., 1996).

Segundo McComb e Bennett (1986), a desinfestação de sementes de *Eucalyptus* depende do seu tamanho e da espessura do tegumento. Termignoni et al. (1996) desinfestaram sementes de *E. dunnii* com 0,12% de hipoclorito de sódio durante 15 minutos. Sementes de *E. grandis* foram desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1% por 20 minutos (Watt et al., 1991).

Sementes de *E. citriodora* ficaram embebidas em água durante uma hora com freqüentes trocas, visando à remoção dos pigmentos. Posteriormente, foram tratadas com bicloreto de mercúrio a 0,05% durante cinco minutos e enxaguadas com água destilada estéril. As sementes desinfestadas foram, então, embebidas novamente em água destilada por mais 24 horas. Das sementes embebidas, os

tegumentos foram removidos e o embrião, com os cotilédones intactos, foi utilizado como explante (Muralidharan e Mascarenhas, 1995).

2.4.1.3. Indução da embriogênese somática

A embriogênese somática indireta é a forma mais comumente encontrada nos trabalhos publicados sobre *Eucalyptus*. A formação de calos já foi relatada para mais de 30 espécies do gênero; no entanto, nem sempre ocorre a formação de estruturas embriogênicas nos calos obtidos (Watt et al., 1999).

Diversos tipos de calo já foram descritos, os quais posteriormente regeneraram embriões somáticos. Em *E. globulus*, Nugent et al. (2001) obtiveram calos soltos, macios (“soft”) e tendendo a acumular fenóis em poucas semanas após o início do calejamento. Calos embriogênicos de *E. dunnii* apresentaram coloração marrom, com setores nodulares brancos (Termignoni et al., 1996). Em *E. gunnii* foram friáveis e brancos (Boulay, 1987, citado por Nugent et al., 2001) e em *E. nitens*, de coloração creme e nodulares ou acinzentados e macios (Furze, 1988, citado por Nugent et al., 2001). Blakeway et al. (1993) descreveram calos embriogênicos de *E. grandis* de coloração creme a branca ou marrom, sendo macios ou nodulares.

Geralmente a indução de calos embriogênicos em *Eucalyptus* é alcançada em meio contendo sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962) e concentrações de 1–5 mg L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) ou 0,5–5 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético), no escuro. Em *E. dunnii*, tratamentos com ANA ou ANA/2,4-D nas proporções de 1:1 e 3:1 resultaram na formação de setores embriogênicos em calos produzidos em explantes juvenis (Termignoni et al., 1996).

Para *E. grandis*, o ANA não foi eficiente na formação de calos em diversos tipos de explantes juvenis, porém, os explantes formaram calos após 1–3 semanas de cultivo em meio contendo 1–3 mg L⁻¹ de 2,4-D, sendo, nesse estágio, identificadas células embriogênicas e não-embriogênicas (Watt et al., 1991, 1999).

A formação de embriões globulares, cordiformes e torpedos, após 3–6 semanas de cultura, foi atribuída à utilização de auxina no meio, e tais estruturas

foram observadas em *E. grandis* (Watt et al., 1991, 1999), *E. citriodora* (Muralidharan e Mascarenhas, 1995) e *E. dunnii* (Termignoni et al., 1996, 1998). Em *E. grandis*, a produção média de embriões globulares e cordiformes por grama de massa fresca de calo foi de 40-50 em explantes de plântulas obtidas *in vitro*, 50-65 em folhas de brotações epicórmicas e 350-450 em calos derivados de cultura de suspensão (Watt et al., 1999). Termignoni et al. (1996) não detalharam a produção de embriões em explantes juvenis de *E. dunnii*. No entanto, posteriormente, obtiveram a produção de 96-100% de embriões somáticos derivados de explantes de árvores maduras (Patente N^o 9801485-4 INPI). Em *E. citriodora*, a produção foi de 200±50 embriões por grama de massa fresca de calo (Muralidharan et al., 1989).

Regeneração direta de embriões somáticos de *Eucalyptus* não tem sido obtida com frequência, sendo relatada até o momento somente para *E. citriodora* (Muralidharan e Mascarenhas, 1995) e *E. globulus* (Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002). Em *E. citriodora*, a embriogênese somática direta foi observada em meio B5 (Gamborg et al., 1968) suplementado com 3 mg L⁻¹ de ANA e em MS contendo 5 mg L⁻¹ de ANA. Os embriões desenvolveram-se em agrupamentos de dois ou três diretamente na superfície dos cotilédones, sem a formação de calos. Em sua maioria, eles apresentaram coloração vermelho-escura, embora embriões de coloração branca translúcida também tenham sido observados. A melhor resposta na produção de culturas embriogênicas foi 3,3% (1 entre 30 explantes), em ambos os meios, porém estes experimentos não apresentaram repetibilidade (Muralidharan e Mascarenhas, 1995). Em *E. globulus*, a embriogênese direta ocorreu ocasionalmente na superfície do hipocótilo de um embrião zigótico (Pinto et al., 2002).

2.4.1.4. Embriogênese repetitiva ou secundária

Uma característica de grande interesse é que, em concentrações adequadas de auxina, um embrião somático pode dar origem a outros embriões somáticos, num processo denominado embriogênese repetitiva, recorrente ou secundária (George, 1993; Guerra et al., 1999). Esses ciclos de embriogênese repetitiva podem ser interrompidos pela remoção ou redução da auxina no meio de cultura, permitindo o

desenvolvimento de embriões maduros. É a habilidade de embriogênese repetitiva para perpetuar o estado embriogênico indefinidamente e produzir um grande número de embriões que faz da embriogênese somática uma ferramenta poderosa, capaz de ser explorada para diversos fins, como a propagação em massa e a produção de plantas transgênicas (Durzan, 1988; Parrot et al., 1991).

A embriogênese somática secundária e a formação de calos embriogênicos aparentam manifestar-se pelo mesmo fenômeno, em que células escapam do controle integrado requerido para a manutenção do comportamento embriogênico coordenado. A natureza do estímulo responsável pelo controle é ainda indefinida, apesar de a comunicação intercelular através de plasmodesmas aparentemente desempenhar um papel importante. A diferença entre os dois tipos de cultura é, provavelmente, somente o grau de organização das células embriogênicas (Muralidharan e Mascarenhas, 1995). O termo massa embriogênica tem sido usado para distinguir culturas que proliferam através de embriogênese secundária (Muralidharan e Mascarenhas, 1987; Muralidharan et al., 1989).

A indução de embriogênese repetitiva e a manutenção do potencial embriogênico em plantas lenhosas são dependentes da espécie, do genótipo e do tipo de explante (Watt et al., 1999) e resultados satisfatórios já foram obtidos para diversas espécies. Em *Hevea brasiliensis*, linhagens embriogênicas foram estabelecidas e mantidas durante vários anos a partir de embriogênese somática recorrente (Cailloux et al., 1996; Linossier et al., 1997). Embriogênese repetitiva de *Ocotea catharinensis* foi estabelecida com sucesso utilizando embriões somáticos maduros dessecados (Catarina et al., 2004; Moser et al., 2004). Cerca de 5% dos embriões somáticos produzidos em *Olea europea* apresentaram embriogênese secundária (Shibli et al., 2001). O subcultivo de embriões somáticos primários, obtidos de sementes imaturas, em meio MS destituído de reguladores de crescimento deu origem a agrupamentos de embriões somáticos secundários e calos embriogênicos em *Myrtus communis* (Parra e Amo-Marco, 1998).

Muralidharan e Mascarenhas (1995) observaram que embriões somáticos de *E. citriodora* induzidos em meio B5 acrescido de 3 mg L⁻¹ de ANA apresentaram embriogênese secundária. No entanto, a proliferação de embriões secundários não

mostrou desenvolvimento sincronizado. Esse processo foi mantido durante longos períodos e as culturas foram regularmente subcultivadas em meio contendo ANA. Embriões secundários desenvolveram-se somente na região terminal da radícula de embriões primários. Em *E. nitens*, Ruaud et al. (1997) observaram embriogênese secundária em meio líquido contendo 0,5 µM BAP (6-benzilaminopurina) e 0,5 µM ANA. Calos produzidos em explantes foliares de *E. grandis* cultivados em meio sólido com ou sem 2,4-D não induziram embriogênese secundária. No entanto, crescimento contínuo e produção de embriões foram observados em calos produzidos em suspensão celular (Watt et al., 1999).

2.4.2. Manutenção, multiplicação e cultura massal

Para manutenção e multiplicação em massa de embriões somáticos, é necessário determinar as condições adequadas para o estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular e o controle restrito dos processos de diferenciação, de maneira que as culturas sejam constituídas por células pró-embriônicas ou embriões em estádios iniciais de desenvolvimento. Um dos principais pontos de controle nesta etapa da embriogênese somática é a redução nos níveis de auxinas e a utilização de concentrações médias de citocininas. Outras alterações no meio de cultura também são efetuadas, como a fonte e as concentrações de carboidratos, sais minerais, vitaminas e outros (Guerra et al., 1999).

Quando as culturas são subcultivadas em intervalos regulares, a embriogênese repetitiva pode ser mantida por longos períodos, sem nenhuma perda do potencial de regeneração. Culturas embriogênicas de *E. citriodora* têm sido mantidas por mais de nove anos, sem nenhuma perda do potencial de regeneração (Muralidharan e Mascarenhas, 1995).

Linhas embriogênicas de *E. nitens* foram estabelecidas a partir de embriogênese secundária e mantiveram a proliferação após seis meses de cultura. Análises histológicas mostraram que os embriões foram originados de células perivasculares sem a fase de calo, sugerindo que a embriogênese somática apresenta

alto potencial para propagação vegetativa em larga escala e engenharia genética (Ruaud et al., 1997).

2.4.2.1. Efeito do meio de cultura

Muralidharan e Mascarenhas (1995) avaliaram o efeito dos meios de cultura MS, B5, White (White, 1954) e WPM (Lloyd e McCown, 1981) na manutenção de culturas embriogênicas de *E. citriodora*. O crescimento da massa embriogênica foi maior em meio MS, enquanto o número total de embriões formados e maduros foi maior em meio B5. Com a utilização do meio de White não foi observada embriogênese repetitiva (Muralidharan e Mascarenhas, 1995).

O efeito do meio basal no crescimento e na manutenção de culturas embriogênicas tem sido investigado para diversas espécies lenhosas. A produção de embriões somáticos em clones de *Theobroma cacao* variou em função dos meios basais utilizados (Tan e Furket, 2003). Em *Ocotea catharinensis*, Moser et al. (2004) observaram acréscimo significativo na massa fresca das culturas embriogênicas utilizando meia-força dos meios MS e AR (Anderson, 1978), enquanto meia-força de B5 (Gamborg e Eveleigh, 1968) e de White reduziu o crescimento. Esses resultados podem ser devido ao fato de os meios MS e AR terem composição mineral e razões amônio/nitrato maiores que B5 e White.

Fisichella et al. (2000) testaram o efeito de diferentes combinações de macronutrientes na embriogênese somática de clones de marmeleiro (*Cydonia oblonga*). A produção de calos e as propriedades embriogênicas variaram em função dos clones e dos meios utilizados. Em geral, dos oito diferentes meios de cultura utilizados, o MS foi o mais favorável à formação de embriões somáticos, o que, novamente, pode estar associado ao maior conteúdo de nitrogênio, bem como à proporção balanceada entre nitrato e amônio.

2.4.2.2. Efeito dos reguladores de crescimento

Auxinas são requeridas para a proliferação da massa pró-embriônica, mas são inibitórias no desenvolvimento dos embriões somáticos, e o grau de diferenciação dos embriões em presença de auxinas varia em diferentes espécies (von Arnold et al., 2002).

As auxinas 2,4-D, dicamba (ácido 3,6-dicloroanísico), 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético) e picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) foram inibitórias na manutenção das culturas embriogênicas de *E. citriodora*, ocorrendo somente a formação de calos de coloração marrom-clara, os quais não formaram embriões somáticos quando transferidos para meio destituído de regulador de crescimento. Na presença de AIA (ácido 3-indolacético), AIB (ácido indolbutírico), IPA (ácido indolpropiónico) e CPA (ácido 2,4,5-clorofenoxiacético), a embriogênese repetitiva foi mantida, semelhante ao meio contendo ANA, sendo este mais efetivo na concentração de 5 mg L⁻¹, apresentando maior massa embriogênica e número total de embriões. Concentrações menores de ANA (0,5 e 1,0 mg L⁻¹) conduziram à maturação dos embriões. Quando o GA₃ (ácido giberélico) foi adicionado ao meio de manutenção da massa embriogênica em *E. citriodora*, calos embriogênicos macios, friáveis e translúcidos com porções de coloração vermelha desenvolveram-se em duas semanas. A natureza embriogênica se tornou evidente quando as culturas foram examinadas ao microscópio (Muralidharan e Mascarenhas, 1995).

Linhagens embriogênicas de *Vitis x labruscana* foram mantidas por mais de dois anos, com freqüentes subcultivos em meio de manutenção suplementado com 2,4-D, sem perda da competência embriogênica (Motoike et al., 2001). Perl et al. (1995) estudaram o efeito da combinação de várias auxinas na manutenção de linhas embriogênicas de *Vitis vinifera* e obtiveram resultados superiores em combinações que continham IASP (ácido indol-3-aspártico) em relação ao AIA. Um efeito sinérgico da combinação de NOA (ácido 2-naftoxiacético) e IASP também foi observado.

2.4.2.3. Armazenamento e criopreservação

Culturas embriogênicas de algumas espécies e genótipos podem ser mantidas por prolongados períodos de subcultivo em meio contendo reguladores de crescimento e, ainda, reter seu potencial embriogênico total, ou seja, a capacidade de produzir embriões somáticos maduros que podem ser convertidos em plantas. No entanto, em muitas espécies, com o prolongamento da cultura a ocorrência de variação somaclonal aumenta e o potencial embriogênico decresce (von Arnold et al., 2002). Em *E. citriodora*, a ausência de calos, os quais estão propensos à variabilidade, torna a massa embriogênica um sistema ideal para manutenção por longos períodos (Muralidharan e Mascarenhas, 1995).

Muralidharan e Mascarenhas (1995) avaliaram o efeito da temperatura de incubação no crescimento e na manutenção da cultura embriogênica de *E. citriodora*. Apesar de o melhor crescimento da massa embriogênica de *E. citriodora* ter sido registrado a 27 °C, culturas mantidas a 10 °C mantiveram sua viabilidade por mais de nove meses de armazenamento. Devido à habilidade da massa embriogênica em reter sua viabilidade por longos períodos, ela pode ser comparada às culturas mantidas sob condições mínimas de crescimento, como a criopreservação. Embora a criopreservação de embriões somáticos seja possível para muitas espécies, a preservação durante longos períodos a baixas temperaturas possui, obviamente, vantagens em termos de custo sobre a criopreservação, a qual envolve o uso de equipamentos que exigem nitrogênio líquido para o congelamento.

2.4.2.4. Cultura líquida e sistemas de imersão temporária

As culturas embriogênicas podem ser mantidas em meio semi-sólido, porém para a propagação em larga escala normalmente é preferível o estabelecimento de suspensões celulares (Guerra et al., 1999). A taxa de proliferação é maior e as culturas tornam-se mais sincronizadas, pois as células ou agregados celulares desenvolvem-se como estruturas separadas ou podem ser separados facilmente (von Arnold et al., 2002).

Em *E. citriodora*, cultura líquida viável foi estabelecida e mantida somente com adição de mio-inositol à suspensão celular. Quando mio-inositol foi adicionado ao meio, melhor sincronia de desenvolvimento também foi observada, podendo isso ser atribuído a seu papel osmótico, sendo a concentração ótima encontrada de 1.000 mg L⁻¹. O desenvolvimento dos embriões em meio líquido e na presença de auxinas continuou até atingir o estágio de torpedo, e o subcultivo para meio destituído de auxinas foi necessário para o completo desenvolvimento e germinação dos embriões (Muralidharan e Mascarenhas, 1995).

Em *E. grandis*, embriões globulares e cordiformes foram produzidos em suspensão celular, porém não ocorreram maturação e germinação em meio destituído de reguladores de crescimento (Watt et al., 1999).

A produção e a qualidade dos embriões somáticos têm sido melhoradas em diversas espécies lenhosas com a utilização de sistemas de imersão temporária, em comparação com sistemas convencionais de cultura em meio semi-sólido ou suspensões celulares em frascos Erlenmeyer (Cabasson et al., 1997; Etienne e Berthouly, 2002). Em diferentes genótipos de café (*Coffea arabica*) testados, o crescimento das culturas embriogênicas foi maior em sistema de imersão temporária do que em meio líquido em frascos Erlenmeyer sob agitação (Berthouly et al., 1995, citados por Etienne e Berthouly, 2002). Em *Citrus deliciosa*, Cabasson et al. (1997) promoveram o desenvolvimento de embriões somáticos em sistema de imersão temporária RITA[®], e 66% dos embriões produzidos foram cotiledonares e morfológicamente similares a embriões nucleares. Em outros sistemas testados, os embriões foram hiperídricos ou não ultrapassaram o estágio globular. Em se tratando da seringueira (*Hevea brasiliensis*), a transferência de culturas embriogênicas para o sistema RITA[®] melhorou consideravelmente a quantidade e qualidade dos embriões somáticos produzidos e foi possível estabelecer uma rotina de produção (Etienne et al., 1997, citados por Etienne e Berthouly, 2002).

Apesar de todas as vantagens de utilização de sistemas líquidos, para germinação dos embriões e desenvolvimento completo das plântulas, os embriões maduros devem ser transferidos para meio semi-sólido, uma vez que a conversão das plantas requer uma posição correta, o que é impossível alcançar com sistemas

líquidos sob agitação ou de imersão temporária, visto que os embriões estão em constante mudança de posição (Etienne e Berthouly, 2002).

2.4.3. Maturação e germinação de embriões somáticos

A embriogênese somática é um complexo processo no qual a qualidade do produto final, ou seja, a sobrevivência e o crescimento das plantas regeneradas, depende das condições providas nas fases iniciais, quando os embriões são formados, amadurecem e germinam. Dessa maneira, para a propagação em massa de plantas por meio de embriogênese somática, o conhecimento minucioso dos fatores críticos que podem contribuir para a performance das plantas é indispensável. Somente embriões maduros com morfologia normal, que acumularam quantidade suficiente de substâncias de reserva e que adquiriram tolerância à dessecação no final da maturação desenvolverão plantas normais (von Arnold et al., 2002).

O aumento da osmolaridade parece estar relacionado com a transição do ciclo de divisão para o de diferenciação, e esse aumento pode ser obtido pela adição de PEG (polietilenoglicol), mio-inositol, sorbitol e manitol, de maneira que o meio de cultura seja ajustado para valores de 200 a 350 mM (Guerra et al., 1999). O estresse osmótico *in vitro* induzido com PEG de peso molecular acima de 4.000 é o que mais se aproxima do estresse hídrico observado em células de embriões e plantas sujeitas a condições de desidratação. A razão para isso é que as grandes moléculas do PEG não são capazes de atravessar a parede celular enquanto a água é absorvida, conduzindo a uma pressão de turgor reduzida e ao potencial osmótico intracelular mais negativo (von Arnold et al., 2002).

O ABA (ácido abscísico), a exemplo de seus efeitos na embriogênese zigótica, também exerce efeito nessa fase, sendo geralmente usado para reduzir o processo de embriogênese secundária (Guerra et al., 1999) ou para inibir a germinação precoce (von Arnold et al., 2002).

Em geral, embriões maduros de *E. citriodora* germinaram facilmente quando transferidos para meio B5 com 20 g L⁻¹ de sacarose e sem auxina. Até mesmo em

meio contendo auxina, embriões que não mantinham contato com o meio freqüentemente germinavam, possivelmente devido à redução dos níveis de auxina. Apesar de a germinação ter ocorrido em culturas mantidas no escuro, as plântulas apresentaram-se estioladas e o desenvolvimento normal das folhas ocorreu somente em condições de luz – cerca de $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Muralidharan e Mascarenhas, 1995).

Em *E. grandis*, a germinação dos embriões e a regeneração de plantas foram alcançadas em meio contendo sais e vitaminas MS, sacarose (30 g L^{-1}) acrescido ou não de ANA ($0,02 \text{ mg L}^{-1}$), BAP ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), GA₃ ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) e carvão ativado (4 g L^{-1}). A utilização de ABA e PEG, sozinhos ou em combinação, e a dessecação dos embriões durante três horas não mostraram sucesso. Tratamentos com ABA e PEG resultaram na proliferação de calos, pela indução de novos ciclos de divisão celular e embriogênese secundária. Neste caso, o sistema apresentou grande potencial para propagação massal e transformação genética (Watt et al., 1999).

Em *E. globulus*, a conversão dos embriões somáticos em plantas ocorreu quando os embriões foram transferidos para meio destituído de reguladores de crescimento (Pinto et al., 2002).

2.4.4. Aclimação

O sucesso na aclimação e transferência para condições *ex vitro* de plantas de *Eucalyptus* produzidas via embriogênese somática é relatado, até o momento, somente para *E. citriodora*. Plantas com aproximadamente 2 cm de parte aérea foram transplantadas para vários substratos; a mistura de solo e areia (3:1) deu os melhores resultados, com sobrevivência de 86% das plantas. A sobrevivência das plantas em vermiculita foi a mais baixa (42%), mas, quando misturada com solo, a taxa melhorou consideravelmente (78%). Utilizando somente solo ou somente areia, as taxas de sobrevivência foram de 74% e 66%, respectivamente (Muralidharan e Mascarenhas, 1995).

2.4.5. Encapsulamento de embriões somáticos

Semelhantemente às etapas de desenvolvimento de plantas em condições de viveiro, resultados relativos a encapsulamento de embriões somáticos de *Eucalyptus* se restringem ao trabalho de Muralidharan e Mascarenhas (1995), em que alginato de sódio, Gelrite® e ágar foram testados visando à formação de um envoltório apropriado aos embriões isolados de *E. citriodora*. O uso de alginato de sódio proporcionou os melhores resultados, tanto pela habilidade em formar um tegumento resistente como pela viabilidade dos embriões. O alginato de sódio a 1% formou uma camada fina que facilitou a manipulação dos embriões e resultou em 30% de germinação dos embriões encapsulados em meio estéril, enquanto os outros tegumentos foram muito sensíveis à manipulação. As taxas de germinação dos embriões encapsulados, armazenados à temperatura ambiente, declinaram em meio de germinação. Após um dia de armazenamento, 38% de embriões germinaram; e depois de sete dias de armazenamento, esta taxa caiu para 28%. Nenhum embrião germinou após o armazenamento por 10 dias. Embriões armazenados a 4 °C reduziram a taxa de germinação mais rapidamente, e, após sete dias não foi observada germinação.

2.4.6. Estabilidade genética e avaliações em campo

Devido à praticidade e ao valor econômico, um protocolo de embriogênese somática repetitiva é desejável para *Eucalyptus*, porém a possibilidade de ocorrência de variação somaclonal aumenta com a duração da cultura *in vitro*, especialmente em calos e suspensão celular. Embriões somáticos aparentemente normais podem apresentar anormalidades genéticas ou bioquímicas ao longo do ciclo de desenvolvimento da planta; em caso de espécies florestais, estas podem ser manifestadas muitos anos após o plantio. Dessa maneira, é imprescindível o aperfeiçoamento de métodos para identificar tais variações. Testes morfológicos e citológicos podem ser usados para identificar variações em cromossomos. No entanto, como algumas alterações genéticas não podem ser detectadas em nível

molecular ou fisiológico, marcadores moleculares, como RAPD e RFLP, são necessários para identificar variantes antes do plantio (Watt et al., 1999).

Plantas de *E. citriodora* propagadas por embriogênese somática, quando transferidas para casa de vegetação, apresentaram folhas típicas de plantas juvenis. Quando folhas características de plantas adultas começaram a ser formadas, as plantas foram transferidas para vasos e retiradas da casa de vegetação. Cinquenta plantas foram plantadas no campo após atingirem altura aproximada de 120 cm. Somente cinco árvores sobreviveram no campo após cinco anos do plantio. Entretanto, a alta mortalidade das árvores pode ser atribuída, em parte, às condições de seca severa que as plantas enfrentaram durante esse período. Nenhuma anormalidade foi observada na morfologia e na taxa de crescimento quando comparadas com plantas obtidas de sementes (Muralidharan e Mascarenhas, 1995). Segundo estes autores, estudos futuros, avaliando a variabilidade, devem ser realizados utilizando RFLP ou técnicas de DNA.

2.4.7. Aplicações da embriogênese somática na clonagem de *Eucalyptus*

Diversos autores apontam a embriogênese somática como uma ferramenta promissora, de grande potencial de aplicação em programas de melhoramento e reflorestamento (Durzan, 1988; Parrot et al., 1991; Watt, 1991; Bajaj, 1995; Vicient e Martinez, 1998; Guerra et al., 1999).

Embora o *Eucalyptus* apresente altas taxas de multiplicação por gemas axilares, estudos realizados com outras espécies florestais indicam o potencial de obtenção de taxas muito maiores com a embriogênese somática. Além disso, a técnica apresenta vantagens adicionais, como redução do número de estádios de cultura, redução de trabalho e custo, rapidez e facilidade para a produção em larga escala em meio líquido utilizando biorreatores (Haines, 1994; Watt et al., 1999).

Embriões somáticos apresentam meristemas radicular e caulinar na mesma unidade. Isso significa que, enquanto o sistema radicular produzido via rota organogênica é adventício, mudas desenvolvidas de embriões somáticos exibem bem desenvolvido sistema radicular pivotante (Watt, 1991). Outras vantagens são o

potencial para regenerar grande número de plantas, bem como a possibilidade de encapsulamento e armazenamento de embriões como sementes sintéticas (Bajaj, 1995).

A embriogênese somática é um método importante para propagação de plantas-elite *in vitro*, em larga escala. Também é uma estratégia para os estudos básicos relacionados com a fisiologia do desenvolvimento do embrião (Guerra et al., 1999).

Durzan (1988) apresenta a embriogênese somática como uma técnica capaz de superar alguns problemas na propagação em massa, especialmente em certas perenes lenhosas de difícil enraizamento, proporcionando uma alternativa ao enraizamento de estacas e de brotações micropropagadas.

Bajaj (1995) aponta a propagação clonal via embriogênese somática como uma técnica para clonagem em massa de baixo custo, desde que superadas limitações, como baixa frequência de embriões somáticos, fidelidade genética e crescimento e desenvolvimento normal de mudas e plantas.

Além do mais, a embriogênese somática tem outras aplicações práticas, incluindo melhoramento da produção (através de seleção de células, transformação genética, hibridação somática e produção de plantas poliplóides), preservação de germoplasma, eliminação de vírus, produção de metabólitos *in vitro* e iniciação de micorrizas *in vitro* (Vicient e Martinez, 1998).

Na busca de novas tecnologias para o constante aprimoramento da clonagem de *Eucalyptus*, a embriogênese somática tem despertado interesse especial por parte de pesquisadores e empresas florestais brasileiras que possuem avançados programas de melhoramento e clonagem; nos próximos anos, acredita-se que a técnica deverá ser amplamente investigada.

Resultados positivos de embriogênese somática ocorrendo em espécies de *Eucalyptus* têm sido obtidos, na maioria dos casos, com o uso de explantes juvenis. Pesquisas adicionais são necessárias no sentido de melhorar a maturação e a sincronização do desenvolvimento dos embriões, assim como um sistema eficiente para a produção de culturas embriogênicas a partir de árvores adultas em adição àquelas desenvolvidas para materiais juvenis.

Aliada às técnicas de clonagem de *Eucalyptus* utilizadas atualmente em escala comercial, a embriogênese somática apresenta grande potencial para rejuvenescimento de materiais selecionados de difícil enraizamento, assim como na regeneração de plantas transformadas geneticamente. Uma vez obtidas estas plantas, o material pode ser multiplicado em grande escala pela técnica de microestaquia, já bastante difundida nas empresas florestais.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, W.C. Tissue culture of Rhododendrons. *In Vitro*, v.14, p.334, 1978.
- ARRUDA, S.C.C., SOUZA, G.M., ALMEIDA, M., GONÇALVES, A.N. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.63, p.143-154, 2000.
- ASSIS, T.F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe Agropecuário**, v.18, n.185, p.32-51, 1996.
- ASSIS, T.F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo, PR: EMBRAPA, 1997. v. 1, p. 300-304.
- ASSIS, T.F., ROSA, O.P., GONÇALVES, S.I. Propagação por microestaquia. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7, 1992, Nova Prata. **Anais...** Santa Maria, RS: UFSM, 1992. p. 824-836.
- ASTARITA, L.V., GUERRA, M.P. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, n.2, p.113-118, 1998.
- BAJAJ, Y.P.S. **Somatic embryogenesis and synthetic seed**. Biotechnology in agriculture and forestry, v.30. New York, Springer-Verlag, 1995. 472p.
- BANDYOPADHYAY, S., CANE, K., RASMUSSEN, G., HAMILL, J.D. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species – *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Plant Science**, v.140, p.189-198, 1999.
- BANDYOPADHYAY, S., HAMILL, J.D. Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. **Annals of Botany**, v.86, p.237-244, 2000.

- BECWAR, M.R. Conifer somatic embryogenesis and clonal forestry. In: AHUJA, M.R., LIBBY, W.J. (Eds.). **Clonal forestry: genetics and biotechnology**. Budapest: Springer-Verlag, 1993. p.200-223.
- BERTOLUCCI, F.L.G., REZENDE, G.D.S., PENCHEL, R.M. Produção e utilização de híbridos de eucalipto. **Silvicultura**, v.7, n.51, p.12-16, 1993.
- BLAKEWAY, F.C., HERMAN, B., WATT, M.P. Establishment of cell suspension cultures of *Eucalyptus grandis* and *E. grandis* x *camaldulensis*. **South African Forestry Journal**, v.166, p.17-26, 1993.
- BONGA, J.M., VON ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 236p.
- CABASSON, C., ALVARD, D., DAMBIER, D., OLLITRAULT, P., TEISSON, C. Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.50, p.33-37, 1997.
- CAILLOUX, F. JULIEN-GUERRIER, J., LINOSSIER, L. COUDRET, A. Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. **Plant Science**, v.120, p.185-196, 1996.
- CATARINA, C.S., OLMEDO, A. S., MEYER, G. A., MACEDO, J., AMORIM, W., VIANNA, A.M. Repetitive somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae): effect of somatic embryo development stage and dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.78, p.55-62, 2004.
- CHAPERON, H. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: SIMPÓSIO SOBRE SILVICULTURA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO DE ESPÉCIES FORESTALES, 1987, Buenos Aires, Argentina. **Anales...** [S.l.]: AFOCEL, 1987. p. 215-232.
- DURZAN, D.J. Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. **Biotechnology Genetics Engineering Review**. Andover, v.6, p.339-376, 1988.
- ELDRIDGE, K., DAVIDSON, J., HARDWOOD, C., VAN WYK, G. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Oxford University Press, 1993. 288p.
- ETIENNE, H., BERTHOULY, M. Temporary immersion systems in plant propagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.215-231, 2002.
- FISICHELLA, M., SILVI, E. MORINI, S. Regeneration of somatic embryos and roots from quince leaves cultured on media with different macroelement composition. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.63, p.101-107, 2000.
- GAMBORG, O.L., EVELEIGH, D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. **Canadian Journal of Biochemistry**, v.46, p.417-421, 1968.

- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v.50, p.151-158, 1968.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture – The technology**. 6 ed. England: Exegetics, 1993. v.1, 575p.
- GONÇALVES, A.N. **Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla*. S.T. *in vitro***. Piracicaba, SP: ESALQ, 1982. 97p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1982.
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. v.1, p.183-260.
- GUERRA, M.P., TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1999. v.2, p.533-568.
- HACKETT, W.P. Juvenility and maturity. In: BONGA, J.M., DURZAN, D.J. (Eds.). **Cell and tissue culture in forestry**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1987. v.1, p.216-231.
- HACKETT, W.P., MURRAY, J.R. Maturation and rejuvenation in woody species. In: AHUJA, M.R. (Ed.). **Micropropagation of woody plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 93-105.
- HAINES, R. J. Mass propagation by cuttings, biotechnologies and the capture of genetic gain. In: MASS PRODUCTION TECHNOLOGY FOR GENETICALLY IMPROVED FAST GROWING FOREST TREE SPECIES, 1992, Bordeaux. **Proceedings...** Paris: AFOCEL/IUFRO, 1994.
- HARTMANN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES JUNIOR, F.T., GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 6th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770p.
- HOWELL, S.H. **Molecular genetics of plant development**. Cambridge: University Press, 1998. 384p.
- JIMÉNEZ, V.M. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.196-223, 2001.
- JONES, N. Somatic embryogenesis as a tool to capture genetic gain from tree breeding strategies: risks and benefits. **Southern African Forestry Journal**, v.195, p.93-101, 2002.

- KOMAMINE, A., KAWAHARA, R., MATSUMOTO, M., SUNABORI, S., TOYA, T., FUJIWARA, A., TSUKUHARA, M., SMITH, J., ITO, M., FUKUDA, H., NOMURA, K., FUJIMURA, T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant***, v.28, p.11-14, 1992.
- LINOSSIER, L., VEISSEIRE, P., CAILLOUX, F., COUDRET, A. Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. ***Plant Science***, v.124, p.183-191, 1997.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. ***Combined Proceedings International Plant Propagators Society***, v. 30, p. 421-427, 1981.
- MAJOR, G.; KRAUSE, M.; ROSS, S.; SOTELO, M. Preliminary studies on the somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. ***Proceedings...*** Colombo, PR: EMBRAPA, 1997. v. 1, p.137-142.
- McCOMB, J.A., BENNETT, I.J. Eucalypts (*Eucalyptus* spp.). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). ***Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. I: Trees***. Berlin: Springer-Verlag, 1986. p.340-362.
- MOSER, J.R., GARCIA, M.G., VIANA, A.M. Establishment and growth of embryogenic suspension cultures of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, v.78, p.37-42, 2004.
- MOTOIKE, S.Y., SKIRVIN, R.M., NORTON, M.A., OTTERBACHER, A.G. Somatic embryogenesis and long term maintenance of embryogenic lines from fox grapes. ***Plant Cell, Tissue and Organ Culture***, v.66, p.121-131, 2001.
- MURALIDHARAN, E.M., GUPTA, P.K., MASCARENHAS, A.F. Plantlet formation through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *E. citriodora*. ***Plant Cell Reports***, v.8, p.41-43, 1989.
- MURALIDHARAN, E.M., MASCARENHAS, A.F. In vitro plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *E. citriodora*. ***Plant Cell Reports***, v.6, p.256-259, 1987.
- MURALIDHARAN, E.M., MASCARENHAS, A.F. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus*. In: JAIN, S.M., GUPTA, P.K., NEWTON, R.J. (Eds.). ***Somatic embryogenesis in woody plants***, vol.2. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.23-40.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. ***Physiologia Plantarum***, v.15, p.473-497, 1962.

NUGENT, G., CHANDLER, S.F., WHITEMAN, P., STEVENSON, T.W. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.67, p. 85-88, 2001.

OLIVEIRA, M.L. de. **Efeito da estaquia, miniestaquia, microestaquia e micropropagação no desempenho silvicultural de clones de *Eucalyptus* spp.** Viçosa, MG: UFV, 2003, 53p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

PARRA, R., AMO-MARCO, J.B. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtus communis* L.). **Plant Cell Reports**, v.18, p.325-330, 1998.

PARROT, W.A., MERKLE, S.A., WILLIAMS, E.G. Somatic embryogenesis: potential for use in propagation and gene transfer system. In: MURRAY, D.R. (Ed.). **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Oxon: CAB, 1991. p.158-200.

PERL, A., SAAD, S., SAHAR, N., HOLLAND, D. Establishment of long-term embryogenic cultures of seedless *Vitis vinifera* cultivars – a synergistic effect of auxins and the role of abscisic acid. **Plant Science**, v.104, p.193-200, 1995.

PINTO, G., SANTOS, C., NEVES, L., ARAUJO, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, v.21, n.3, p.208-213, 2002.

PULLMAN, G.S., JOHNSON, S., PETER, G., CAIRNEY, J., XU, N. Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. **Plant Cell Reports**, v.21, p.747-758, 2003a.

PULLMAN, G.S., MONTELLO, P., CAIRNEY, J., XU, N., FENG, X. Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: maturation improvements by metal analyses of zygotic and somatic embryos. **Plant Science**, v.164, 955-969, 2003b.

RESENDE, M.D.V. de. Melhoramento de essências florestais. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p.589-647.

ROCKWOOD, D.L., WARRAG, E.I. Field performance of micropropagated, macropropagated and seed-derived propagules of three *Eucalyptus grandis* ortets. **Plant Cell Reports**, v.13, p.628-631, 1994.

RUAUD, J.N., CHURCHILL, K., PEPPER, S. Somatic embryogenesis initiation in *Eucalyptus nitens*. **Acta Horticulturae**, v.447, p.185-186, 1997.

SHIBLI, R.A., SHATNAWI, M., ABU-EIN, AL-JUBOORY, K.H. Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of ‘Nabali’ Olive (*Olea europea* L.). **Scientia Horticulturae**, v.88, p.243-256, 2001.

- SILVA, J.C., ASSIS, T.F., OLIVEIRA, J.T.S. Melhoramento para qualidade da madeira. **Revista da Madeira**, p.56-66, 2003. (Edição especial – Eucalipto: pesquisa amplia usos).
- SILVEIRA, V., FLOH, E.I.S., HANDRO, W., GUERRA, M.P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.76, p.53-60, 2004.
- TAN, C.L., FURKET, D.B. Development of an *in vitro* regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. **Plant Science**, v.164, p.407-412, 2003.
- TAUTORUS, T.E., FOWKE, L.C., DUNSTAN, D.I. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, n.69, p. 1837-1899, 1991.
- TERMIGNONI, R.R. Patente de invenção do processo: clonagem de plantas adultas selecionadas de *Eucalyptus* spp. pelo processo de regeneração *in vitro* por embriogênese somática. Depositário: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Inventor: Prof^a Dra. Regina Ramos Termignoni. Patente No PI9801485-4 INPI.
- TERMIGNONI, R.R., WANG, P., HU, C. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, p.129-132, 1996.
- 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**, v.110, p.139-145, 1995.
- TITON, M., XAVIER, A., OTONI, W.C. Dinâmica do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v.26, n.6, p.665-673, 2002.
- TITON, M., XAVIER, A., OTONI, W.C. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, v.27, n.1, p.1-7, 2003.
- VENDRAME, W.A. **Embriogênese somática em *Pinus taeda* L.** Piracicaba, SP: ESALQ/USP, 1994. 104p. (Dissertação Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP.
- VICIENT, C.M., MARTINEZ, F.X. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n.10, v.1, p.1-12, 1998.
- VON ADERKAS, P., ROHR, R., SUNDBERG, B., GUTMANN, M., DUMONT-BÉBOUX, N., LELU, M. Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.111-120, 2002.

VON ARNOLD, S., SABALA, I., BOZHOKOV, P., DYACHOK, J., FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, p.233-249, 2002.

WATT, M.P., BLAKEWAY, F.C., CRESSWELL, C.F., HERMAN, B. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, v.157, p.59-65, 1991.

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**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003.p.217-244.

WATT, M.P., BLAKEWAY, R. TERMIGNONI, R. JAIN, S.M. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* e *E. dunnii*. In: JAIN, S.M., GUPTA, P.K., NEWTON, R.J. (Eds.). **Somatic embryogenesis in woody plants**, vol.5. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999. p.63-78.

WATT, M.P., DUNCAN, E.A., ING, M., BLAKEWAY, F.C., HERMAN, B. Field performance of micropropagated *Eucalyptus* hybrids. **South African Forestry Journal**, v.173, p.17-21, 1995.

WATT, M.P., GAUNTLETT, B.A., BLAKEWAY, F.C. Effect of anti-fungal agents on *in vitro* cultures of *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, v.175, p.23-27, 1996.

WENDLING, I., XAVIER, A., GOMES, J.M., PIRES, I.E., ANDRADE, H.B. Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. **Revista Árvore**, v. 24, n.2, p.181-186, 2000.

WHITE, P.R. **The cultivation of animal and plant cell**. 2nd ed. New York: Ronald Press, 1954. p.57-63.

XAVIER, A. Silvicultura clonal em *Eucalyptus*. **Revista da Madeira**, p.46-52, 2003. (Edição especial – Eucalipto: pesquisa amplia usos).

XAVIER, A., ANDRADE, H.B., OLIVEIRA, M.L., WENDLING, I. Desempenho de enraizamento de microestacas e miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v.25, n.4, p.403-411, 2001.

XAVIER, A., COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v.20, n.1, p.9-16, 1996.

XAVIER, A., WENDLING, I. **Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus***. Viçosa, MG: SIF, 1998. 10p. (Informativo Técnico SIF, 11).

ZOBEL, B.J. Clonal forestry in the Eucalypts. In: AHUJA, M.R., LIBBY, W.J. (Eds.). **Clonal forestry II: Conservation and application**. Budapest: Springer-Verlag, 1993. p.139-148.

CAPÍTULO I

Efeito do 2,4-D na indução de calos embriogênicos em cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis*

RESUMO – O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do 2,4-D na indução de calos embriogênicos em cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis*. Foram utilizadas concentrações de 2,4-D variando de 0 a 30 mg L⁻¹ e diferentes tempos de exposição dos explantes à auxina. Os calos produzidos foram subcultivados em meio de cultura MS, contendo diferentes combinações de reguladores de crescimento, acrescidos de PVP ou carvão ativado. Os melhores resultados de calogênese foram observados em cotilédones, nas concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹ de 2,4-D, sendo 30 dias no escuro o melhor tempo e condição de indução. Os calos apresentaram coloração amarelo-clara a amarelo-escura e textura semicompacta a semifriável, porém não foram observadas estruturas embriogênicas.

Palavras-chave: Embriogênese somática, cultura de tecidos, propagação clonal, auxinas, micropropagação.

Effect of 2,4-D on embryogenic callus induction from cotyledons and hypocotyls of *Eucalyptus grandis*

ABSTRACT – The objective of the present work was to evaluate the effect of 2,4-D on embryogenic callus induction from cotyledon and hypocotyl explants of *Eucalyptus grandis*. 2,4-D concentrations varying from 0 to 30 mg L⁻¹ and different times of exposure to auxin were used. The produced calli were subcultured in MS basal medium with different combinations of growth regulators, added of PVP or activated charcoal. The best callusing results were observed from cotyledons, at 2 different concentrations (5 and 10 mg L⁻¹), with 30 days in the dark the best time and induction conditions. Calli showed light-yellow to dark-yellow coloration and semi-compact to semi-friable texture, however embryogenic structures were not observed.

Key words: Somatic embryogenesis, tissue culture, clonal propagation, auxins, micropropagation.

1. INTRODUÇÃO

Em *Eucalyptus*, assim como em outras espécies florestais, há um esforço considerável para o desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos e sua aplicação na propagação clonal. No entanto, a maioria dos trabalhos realizados com sucesso até o momento se refere à micropropagação através da proliferação de gemas axilares.

A embriogênese somática apresenta-se como ferramenta promissora no setor florestal, principalmente na propagação clonal em larga escala e na transformação genética de genótipos desejáveis.

Nos últimos anos, a embriogênese somática tem sido reportada para várias espécies de *Eucalyptus*, como *E. citriodora* (Muralidharan e Mascarenhas, 1987; 1995), *E. nitens* (Bandyopadhyay et al., 1999; Bandyopadhyay e Hamill, 2000), *E. grandis* (Watt et al., 1991, 1999), *E. urophylla* (Tibok et al., 1995; Arruda et al., 2000), *E. dunnii* (Termignoni et al., 1996) e *E. globulus* (Bandyopadhyay et al., 1999; Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002). Entretanto, verifica-se que este gênero apresenta dificuldades na aplicação desta tecnologia, visto que embriões somáticos normalmente são obtidos em baixa frequência, apresentando também baixa taxa de conversão em plantas e alto índice de formação de embriões anormais.

Entre os principais fatores que têm merecido atenção na propagação por embriogênese somática, as auxinas estão envolvidas na indução e iniciação de embriões somáticos, sendo necessárias para a formação de agregados embriogênicos a partir de células individuais, expressando a totipotência das células competentes (Komamine et al., 1992). Dessa forma, a embriogênese somática tem sido frequentemente iniciada em meio contendo altos níveis de auxinas, especialmente 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético (George, 1993; Krikoriam, 1995; Guerra et al., 1999).

Em espécies lenhosas, o 2,4-D tem sido muito utilizado em trabalhos de embriogênese somática (Astarita e Guerra, 1998; Guerra et al., 2001; Shibli et al., 2001; Tonon et al., 2001; Shahana e Gupta, 2002; Tan e Furtek, 2003; Moser et al., 2004). Particularmente, em *Eucalyptus grandis*, células embriogênicas e não-

embriogênicas foram induzidas em meio de cultura contendo 0,25-3 mg L⁻¹ de 2,4-D (Watt et al., 1991; Watt et al., 1999). Em *E. globulus* (Pinto et al., 2002) e em *E. dunnii* (Termignoni et al., 1996), a embriogênese somática foi observada na presença de 2,4-D em combinação com ANA (ácido naftalenoacético). Para *E. citriodora*, o 2,4-D foi inibitório na manutenção de culturas embriogênicas, desenvolvendo somente calos de coloração escura (Muralidharan e Mascarenhas, 1995).

No presente trabalho, investigou-se a eficiência do 2,4-D na indução de calos embriogênicos em cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa - UFV, localizada no município de Viçosa, Minas Gerais.

Como material genético foram utilizadas sementes de *Eucalyptus grandis*, procedentes da Área de Produção de Sementes, localizada no município de Mogi Guaçu, São Paulo, da empresa International Paper do Brasil.

2.2. Obtenção dos explantes

Inicialmente, as sementes foram lavadas seis vezes com água deionizada e transferidas para câmara de fluxo laminar, onde foram desinfestadas com solução de álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 5% durante 15 minutos, sendo então enxaguadas seis vezes com água deionizada e autoclavada.

Na germinação das sementes foi utilizado o meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), contendo a metade da concentração dos sais e vitaminas, 50 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1,5% de sacarose e 5 g L⁻¹ de ágar Merck[®], com pH ajustado para

5,7 ± 0,1 e autoclavado por 15 minutos. Após a autoclavagem foi adicionado Timentin[®] (300 mg L⁻¹), previamente filtro-esterilizado.

As sementes desinfestadas foram inoculadas em placas de Petri descartáveis estéreis (60 x 15 mm) contendo 15 ml de meio de cultura para germinação, sendo as placas vedadas com filme de PVC (Goodyear, Brasil). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro e irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹ (fornecida por tubos fluorescentes, “Luz do dia”, Osram[®], 20 Watts), por um período de 7 a 10 dias, até completarem a germinação.

Como fonte de explantes foram utilizados segmentos de hipocótilos medindo cerca de 0,5 a 1,0 cm de comprimento e cotilédones totalmente expandidos. Os cotilédones foram separados, retirando-se o meristema apical, e em todos os experimentos foram dispostos com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

2.3. Indução de calos

O meio de cultura básico utilizado em todos os experimentos foi composto por sais e vitaminas de MS, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 3% de sacarose, 2,8 g L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma, USA) e o pH ajustado para 5,7 ± 0,1, sendo adicionado Timentin[®] (300 mg L⁻¹) após autoclavagem do meio. Foi utilizado 2,4-D em todos os tratamentos de indução de calos, variando-se a concentração e o tempo de exposição dos explantes ao regulador em cada experimento. Cada placa de Petri (60 x 15 mm) foi considerada como repetição, variando-se o número de explantes e de repetições de acordo com os experimentos. Após a inoculação dos explantes, as placas foram vedadas com filme de PVC (Goodyear, Brasil).

O esquema básico de indução de calos, a partir de cotilédones e hipocótilos de *E. grandis*, utilizado nos experimentos deste estudo está representado na Figura 1.

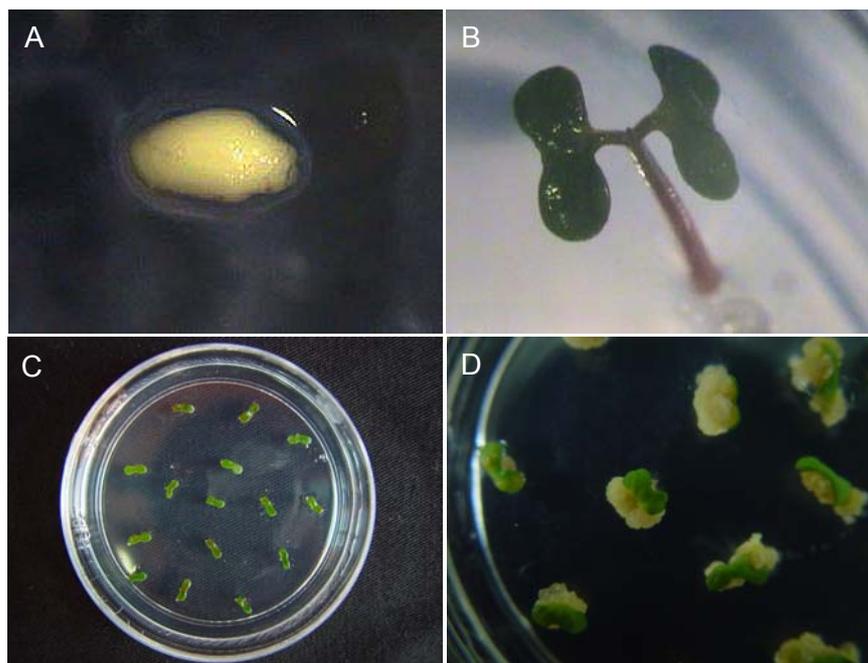


Figura 1 – Esquema da indução de calos embriogênicos em cotilédones e hipocótilos de *E. grandis*, utilizando 2,4-D. A) semente desinfestada e inoculada em meio de germinação. B) plântula germinada *in vitro*. C) cotilédones em meio de indução de calos. D) calos formados após quatro semanas.

2.3.1. Experimento 1 – Efeito do carvão ativado e de concentrações de 2,4-D na indução de calos embriogênicos

Os explantes foram colocados em placas de Petri com meio de cultura básico, variando a concentração de 2,4-D (0, 1, 2 e 4 mg L⁻¹). Foram utilizadas três repetições por tratamento e, para cada repetição, cinco explantes de hipocótilo e cinco de cotilédones. As placas foram mantidas no escuro em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, por um período de 30 dias, quando se avaliaram: o percentual de explantes calejados, a intensidade de calejamento, a região de calejamento, a textura do calo, o aspecto das células, a presença de necroses e a emissão de raízes. O experimento foi repetido com a adição de carvão ativado (1 g L⁻¹).

Aos 30 dias, os calos foram subcultivados para os meios M1 [½ MS, sacarose (6%), L-glutamina (400 mg L⁻¹), 2,4-D (0,05 mg L⁻¹) + ANA (1,0 mg L⁻¹)] e M2 [MS, sacarose (3%), L-glutamina (400 mg L⁻¹), 2,4-D (0,05 mg L⁻¹) + ANA

(1,0 mg L⁻¹), sendo mantidos no escuro durante uma semana e, a seguir, transferidos para fotoperíodo de 16 horas de luz, com irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹.

2.3.2. Experimento 2 – Tempo de permanência em 2,4-D e tratamentos de regeneração

Cotilédones foram mantidos em meio para indução de calos contendo 2 mg L⁻¹ de 2,4-D durante 7, 14 e 21 dias em condições de escuro e, a seguir, subcultivados para tratamentos com ANA + TDZ [1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) uréia] e ANA + 2,4-D, sendo: T1 = 1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,05 mg L⁻¹ 2,4-D; T2 = 0,1 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ 2,4-D; T3 = 1,0 mg L⁻¹ ANA + 0,05 mg L⁻¹ TDZ; e T4 = 0,1 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ TDZ.

A definição da concentração de 2,4-D no meio de indução e do explante baseou-se nos melhores resultados do experimento realizado anteriormente, em que se avaliou a indução de calos em cotilédones e hipocótilos em meio contendo 2,4-D, em concentrações variando de 0 a 4 mg L⁻¹.

Após a permanência em 2,4-D, foram selecionados os explantes que apresentavam melhor aspecto e homogeneidade. Para os tratamentos de 14 e 21 dias foram selecionados os explantes que apresentavam maior intensidade de calejamento e que não apresentavam necrose ou oxidação. Já para o tratamento de 7 dias, em que o calejamento se apresentava muito baixo ou ausente, foram selecionados aqueles que não apresentavam necrose ou oxidação. Os explantes foram transferidos para os tratamentos com ANA + TDZ e ANA + 2,4-D e mantidos por uma semana em condições de escuro e, a seguir, em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C e irradiância de 90 μmol m² s⁻¹. Foram utilizadas seis repetições por tratamento, com 10 explantes por repetição, sendo avaliado o desenvolvimento celular aos 20 e 50 dias em condições de luz.

2.3.3. Experimento 3 – Influência de concentrações de 2,4-D na indução de calos embriogênicos

Hipocótilos e cotilédones foram retirados das sementes germinadas e transferidos para placas de Petri com meio de cultura básico, acrescido de 2,4-D nas

concentrações de 5 e 10 mg L⁻¹. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, no escuro, por 60 dias. Foram utilizadas 30 placas com 10 explantes cada, por tratamento, sendo realizada uma avaliação aos 30 dias e outra aos 60 dias, em que se avaliaram: quantidade de explantes calejados, intensidade de calejamento, região de calejamento, textura do calo, coloração do calo e oxidação.

2.3.4. Experimento 4 - Tratamentos com 2,4-D (10, 20 e 30 mg L⁻¹) x Tempo (5, 10 e 15 dias)

Avaliou-se a indução de calos em cotilédones e hipocótilos em meio com 2,4-D nas concentrações de 10, 20 e 30 mg L⁻¹, combinando-se as concentrações com os tempos de permanência de 5, 10 e 15 dias. Após a permanência em meio com 2,4-D durante os tempos testados, foram selecionados os explantes de melhor aspecto (calejados e/ou não-oxidados) e transferidos para meio básico sem reguladores de crescimento (MS0). Após 30 dias realizou-se avaliação quanto a intensidade de calejamento, aspecto do calo e presença de rizogênese e oxidação. Nas duas etapas, as placas foram mantidas no escuro, em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C.

Depois de 30 dias em meio MS0 no escuro, os calos foram subcultivados para novo meio MS0, permanecendo por mais uma semana no escuro, e, posteriormente, colocados em fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de 90 μmol m⁻² s⁻¹. Foram utilizadas cinco repetições com seis explantes por repetição.

2.3.5. Experimento 5 – Subcultivo de calos em meio com carvão ativado e PVP

Os calos foram induzidos em cotilédones e hipocótilos, em meio básico acrescido de 5 e 10 mg L⁻¹ de 2,4-D, em condições de escuro. Após 20 dias em meio de indução, os calos foram subcultivados para meio básico acrescido de Timentim[®] (300 mg L⁻¹) e carvão ativado (2 g L⁻¹), em nove tratamentos com diferentes combinações de reguladores de crescimento (Quadro 1).

Os mesmos tratamentos realizados com carvão ativado foram repetidos utilizando-se 800 mg L⁻¹ de PVP (polivinilpirrolidona).

Foram utilizadas duas repetições por tratamento, explante e concentração inicial de 2,4-D, sendo para cada repetição usados três a quatro calos. Os calos foram mantidos durante 60 dias nos meios citados anteriormente e no escuro, sendo realizadas observações periódicas e avaliação aos 30 e 60 dias.

Quadro 1 – Tratamentos de subcultivo adicionados com carvão ativado

Tratamento	Combinação
M1	sem regulador e sem carvão ativado
M2	sem regulador e com carvão ativado
M3	1 mg L ⁻¹ ABA* + CA
M4	2,5 mg L ⁻¹ Cinetina + 0,5 mg L ⁻¹ 2,4-D + CA
M5	2,5 mg L ⁻¹ Cinetina + 0,5 mg L ⁻¹ ANA + CA
M6	2,0 mg L ⁻¹ 2iP + 0,5 mg L ⁻¹ ANA + CA
M7	1,0 mg L ⁻¹ 2iP + 0,1 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg L ⁻¹ AIB + CA
M8	0,1 mg L ⁻¹ BAP + 0,01 mg L ⁻¹ ANA + 0,1 mg L ⁻¹ GA ₃ * + CA
M9	1,0 mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mg L ⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg L ⁻¹ AIB + CA

* Reguladores de crescimento adicionados após autoclavagem (ABA estéril diluído em DMSO e GA₃ filtro estéril); ABA = ácido abscísico; CA = carvão ativado; Cinetina = 6-furfurilaminopurina; 2iP = 2-isopenteniladenina; AIB = ácido indolbutírico; BAP = 6-benzilaminopurina; GA₃ = ácido giberélico. DMSO = dimetilsulfóxido.

Aos 60 dias, os calos foram transferidos para MS0 e mantidos no escuro por uma semana. Em seguida, uma parte dos calos foi transferida para o claro, em fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para efeito de avaliação posterior, uma placa foi mantida no escuro no mesmo meio de regeneração.

2.4. Condução e avaliações experimentais

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o inteiramente casualizado, sendo o número de repetições e o número de explantes variáveis de acordo com o experimento.

Foi realizado acompanhamento semanal e mensal do desenvolvimento dos calos, avaliando-se número de explantes calejados, intensidade de calejamento, textura e coloração do calo, oxidação fenólica e rizogênese.

As avaliações visuais foram feitas com auxílio de lupa binocular, aumento de 10 vezes, e as avaliações de intensidade foram feitas por comparação e discriminadas como baixa, média e alta.

Quanto à textura, os calos foram classificados como friáveis (células frouxamente ligadas), compactos (células firmemente ligadas) e de textura intermediária entre estas, classificados como semifriáveis e semcompactos. Em relação ao aspecto das células, foram classificadas como translúcidas, aquosas ou globulares.

3. RESULTADOS

3.1 Obtenção dos explantes

Durante a realização dos experimentos foram observados alto índice de germinação das sementes (acima de 80%) e baixo índice de contaminação por microrganismos (5 a 10%), demonstrando que a metodologia de desinfestação e germinação utilizada foi eficiente na obtenção dos explantes para a realização dos experimentos, visando à indução de calos embriogênicos.

3.2. Efeito do carvão ativado e de concentrações de 2,4-D na indução de calos embriogênicos

A formação de calos iniciou-se após uma semana de inoculação dos explantes, sendo ao final de 30 dias observado 100% de calejamento para todos os tratamentos, com exceção do tratamento de 1 mg L⁻¹ de 2,4-D em hipocótilos e do controle (0 mg L⁻¹) para os dois tipos de explante (Figura 2). Explantes cotiledonares apresentaram calos em toda a região abaxial e em maior intensidade quando comparados com os de hipocótilos, que apresentaram calejamento nas extremidades e, em alguns casos, estendendo-se pela superfície dos explantes. A

intensidade de calejamento observada foi de baixa a média para todos os tratamentos.

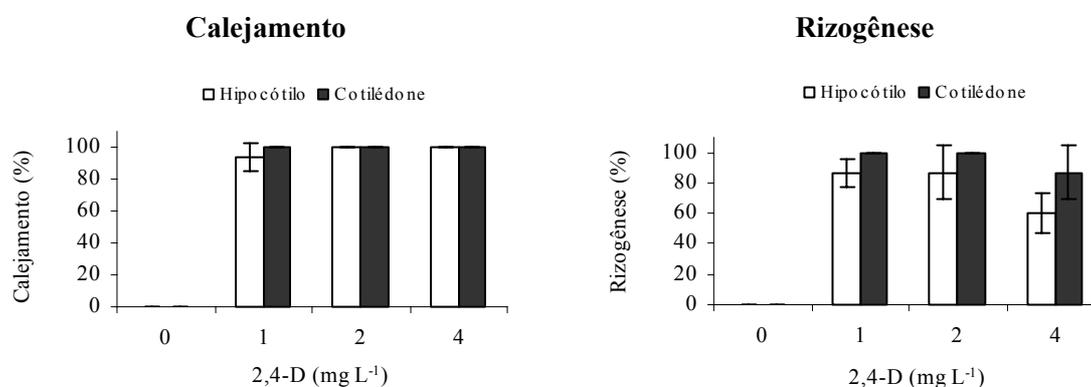


Figura 2 – Percentual de calejamento e rizogênese em cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* aos 30 dias, em função das concentrações de 2,4-D. As barras indicam o desvio-padrão.

A presença de calos semifriáveis a semicompactos de coloração amarelo-clara a bege (Figura 3A) foi observada em todos os tratamentos, porém calos formados em hipocótilos mostraram-se mais translúcidos e de aspecto aquoso quando comparados aos formados em cotilédones, que foram de textura mais consistente, com algumas regiões de coloração branca e compostos por agrupamento de células menores, aparentemente mais organizadas.

Quanto à formação de raízes, estas ocorreram em maior percentual nos explantes cotiledonares, sendo também maiores e em maior número em cada explante (Figura 2, 3B). Houve tendência de redução da rizogênese à medida que se aumentou a concentração de 2,4-D.

Observou-se necrose dos tecidos originais apenas nos tratamentos sem regulador de crescimento. No entanto, no tratamento de 4 mg L⁻¹ de 2,4-D, alguns explantes apresentaram calos com regiões mais escurecidas e, aparentemente, em degeneração tanto em cotilédones como em hipocótilos.

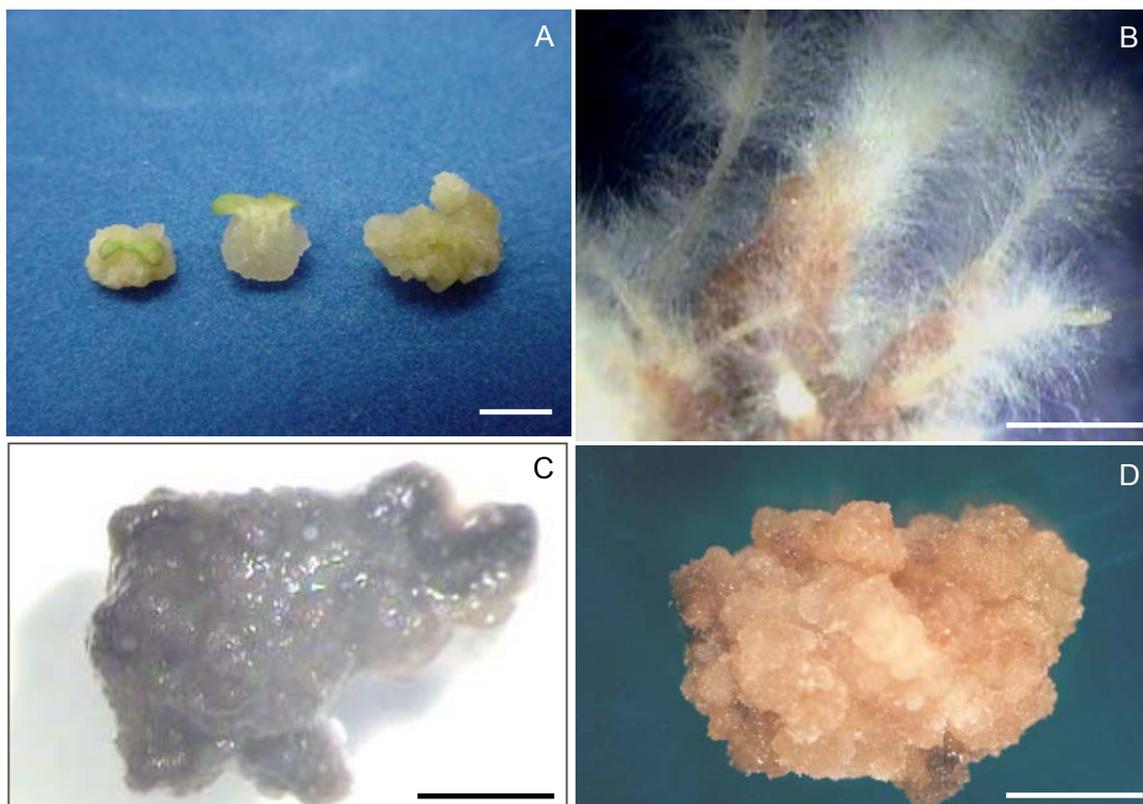


Figura 3 - Calejamento em cotilédones de *Eucalyptus grandis*. A) calos semifriáveis a semicompactos, apresentando intensidade baixa (b), média (m) e alta (a). Barra = 5 mm. B) alta freqüência de rizogênese. C) calos compactos e totalmente oxidados. D) calos compactos. Barras = 2 mm.

No presente estudo não foram observadas estruturas embriogênicas visíveis em nenhuma concentração de 2,4-D (0 a 4 mg L⁻¹) e em nenhum tipo de explante. Em ensaios preliminares (dados não apresentados) foram testadas concentrações inferiores a 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D; no entanto, a calogênese foi insignificante e com intensa formação de raízes nos explantes.

No que se refere à utilização de carvão ativado, não houve resposta morfológica dos explantes quando este foi adicionado aos tratamentos anteriormente descritos.

Ao subcultivar os calos para os meios de regeneração M1 e M2 e transferi-los para condições de luz (36 μmol m⁻² s⁻¹), ocorreu escurecimento total destes (Figura 3C), não havendo crescimento de calo ou diferenciação de embriões.

3.3. Tempo de permanência em 2,4-D e tratamentos de regeneração

Aos 20 dias após a transferência para a luz, os calos apresentavam-se semicompactos e escurecidos (oxidados) nos tratamentos de 7, 14 e 21 dias em 2,4-D. O tratamento de 21 dias foi o que apresentou maior calejamento, e o de 7 dias, calejamento muito baixo. Quanto aos tratamentos de regeneração, observou-se que os tratamentos T1 e T2 (ANA + 2,4-D) apresentaram menor proliferação celular e maior rizogênese quando comparados aos tratamentos T3 e T4 (ANA + TDZ).

Aos 50 dias, em todos os tratamentos, os calos tornaram-se mais compactos e oxidados (Figura 3C). Semelhantemente à avaliação anterior, nos três tratamentos de permanência em 2,4-D, os tratamentos de regeneração T1 e T2 apresentaram rizogênese mais intensa, enquanto os tratamentos T3 e T4 exibiram regiões de coloração verde ou esbranquiçada, sem presença de raízes e com maior proliferação de células. Observou-se, também, que a intensidade de calejamento decresceu nos tratamentos de 14 e 7 dias, em relação ao tratamento de 21 dias em 2,4-D.

Em termos gerais, não foram obtidas estruturas embriogênicas nos tratamentos testados. Em relação ao tempo de permanência em 2,4-D para indução de calos, os resultados indicaram que o tempo inferior a 21 dias na concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D não é ideal para um bom calejamento em *Eucalyptus grandis*.

Em função dos resultados obtidos, em experimentos posteriores verificou-se novamente a influência do tempo de permanência em 2,4-D utilizando-se concentrações mais altas deste regulador de crescimento.

3.4. Influência de concentrações de 2,4-D na indução de calos embriogênicos

Concentrações mais altas de 2,4-D (5 e 10 mg L^{-1}) aumentaram a intensidade de calejamento, comparadas às concentrações de 1 a 4 mg L^{-1} , sendo observado maior percentual total de calejamento na concentração de 5 mg L^{-1} (Figura 4). O calejamento total aos 30 dias foi maior em hipocótilos do que em cotilédones; contudo, explantes cotiledonares apresentaram calejamento distribuído nas três

categorias de intensidade, enquanto hipocótilos apresentaram maiores percentuais de explantes com calejamento baixo.

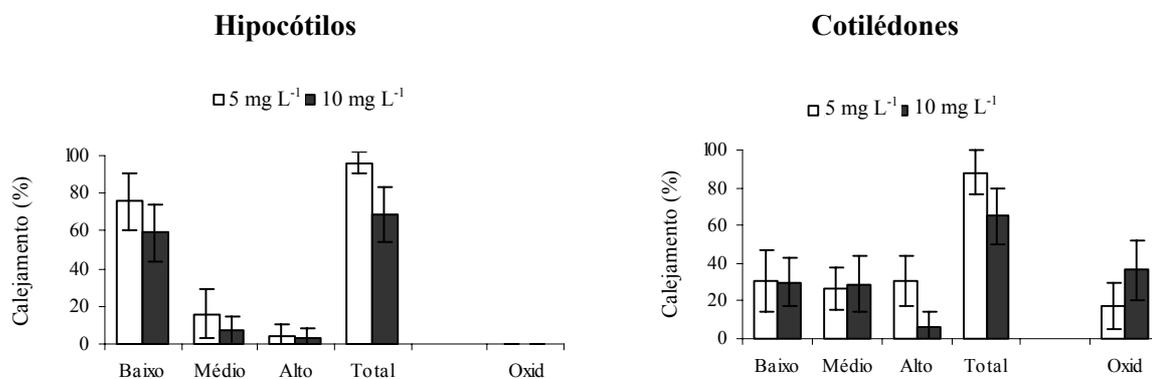


Figura 4 – Percentual e intensidade de calejamento e oxidação (Oxid) em hipocótilos e cotilédones de *Eucalyptus grandis* aos 30 dias, nos tratamentos de 5 e 10 mg L⁻¹ de 2,4-D. As barras indicam o desvio-padrão.

Os calos observados foram de textura semifriável, com algumas porções apresentando células globulares (Figura 3A). Houve, também, baixa rizogênese em relação às concentrações menores testadas anteriormente, que, associada à maior friabilização dos calos, pode ser um indicativo de maior probabilidade de regeneração de embriões somáticos nesses tratamentos.

A presença de explantes oxidados ocorreu somente em cotilédones e em maior percentual no tratamento de 10 mg L⁻¹ de 2,4-D, podendo ser um sinal de toxicidade deste regulador na concentração utilizada.

Aos 60 dias observou-se que o calejamento total na concentração de 5 mg L⁻¹ de 2,4-D manteve-se o mesmo quando comparado ao calejamento aos 30 dias; já em 10 mg L⁻¹ o percentual foi maior para os dois tipos de explantes (Figura 5). Observou-se, também, aumento nas intensidades de calejamento média e alta, porém as células destes calos demonstraram-se determinadas para multiplicação celular desorganizada, visto o desaparecimento de regiões de calos com setores nodulares, observadas aos 30 dias.

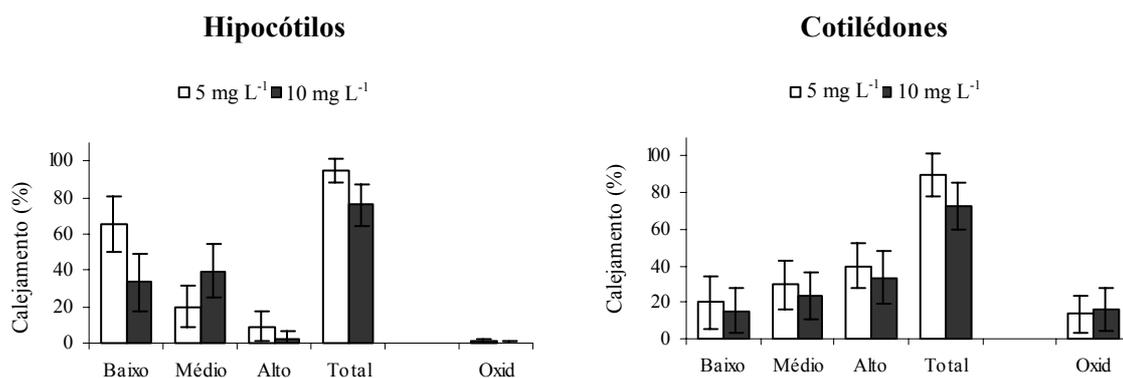


Figura 5 – Percentual e intensidade de calejamento e oxidação (Oxid) em hipocótilos e cotilédones de *Eucalyptus grandis* aos 60 dias, nos tratamentos de 5 e 10 mg L⁻¹ de 2,4-D. As barras indicam o desvio-padrão.

Quanto à oxidação, em cotilédones constatou-se diminuição do percentual em relação à avaliação realizada aos 30 dias. Essa redução pode estar associada ao aumento na massa de calos; mesmo estando estes oxidados, os explantes podem estar reagindo e proliferando e, dessa maneira, cobrindo com células novas a região oxidada e visualizada anteriormente. Em hipocótilos, observou-se percentual de oxidação insignificante.

A textura dos calos observada aos 60 dias foi semicompacta e semifriável, não sendo observados calos friáveis em nenhum tratamento e em nenhum tipo de explante (Quadro 3). Calos semifriáveis foram encontrados em maior proporção no tratamento de 5 mg L⁻¹ de 2,4-D em cotilédones e 10 mg L⁻¹ em hipocótilos, sugerindo uma tendência de friabilização dos calos formados em hipocótilos e compactação em cotilédones com o aumento da concentração de 2,4-D.

Quadro 3 – Textura de calo (%) observada em hipocótilos (Hip) e cotilédones (Cot) de *E. grandis* em função das concentrações de 2,4-D aos 60 dias

Textura	Concentração de 2,4-D			
	5 mg L ⁻¹		10 mg L ⁻¹	
	Hip	Cot	Hip	Cot
Semicompacta	76,83	39,06	51,27	68,78
Semifriável	23,17	60,94	48,73	31,22

3.5. Tratamentos com 2,4-D (10, 20 e 30 mg L⁻¹) X Tempo (5, 10 e 15 dias)

De acordo com a Figura 6, observa-se que apenas cinco dias em meio com 10, 20 ou 30 mg L⁻¹ de 2,4-D foram suficientes para induzir a formação de calos em cotilédones e hipocótilos. No entanto, a intensidade de calejamento foi baixa para as três concentrações, com exceção do pequeno percentual de calejamento médio em hipocótilos na concentração de 30 mg L⁻¹ de 2,4-D.

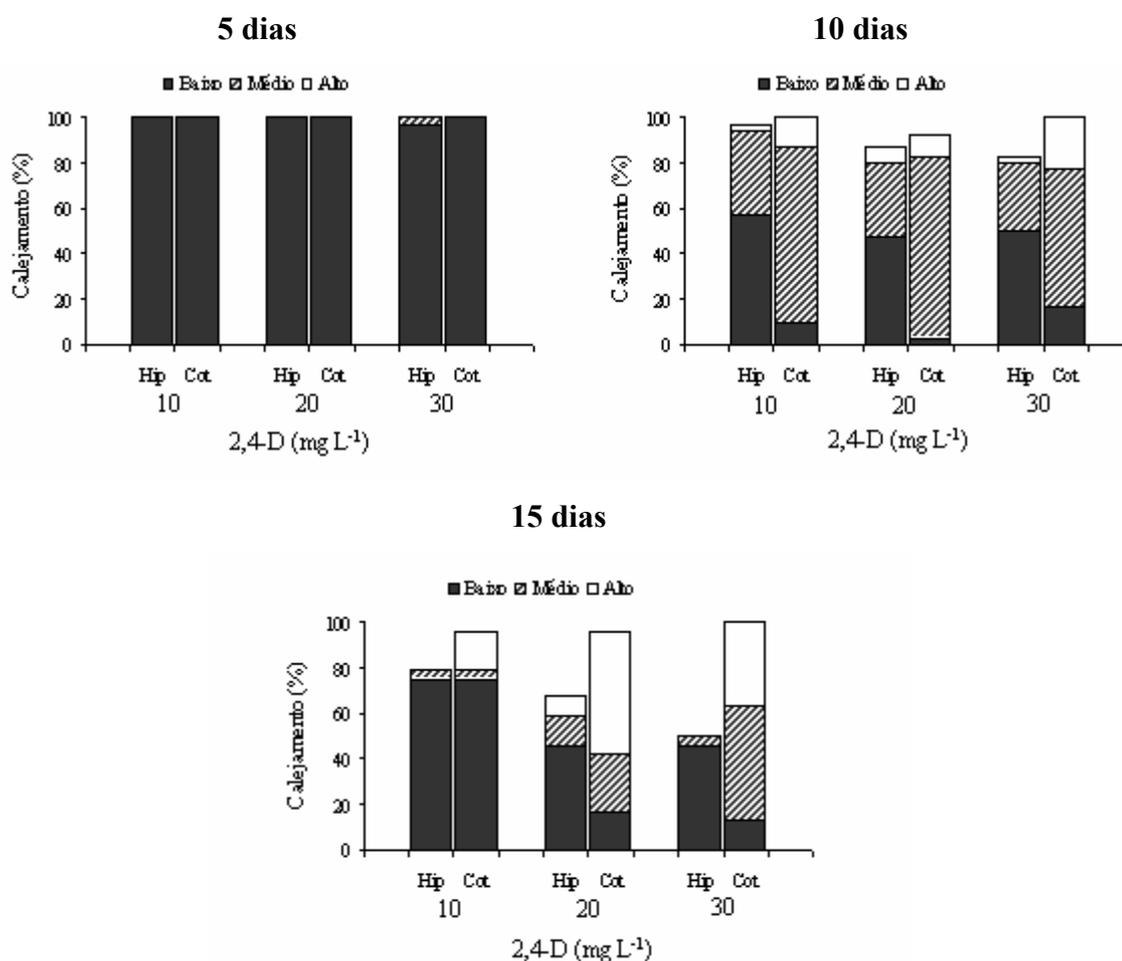


Figura 6 – Percentual de calejamento em função do tipo de explante (Hip = hipocótilo, Cot = cotilédone), concentrações de 2, 4-D (10, 20 e 30 mg L⁻¹) e tempos de permanência em meio com 2,4-D (5, 10 e 15 dias), aos 30 dias em MS0.

Aos 10 dias de manutenção em meio com 2,4-D, verificou-se redução no percentual de calejamento total, principalmente em hipocótilos, acompanhada de aumento na intensidade de calejamento para os dois tipos de explante. Os maiores percentuais foram de calejamento médio em explantes cotiledonares, sendo nestes explantes observados, também, maiores percentuais de calejamento alto em relação aos explantes de hipocótilos.

No tratamento de 15 dias em 2,4-D observou-se queda bastante acentuada do calejamento total em hipocótilos. Já em explantes cotiledonares o percentual foi mantido, e nas concentrações de 20 e 30 mg L⁻¹ de 2,4-D houve aumento no percentual de calejamento alto em relação aos tempos de 5 e 10 dias.

Com relação à formação de raízes e oxidação dos explantes, constatou-se redução da rizogênese com o aumento da concentração de 2,4-D e redução da oxidação com o aumento do tempo de permanência em 2,4-D (Quadro 4).

Quadro 4 – Rizogênese e oxidação fenólica em hipocótilos e cotilédones de *E. grandis* em relação aos tratamentos de 5, 10 e 15 dias em meio com 10, 20 e 30 mg L⁻¹ de 2,4-D

Tempo	2,4-D (mg L ⁻¹)	Resposta do explante	Cotilédones	Hipocótilos
5 dias	10	Rizogênese	Média a alta	Alta
		Oxidação	Alta	Alta
	20	Rizogênese	Baixa	Baixa
		Oxidação	Alta	Alta
	30	Rizogênese	Baixa	Baixa
		Oxidação	Alta	Alta
10 dias	10	Rizogênese	Média	Média
		Oxidação	Média a alta	Média
	20	Rizogênese	Média a baixa	Média a baixa
		Oxidação	Média a baixa	Baixa
	30	Rizogênese	Baixa	Baixa
		Oxidação	Média a alta	Baixa
15 dias	10	Rizogênese	Média	Baixa
		Oxidação	Média a alta	Baixa
	20	Rizogênese	Baixa	Baixa
		Oxidação	Média a alta	Baixa
	30	Rizogênese	Baixa	Baixa
		Oxidação	Média a alta	Baixa

Em geral, todos os calos obtidos apresentaram oxidação, sendo esta em maior ou menor intensidade, de acordo com os tratamentos. Foram observados, isoladamente, alguns calos de bom aspecto (presença de regiões com células mais claras) nos tratamentos de 20 e 30 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Após o subcultivo dos calos para novo meio MS0 e transferência para fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 90 μmol m⁻² s⁻¹, a oxidação dos explantes tornou-se mais intensa, sendo observado, inclusive, escurecimento total do meio de cultura.

3.6. Subcultivo de calos em meio com carvão ativado e PVP

De acordo com o Quadro 5, observa-se que, em geral, em todos os tratamentos houve efeito negativo da utilização do carvão ativado, o qual causou escurecimento dos calos e estagnação da multiplicação e do desenvolvimento das células.

Em todos os tratamentos o calejamento foi baixo, com exceção do M1, no qual a não-utilização de carvão e de reguladores de crescimento favoreceu o desenvolvimento dos calos. Apesar de estes terem sido de textura compacta, observaram-se regiões de células de coloração amarelada em cotilédones e hipocótilos.

No tratamento com ABA (M3), observou-se rizogênese mais intensa e presença de regiões com células de coloração mais clara em hipocótilos e nos tratamentos M6 (2,0 mg L⁻¹ 2iP + 0,5 mg L⁻¹ ANA) e M7 (1,0 mg L⁻¹ 2iP + 0,1 mg L⁻¹ 2,4-D + 0,1 mg L⁻¹ AIB), também em hipocótilos, foram observadas células reativas de textura semicompacta e coloração mais clara.

Em nenhum dos tratamentos foram constatados calos de textura friável ou semifriável, assim como não foram visualizadas estruturas semelhantes a embriões somáticos. Observaram-se, também, calos mais compactados (Figura 3D) nos tratamentos com Cinetina (M4 e M5) e BAP (M8 e M9).

Os calos subcultivados para os mesmos tratamentos, porém utilizando PVP (800 mg L⁻¹) em vez de carvão ativado, também não apresentaram resultados satisfatórios (dados não apresentados).

Quadro 5 – Resposta dos explantes subcultivados em meios de cultura com carvão ativado

Tratamento (subcultivo)	Meio de indução	Resposta do explante	Cotilédones	Hipocótilos
M1	2,4-D (5 mg L ⁻¹)	Calejamento	Médio	Baixo
		Aspecto do calo	Compacto, escuro com regiões amareladas	Agrupamento de células claras e organizadas
		Rizogênese	Média	Alta
	2,4-D (10 mg L ⁻¹)	Calejamento	Médio a alto	Baixo a médio
		Aspecto do calo	Compacto, de coloração branca a amarela	Compacto, de coloração branca a amarela
		Rizogênese	Baixa	Baixa
M2, M4, M5, M8 e M9	2,4-D (5 mg L ⁻¹)	Calejamento	Baixo	Baixo
		Aspecto do calo	Compacto e escuro	Compacto e escuro
		Rizogênese	Baixa	Baixa
	2,4-D (10 mg L ⁻¹)	Calejamento	Baixo	Baixo
		Aspecto do calo	Compacto e escuro	Compacto e escuro
		Rizogênese	Baixa	Baixa
M3	2,4-D (5 mg L ⁻¹)	Calejamento	Baixo	Baixo
		Aspecto do calo	Compacto e escuro	Regiões mais claras isoladas
		Rizogênese	Baixa	Alta
	2,4-D (10 mg L ⁻¹)	Calejamento	Baixo	Baixo
		Aspecto do calo	Compacto e escuro	Regiões mais claras isoladas
		Rizogênese	Baixa	Alta
M6, M7	2,4-D (5 mg L ⁻¹)	Calejamento	Baixo	Baixo
		Aspecto do calo	Compacto e escuro	Regiões mais claras semcompactas
		Rizogênese	Baixa	Baixa
	2,4-D (10 mg L ⁻¹)	Calejamento	Baixo	Baixo
		Aspecto do calo	Compacto e escuro	Regiões mais claras, células reativas
		Rizogênese	Baixa	Baixa

4. DISCUSSÃO

Células embriogênicas e não-embriogênicas foram obtidas por Watt et al. (1991, 1999) em explantes foliares de *E. grandis*, em meio contendo 2,4-D (0,25 a

3,0 mg L⁻¹). No presente trabalho, estruturas embriogênicas não foram observadas em nenhuma concentração de 2,4-D e em nenhum tipo de explante. Pinto et al. (2002) também não obtiveram embriões somáticos em folhas, entrenós, cotilédones, hipocótilos e embriões zigóticos maduros de *E. globulus* utilizando 2,4-D isoladamente ou em combinação com BAP ou zeatina [N-(4-hidroxi-3metilbut-2-enil) aminopurina]. Embriões somáticos foram obtidos por esses autores em cotilédones e embriões zigóticos maduros em meio com 2,4-D associado com ANA ou somente ANA. Semelhantemente a esses resultados, Termignoni et al. (1996) obtiveram embriões somáticos de *E. dunnii* utilizando combinações de ANA (0,55-55 µM) e 2,4-D (0,45-4,5 µM).

A regeneração direta de embriões somáticos de *Eucalyptus* não tem sido reportada com frequência, sendo relatada até o momento somente para *E. citriodora* (Muralidharan e Mascarenhas, 1995) e *E. globulus* (Nugent et al., 2001, Pinto et al., 2002). Nos outros trabalhos, embriogênese somática ocorreu com prévia formação da fase de calo. Diversos tipos de calo são citados, os quais posteriormente regeneraram embriões somáticos. Nugent et al. (2001) obtiveram calos soltos, macios e tendendo a acumular fenóis em poucas semanas após o início do calejamento. Calos embriogênicos em outras espécies de *Eucalyptus* são descritos como de coloração marrom, com setores nodulares de cor branca (Termignoni et al., 1996), friáveis e brancos (Boulay, 1987, citado por Nugent et al., 2001), de coloração creme e nodulares ou acinzentados e macios (Furze, 1988, citado por Nugent et al., 2001). Similarmente, Blakeway et al. (1993) descreveram calos com células embriogênicas de *E. grandis* de cor creme a branca ou marrom, sendo macios ou nodulares. Os calos obtidos no presente trabalho assemelharam-se, em aspecto, textura e coloração, aos calos anteriormente descritos.

A oxidação fenólica tem sido mencionada como um dos problemas mais sérios para o estabelecimento de culturas organogênicas e embriogênicas em *Eucalyptus* e, provavelmente, a principal causa envolvida na baixa frequência de indução de embriões somáticos (Pinto et al., 2002). Na tentativa de contornar ou reduzir a acumulação de compostos fenólicos, a manutenção das culturas durante um período no escuro, geralmente na fase de indução, tem sido citada (Watt et al.,

1991). O cultivo de tecidos de hipocótilos e cotilédones sob condições de escuridão também reduziu a incidência de escurecimento dos tecidos em *E. nitens* e *E. globulus*, porém não aumentou a capacidade dos tecidos em regenerar brotos, comparado ao cultivo dos tecidos à luz (Bandyopadhyay et al., 1999). No entanto, a luz demonstrou ser fator decisivo para resposta embriogênica, com embriões somáticos ocorrendo em irradiâncias variando de 40 a 50 $\mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Termignoni et al., 1996; Nugent et al., 2001).

No presente caso, foi observado alto índice de calos com rizogênese, fato comumente descrito em trabalhos de embriogênese somática em *Eucalyptus*. A formação abundante de raízes dificultou a visualização de calos embriogênicos em *E. globulus* (Pinto et al., 2002). Também em *E. globulus*, embriões somáticos regeneraram-se diretamente somente em partes de cotilédones que não formaram raízes adventícias (Nugent et al., 2001).

Não houve resposta morfogênica dos explantes com a adição de carvão ativado nos tratamentos de indução de calos descritos, provavelmente pelo fato de o carvão ativado indisponibilizar certas quantias de 2,4-D no meio de cultura, reduzindo sua concentração a níveis insuficientes para promover a ativação dos tecidos. A presença de carvão ativado foi essencial para a obtenção de embriogênese direta em urucum (*Bixa orellana*), e sua ausência determinou embriogênese somática indireta (Paiva Neto et al., 2003).

O tipo de regulador de crescimento, a concentração e a composição do meio secundário são fatores importantes na organogênese ou embriogênese somática de *Eucalyptus*. Ao transferir calos induzidos em 2,4-D para meio com carvão ativado, observou-se escurecimento dos calos e estagnação da multiplicação e desenvolvimento das células. Nos trabalhos de Watt et al. (1991), o carvão ativado adicionado ao meio de regeneração reduziu o tempo de germinação dos embriões e aumentou o número de calos que regeneraram embriões. Em controvérsia, o carvão ativado também não apresentou efeito positivo em organogênese de *E. nitens* e *E. globulus* (Bandyopadhyay et al., 1999).

É conhecido que certos níveis de auxinas inibem a maturação de embriões, retardando a germinação e conversão de embriões em plantas (Ammirato, 1983,

citado por Watt et al., 1991). A utilização do carvão ativado tem sido reconhecida por absorver certas quantias de auxinas e citocininas, bem como 5-hidroximetil furfural, um inibidor formado pela degradação da sacarose durante autoclavagem (Weatherhead et al., 1978, citados por Watt et al., 1991). De acordo com Johansson et al. (1982) e Johansson (1983), citados por Paiva Neto (2002), o carvão ativado é capaz de capturar gases e pode inativar o etileno, ou outros gases liberados na cultura de tecidos.

Exposição a concentrações excessivas ou tratamentos prolongados de reguladores de crescimento podem resultar em desenvolvimento diferente daquele desejado. A exposição de células a auxinas além do tempo necessário à indução de embriogênese, por exemplo, pode resultar na produção de calos não-regenerativos em vez de tecido embriogênico (George, 1993). Caligari e Shohet (1993), citados por Guerra et al. (1999), sugerem que a manutenção prolongada das culturas embriogênicas em meio com 2,4-D causa variações genéticas e epigenéticas que afetam o potencial embriogênico. Tem-se observado que, em alguns sistemas, os embriões somáticos tornam-se habituados durante períodos prolongados de subcultivos em 2,4-D, resultando na perda do potencial de maturação (Tautorus et al., 1991).

Tratamentos de pulsos com a exposição do material durante um curto período de tempo, a uma concentração relativamente alta de determinado regulador de crescimento, em alguns casos podem ser tão efetivos quanto a exposição contínua a baixas concentrações. Por meio de tratamentos de pulsos de reguladores de crescimento durante períodos progressivos, é possível monitorar o ganho de competência e o início da determinação nos tecidos. Explantes requerem exposição a um regulador de crescimento por um comprimento mínimo de tempo para um dado evento morfogênico ser iniciado (George, 1993).

Tratamentos de pulso de duas semanas em 2,4-D foram suficientes para proporcionar valores similares de indução e produção de embriões somáticos, àqueles obtidos com choques de quatro e oito semanas em *Acca sellowiana* (Guerra et al., 2001). Em *Carica pubescens*, as melhores indução e formação de embriões somáticos ocorreram com choques de seis dias em meio de cultura suplementado

com 2,4-D e BAP (Jordan e Velozo, 1996). Também em cenoura, 0,05 μM de 2,4-D foi requerido durante seis dias para induzir células competentes a formar embriões somáticos. Além desse estágio, a auxina foi inibitória (Komamine et al., 1990, citados por George, 1993).

Tratamento de pulsos com reguladores de crescimento são efetivos para algumas situações. No entanto, a capacidade de indução e expressão da morfogênese *in vitro* pode demandar longo tempo e complexos tratamentos para outros genótipos, especialmente tratando-se de espécies recalcitrantes ou explantes com maior grau de maturidade. Para estes casos, em que o tipo/combinções de reguladores de crescimento e o tempo e/ou a duração da exposição a reguladores ainda não estão estabelecidos, a busca da condição certa para induzir morfogênese *in vitro* é baseada em experiência de tentativa e erro, analisando-se o efeito de diferentes condições de cultura e meio e modificando-se especialmente o tipo e os níveis dos reguladores de crescimento de plantas, bem como o tempo de exposição das culturas a determinadas condições.

Em todos os trabalhos de embriogênese somática em *Eucalyptus* citados anteriormente, a frequência de regeneração de embriões somáticos tem sido baixa e a conversão de embriões em plântulas nem sempre é alcançada, assim como se discute a falta de sincronização do desenvolvimento e o alto índice de embriões somáticos anormais. Outro aspecto observado é a não-repetibilidade dos resultados; dessa maneira, a obtenção de um protocolo eficiente e reproduzível de embriogênese somática em espécies de *Eucalyptus* representa um grande desafio.

5. CONCLUSÕES

Os melhores resultados de calogênese foram observados em cotilédones, nos tratamentos com 5 e 10 mg L^{-1} de 2,4-D, sendo 30 dias no escuro o melhor tempo e condição de indução. Em geral, foram observados calos de coloração amarelo-clara a amarelo-escura, de textura semicompacta a semifriável, porém não foram observadas estruturas embriogênicas.

A presença de rizogênese foi alta em todos os experimentos, sendo menor à medida que se aumentava a concentração de 2,4-D.

Os tratamentos de subcultivo não apresentaram resultado satisfatório na regeneração de embriões somáticos, sendo observadas oxidação e compactação muito altas nos calos induzidos. Melhores resultados foram constatados quando os calos foram transferidos para meio livre de reguladores de crescimento.

Não houve redução da oxidação fenólica utilizando-se PVP e carvão ativado; e o carvão ativado foi inibitório na fase de indução de calos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRUDA, S.C.C., SOUZA, G.M., ALMEIDA, M., GONÇALVES, A.N. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.63, p.143-154, 2000.
- ASTARITA, L.V., GUERRA, M.P. Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* – induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, n.2, p.113-118, 1998.
- BANDYOPADHYAY, S., CANE, K., RASMUSSEN, G., HAMILL, J.D. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species – *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Plant Science**, v.140, p.189-198, 1999.
- BANDYOPADHYAY, S., HAMILL, J.D. Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. **Annals of Botany**, v.86, p.237-244, 2000.
- BLAKEWAY, F.C., HERMAN, B., WATT, M.P. Establishment of cell suspension cultures of *Eucalyptus grandis* and *E. grandis* x *camaldulensis*. **South African Forestry Journal**, v.166, p.17-26, 1993.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture – The technology**. 6 ed. England: Exegetics, 1993. v.1, 575p.
- GUERRA, M.P., DAL VESCO, L.L., DUCROQUET, J.P.H.J., NODARI, R.O., REIS, M.S. Somatic embryogenesis in goiabeira serrana: genotype response, auxinic shock and synthetic seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.117-128, 2001.

- GUERRA, M.P., TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1999. v.2, p.533-568.
- JORDAN, M., VELOZO, J. Improvement of somatic embryogenesis in highland-papaya cell suspensions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p.189-194, 1996.
- KOMAMINE, A.; KAWAHARA, R.; MATSUMOTO, M.; SUNABORI, S.; TOYA, T.; FUJIWARA, A.; TSUKUHARA, M.; SMITH, J.; ITO, M.; FUKUDA, H.; NOMURA, K.; FUJIMURA, T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, v.28, p. 11-14, 1992.
- KRIKORIAN, A.D. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: DAVIES, P.J. (Ed.). **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.774-796.
- MOSER, J.R., GARCIA, M.G., VIANA, A.M. Establishment and growth of embryogenic suspension cultures of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.78, p.37-42, 2004.
- MURALIDHARAN, E.M., MASCARENHAS, A.F. In vitro plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *E. citriodora*. **Plant Cell Reports**, v.6, p.256-259, 1987.
- MURALIDHARAN, E.M., MASCARENHAS, A.F. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus*. In: JAIN, S.M., GUPTA, P.K., NEWTON, R.J. (Eds.). **Somatic embryogenesis in woody plants**, vol.2. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.23-40.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NUGENT, G., CHANDLER, S.F., WHITEMAN, P., STEVENSON, T.W. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.67, p. 85-88, 2001.
- PAIVA NETO, V.B. **Morfogênese in vitro de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Viçosa, MG: UFV, 2002. 105f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- PAIVA NETO, V.B., BOTELHO, M.N., AGUIAR, R., SILVA, E.A.M., OTONI, W.C. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of annatto (*Bixa orellana* L.). **In Vitro Cellular and Development Biology - Plant**, v.39, p.629-634, 2003.

- PINTO, G., SANTOS, C., NEVES, L., ARAUJO, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, v.21, n.3, p.208-213, 2002.
- SHAHANA, S., GUPTA, S. Somatic embryogenesis in *Sesbania sesban* var. bicolor: a multipurpose fabaceous woody species. **Plant Cell tissue and Organ Culture**, v.69, p.289-292, 2002.
- SHIBLI, R.A., SHATNAWI, M., ABU-HEIN, AL-JUBOORY, K.H. Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of 'Nabali' Olive (*Olea europea* L.). **Scientia Horticulturae**, v.88, p.243-256, 2001.
- TAN, C.L., FURTEK, D.B. Development of an in vitro regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. **Plant Science**, v.164, p.407-412, 2003.
- TAUTORUS, T.E., FOWKE, L.C., DUNSTAN, D.J. Somatic embryogenesis in conifers. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.1873-1899, 1991.
- TERMIGNONI, R.R., WANG, P., HU, C. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, p.129-132, 1996.
- 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**. v.110, p.139-145, 1995.
- WATT, M.P., BLAKEWAY, F., CRESSWELL, C.F., HERMAN, B. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, v.157, p.59-65, 1991.
- WATT, M.P., BLAKEWAY, R. TERMIGNONI, R. JAIN, S.M. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* e *E. dunnii*. In: JAIN, S.M., GUPTA, P.K., NEWTON, R.J. (Eds.). **Somatic embryogenesis in woody plants**, vol.5. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999. p.63-78.

CAPÍTULO II

Embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*: efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram

RESUMO – Este trabalho objetivou avaliar o efeito das auxinas dicamba e picloram na indução de embriogênese somática em embriões zigóticos maduros, cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis*. Os calos foram induzidos em meio de cultura MS contendo dicamba (0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) ou picloram (0,5; 1,5; 5,0 e 10,0 mg L⁻¹). Nos tratamentos com 0,5 mg L⁻¹ de dicamba ou 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ de picloram, em explantes cotiledonares, foram observadas estruturas semelhantes a embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. A análise histológica confirmou tratar-se de estruturas independentes, sugerindo a presença de um sistema vascular fechado.

Palavras-chave: Micropropagação, cultura de tecidos, propagação clonal, auxinas.

Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*: effect of the growth regulators dicamba and picloram

ABSTRACT – The objective of this work was to evaluate the effect of the auxins dicamba and picloram on the induction of somatic embryogenesis for mature zygotic embryos, cotyledons and hypocotyls of *Eucalyptus grandis*. Callus induction occurred in MS culture medium with dicamba (0.25; 0.5; 1.0 and 2.0 mg L⁻¹) or picloram (0.5; 1.5; 5.0 and 10.0 mg L⁻¹). Treatments with dicamba (0.5 mg L⁻¹) or picloram (5.0 and 10.0 mg L⁻¹) for cotyledon explants, gave structures similar to somatic embryos at different development stages. The histological analysis confirmed the presence of independent structures, suggesting the existence of a independent vascular system.

Key words: Micropropagation, tissue culture, clonal propagation, auxins.

1. INTRODUÇÃO

Na busca de novas tecnologias para o constante aprimoramento da clonagem de *Eucalyptus*, a embriogênese somática tem despertado interesse especial por parte de instituições de pesquisa e empresas florestais brasileiras que possuem avançados programas de melhoramento e clonagem.

A embriogênese somática é uma técnica de cultura de tecidos que consiste na formação de embriões sem a ocorrência da fertilização, ou seja, através de estímulos especiais, células somáticas são induzidas a formar embriões e posteriormente convertidas em plantas, passando por estádios semelhantes aos observados na embriogênese zigótica (Guerra et al., 1999).

De especial interesse para a área florestal está o uso de embriões somáticos na propagação em massa de *Eucalyptus*, especialmente para aquelas espécies ou clones de difícil enraizamento, proporcionando uma alternativa ao enraizamento de estacas e de brotações micropropagadas (Bajaj, 1995). Além disso, a embriogênese somática constitui-se numa técnica básica para outras aplicações biotecnológicas, incluindo transformação genética, hibridação somática e preservação de germoplasma (Vicent e Martinez, 1998).

Nas últimas décadas, a formação de embriões somáticos ou estruturas embriogênicas tem sido reportada para *E. grandis* (Watt et al., 1991; Major et al., 1997), *E. dunnii* (Termignoni et al., 1996), *E. nitens* (Ruaud et al., 1997; Bandyopadhyay et al., 1999; Bandyopadhyay e Hamill, 2000), *E. urophylla* (Tibok et al., 1995; Arruda et al., 2000) e *E. globulus* (Nugent et al., 2001; Bandyopadhyay et al., 1999; Pinto et al., 2002). No entanto, a maioria dos trabalhos relata a inexistência de um protocolo eficiente de regeneração de *Eucalyptus* por embriogênese somática, uma vez que ainda existem problemas básicos a serem solucionados, como o número reduzido de embriões obtidos e a baixa taxa de conversão dos embriões em plantas.

As auxinas dicamba (ácido 3,6-dicloroanísico) e picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico), como indutoras de embriogênese somática, têm sido investigadas com frequência em espécies agrônômicas. A formação direta de

embriões somáticos em *Paspalum scrobiculatum* ocorreu com a utilização de altos níveis de picloram, isoladamente ou em combinação com cinetina (Kaur e Kothari, 2004). Picloram também foi efetivo na obtenção de embriogênese somática repetitiva em *Arachis hypogaea* (Little et al., 2000). Dicamba promoveu a formação de embriões somáticos em trigo (George, 1993), *Musa* (Lee et al., 1997) e *Arachis hypogaea* (Little et al., 2000).

Geralmente, calos embriogênicos são induzidos em *Eucalyptus* em meio contendo 1–5 mg L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) ou 0,5–5 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético). Investigações sobre o efeito de dicamba e picloram na embriogênese somática se restringem aos trabalhos com *E. globulus* (Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002) e *E. urophylla* (Arruda et al., 2000).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito das auxinas dicamba e picloram na indução de embriogênese somática em embriões zigóticos maduros, cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa - UFV, localizada no município de Viçosa, Minas Gerais.

Foram utilizadas sementes de *Eucalyptus grandis* procedentes da Área de Produção de Sementes, localizada no município de Mogi Guaçu, São Paulo, da empresa International Paper do Brasil.

2.2. Obtenção dos explantes

As sementes foram inicialmente lavadas seis vezes com água deionizada e, a seguir, manipuladas em câmara de fluxo laminar, onde foram desinfestadas com

solução de álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 5% durante 15 minutos, sendo então enxaguadas por seis vezes com água deionizada e autoclavada.

A seguir, as sementes desinfestadas foram inoculadas em placas de Petri descartáveis estéreis (60 x 15 mm) contendo 15 ml de meio de cultura para germinação. Foi utilizado o meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo a metade da concentração dos sais e vitaminas, 50 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1,5% de sacarose, 2,8 g L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma, USA), sendo o pH do meio ajustado para 5,7 ± 0,1 e autoclavado por 15 minutos. As placas foram vedadas com filme de PVC (Goodyear, Brasil) e as culturas mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas na luz e 8 horas no escuro e irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹ (fornecida por tubos fluorescentes, “Luz do dia”, Osram[®], 20 Watts), por um período de 7 a 10 dias, até completarem a germinação.

Como fonte de explantes foram utilizados os embriões zigóticos maduros (sementes desinfestadas inteiras), e das sementes germinadas *in vitro* foram obtidos os cotilédones totalmente expandidos (com aproximadamente 10 dias), os quais foram separados, retirando-se o meristema apical e segmentos de hipocótilos medindo cerca de 0,5 a 1,0 cm de comprimento.

2.3. Indução de calos

Embriões zigóticos maduros, cotilédones e hipocótilos de *E. grandis* foram inoculados em placas de Petri descartáveis estéreis (60 x 15 mm), contendo 15 ml de meio para indução de calos. O meio de indução foi composto por sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962) mio-inositol (100 mg L⁻¹), sacarose (3%), Phytigel[®] (2,8 g L⁻¹) e com dicamba (0,25; 0,5; 1,0; e 2,0 mg L⁻¹) ou picloram (0,5; 1,5; 5,0; e 10,0 mg L⁻¹). Neste experimento não se incluiu o controle (0 mg L⁻¹), visto que em experimentos realizados anteriormente (ver Capítulo 1) não ocorreu calejamento dos explantes na ausência de reguladores de crescimento no meio de indução.

O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ e o meio autoclavado por 15 minutos. As placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas no escuro, em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, por um período de 30 dias, quando se avaliaram: o número de explantes calejados; a intensidade de calejamento; a oxidação; a rizogênese; o aspecto dos calos relacionados à textura e coloração; e a presença de estruturas embriogênicas.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (quatro concentrações de regulador de crescimento e três tipos de explante), com cinco repetições, sendo cada repetição composta por 15 explantes.

Após a avaliação aos 30 dias, os calos originados em cotilédones e hipocótilos foram divididos em dois lotes, sendo um deles mantido no mesmo meio de indução e o outro transferido para meio MS destituído de regulador de crescimento (MS0), o qual permaneceu no escuro por mais uma semana. Os dois lotes de calos foram então deixados em fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para efeito de avaliação posterior, alguns calos foram também mantidos no escuro no mesmo meio de indução e em MS0. Tanto os calos que foram mantidos no claro como no escuro foram subcultivados novamente aos 30 dias para meio MS0 e mantidos nas mesmas condições de fotoperíodo ou escuro por mais 30 dias, quando foram realizadas novas observações.

2.4. Subcultivo dos calos

Calos induzidos em 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de dicamba em cotilédones e hipocótilos, após 30 dias, foram transferidos para meio contendo sais e vitaminas de MS, mio-inositol (100 mg L⁻¹) e Phytigel[®] (2,8 g L⁻¹), com os seguintes tratamentos: D1 = manutenção no mesmo meio de indução (dicamba - 0,5 e 1,0 mg L⁻¹); D2 = MS0 + 3% sacarose; D3 = ½ MS + 6% sacarose + 400 mg L⁻¹ L-Glutamina; D4 = ½ MS + 6% sacarose + 0,1 mg L⁻¹ dicamba; D5 = ½ MS + 6% sacarose + 0,1 mg L⁻¹ ABA; e D6 = ½ MS + 6% sacarose + 0,1 mg L⁻¹ dicamba + 0,1 mg L⁻¹ ABA.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (dois tratamentos de indução, seis tratamentos de subcultivo e dois tipos de explante), com três repetições e cinco explantes por repetição.

As culturas foram mantidas no escuro, em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C; aos 60 dias foram avaliadas a coloração e a textura dos calos, a rizogênese e a presença de estruturas embriogênicas.

2.5. Análise histológica

Estruturas semelhantes a embriões somáticos, obtidas no tratamento com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de dicamba, foram isoladas e fixadas em FAA₅₀, durante 24 horas no dessecador, sob vácuo e estocadas em etanol 70%. As amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica), preparado conforme instrução do fabricante. Os blocos foram cortados longitudinalmente (5 µm de espessura) em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 – Leica), com a utilização de navalhas de aço descartáveis.

Os cortes das amostras incluídas em metacrilato foram corados com Azul de Toluidina em pH ácido, para detectar radicais aniônicos e metacromasia (O' Brien e McCully, 1981), e as lâminas montadas em resina sintética (Permount[®]).

As observações e a documentação fotográfica foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV, utilizando um fotomicroscópio de luz Olympus (AX70), equipado com um sistema U-Photo (Image Proplus).

3. RESULTADOS

3.1. Indução de calos

Explantes originados de embriões zigóticos maduros iniciaram o processo de germinação em um período de três a cinco dias após a inoculação, em meio com regulador de crescimento. Em todas as concentrações de dicamba houve intensa

proliferação de gemas apicais e rizogênese. Os calos formados foram de coloração amarelo-clara a branca e de textura semifriável; apesar do bom aspecto, o calejamento foi muito baixo e sua observação foi dificultada pela presença de gemas e raízes. Já os calos formados em meio com picloram foram de coloração amarelo-escura, de textura semifriável a semicompacta nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ e mucilaginosos nas concentrações de 5,0 e 10,0 mg L⁻¹. A rizogênese foi menos intensa em comparação aos tratamentos com dicamba. Para os dois reguladores de crescimento não foram observadas estruturas embriogênicas.

Em cotilédones e hipocótilos a formação de calos iniciou a partir de uma semana após a inoculação. O calejamento total em dicamba aos 30 dias foi próximo a 100%, em todos os tratamentos e nos dois tipos de explantes (Figura 1).

Em cotilédones, a intensidade de calejamento aumentou progressivamente com o aumento da concentração de dicamba. À exceção da concentração de 0,25 mg L⁻¹, em todos os tratamentos os maiores percentuais de calejamento (acima de 50%) foram observados na classe de intensidade média. Já em hipocótilos, em todas as concentrações, acima de 80% dos explantes apresentaram intensidade baixa de calejamento.

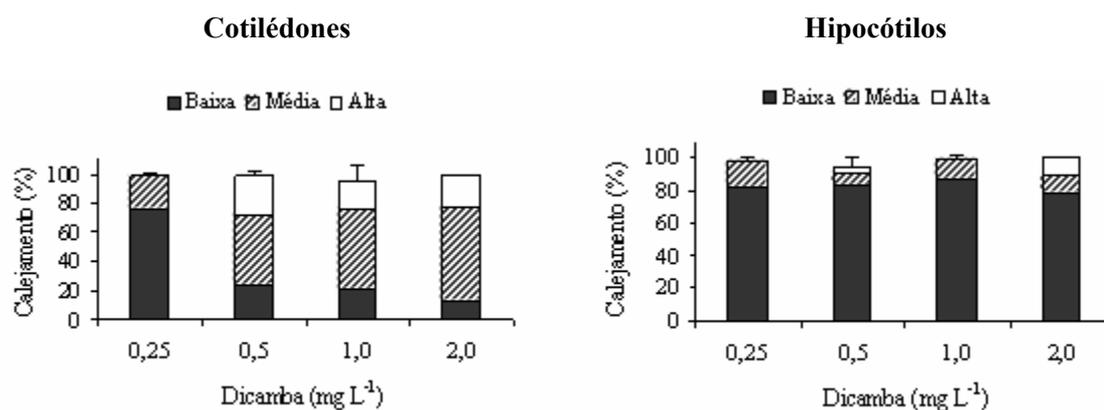


Figura 1 – Percentual e intensidade de calejamento em função das concentrações de dicamba em cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis*, aos 30 dias de permanência no escuro. As barras indicam o desvio-padrão em relação ao calejamento total de cada concentração de dicamba.

O calejamento ocorreu na região abaxial de cotilédones e nas extremidades e superfície dos hipocótilos. Nos dois tipos de explante, os calos formados apresentaram bom aspecto, sendo de coloração amarelo-clara ou branca e de textura semicompacta, tendendo à friabilização. Na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de dicamba observou-se a formação de calo com regiões contendo agrupamentos celulares, assemelhando-se a embriões em estágio globular a cordiforme (Figura 3A). Nos tratamentos de $1,0$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, em hipocótilos, foram observados calos mucilaginosos, sem organização e com algumas regiões escurecidas, de coloração cinza-escuro. Esse escurecimento também ocorreu em cotilédones no tratamento de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$. Rizogênese de intensidade baixa a média foi observada em todos os tratamentos, sendo reduzida com o aumento da concentração de dicamba. A oxidação fenólica foi praticamente nula.

Aos 30 dias em meio de indução, em um explante no tratamento com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de dicamba foram observadas estruturas que se destacavam por apresentarem formato semelhante a embriões em estágio cordiforme a torpedo, de coloração amarelo-clara a creme (Figura 3B e C), diferenciando-se das demais regiões do calo. O calo que apresentou tais estruturas foi transferido para meio MS0 e permaneceu neste meio e no escuro por mais 30 dias. Posteriormente, cinco estruturas foram facilmente isoladas para estudo anatômico.

Nos tratamentos com picloram aos 30 dias, o calejamento total em cotilédones foi próximo a 100% em todos os tratamentos, com exceção do tratamento de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 2). Em todas as concentrações o calejamento foi de intensidade baixa e média. No início do calejamento os calos apresentaram-se de coloração amarelo-escuro e textura semifriável, no entanto, posteriormente, foram se tornando acinzentados. Sobre as regiões acinzentadas dos calos formados em cotilédones nas concentrações de $5,0$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ foram observadas regiões de calos de coloração cinza-clara ou branco-leitosa, com aspecto semelhante a embriões somáticos em estágio globular (Figura 3D).

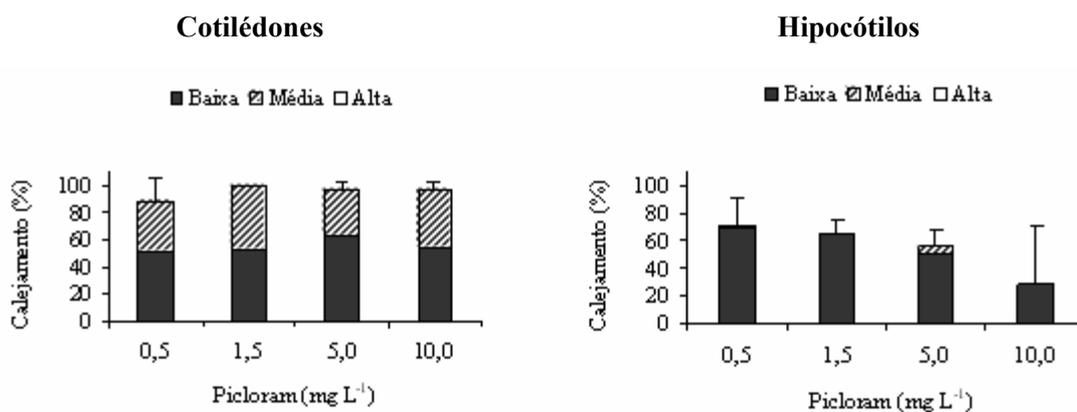


Figura 2 – Percentual e intensidade de calejamento em função das concentrações de picloram em cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis*, aos 30 dias de permanência no escuro. As barras indicam o desvio-padrão em relação ao calejamento total de cada concentração de picloram.

Em hipocótilos, o percentual de calejamento foi reduzindo com o aumento das concentrações de picloram, e a intensidade de calejamento foi baixa em todos os tratamentos. Em todas as concentrações foram observados calos sem consistência, de textura mucilaginosa e coloração cinza-escura.

Calos formados em cotilédones nas concentrações de 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ de picloram, quando subcultivados em meio MS0 e mantidos no claro, apresentaram estruturas semelhantes a embriões somáticos em estágio de torpedo e cotiledonar (Figura 3E e F). Essas estruturas foram formadas sobre regiões escurecidas de dois calos (sendo um em cada tratamento) e isoladas facilmente quando manipuladas com o auxílio de uma pinça. No entanto, estas estruturas não se desenvolveram após serem isoladas. Também pelo fato de serem em número reduzido, não foi possível a realização de análise histológica para confirmação dos padrões celulares obtidos.

Com exceção das estruturas semelhantes a embriões que foram isoladas, os calos obtidos nos tratamentos com dicamba e picloram que foram mantidos por mais de 30 dias em meio com regulador de crescimento ou em MS0, tanto em condições de escuro como em fotoperíodo, tornaram-se mais compactos e oxidados com o passar dos dias. Nenhuma estrutura embriogênica foi observada posteriormente.

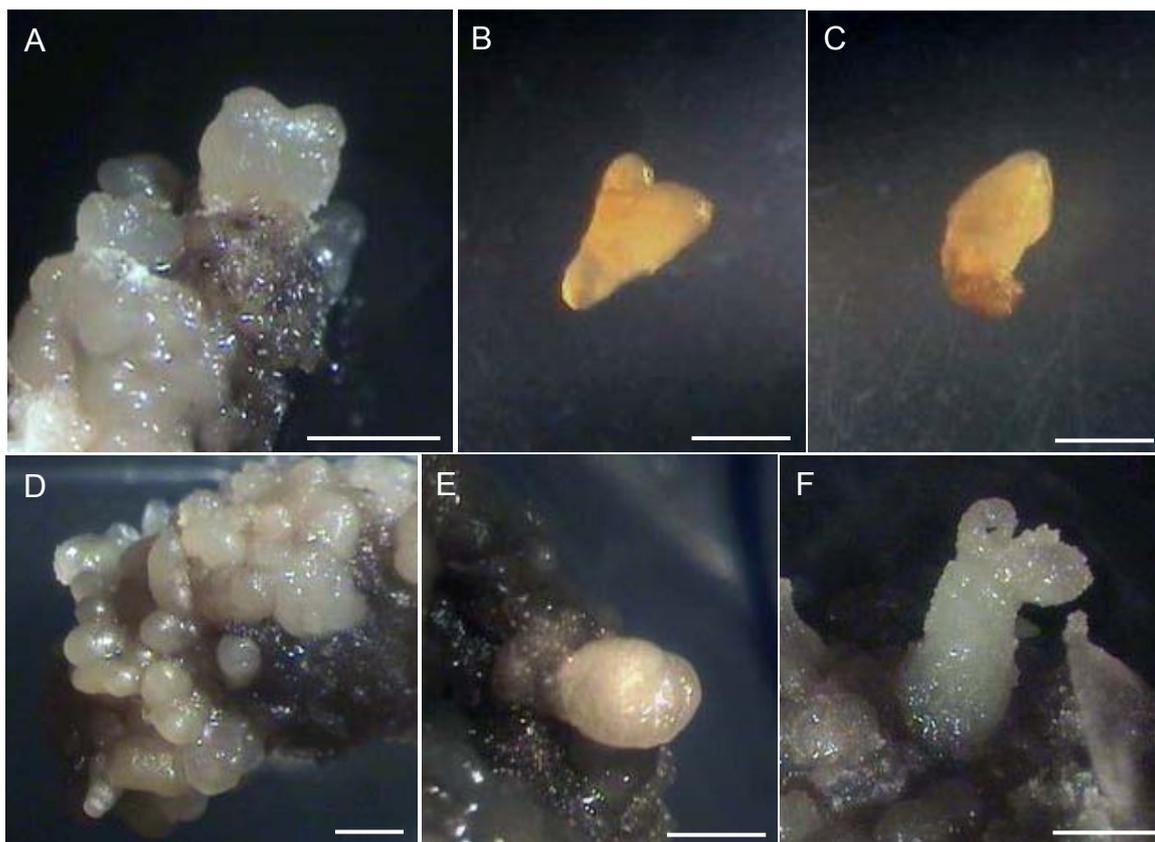


Figura 3 – Formação de estruturas semelhantes a embriões somáticos em *Eucalyptus grandis*. Estruturas formadas em 0,5 mg L⁻¹ de dicamba (A-C) e em 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ de picloram (D-F). Barras = 1 mm.

3.2. Subcultivo dos calos

Os calos induzidos em 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de dicamba que foram transferidos para os tratamentos de subcultivo, após 60 dias, apresentaram-se bastante compactos e escurecidos e com intensa formação de raízes. Em geral, os calos formados em cotilédones mostraram-se mais compactos e oxidados do que em hipocótilos. Não foi constatada variação de resposta em relação aos tratamentos utilizados. Também não foram observadas estruturas embriogênicas.

3.3. Análise histológica

O estudo anatômico realizado com as estruturas observadas nos tratamentos com dicamba mostrou tratar-se de estruturas independentes, sugerindo a presença de um sistema vascular fechado (Figura 4A e B). Foram observadas três regiões

distintas, sendo a mais externa semelhante a uma protoderme, formada por células achatadas (Pd), uma região central com células alongadas semelhantes às de procâmbio (Pc) e uma região intermediária formada por células parenquimáticas (Par). No entanto, nessas estruturas não foi visualizada claramente a presença dos meristemas apicais. Em algumas regiões, verificou-se a ocorrência de degeneração celular, sendo observado descolamento das células parenquimáticas e destacamento da protoderme, o que pode ser devido principalmente à inadequação do meio de cultura, principalmente em relação aos reguladores de crescimento. Nessa região em degeneração, através da reação metacromática do Azul de Toluidina, notou-se a presença de compostos fenólicos (Fe), os quais adquirem coloração verde-azulada.

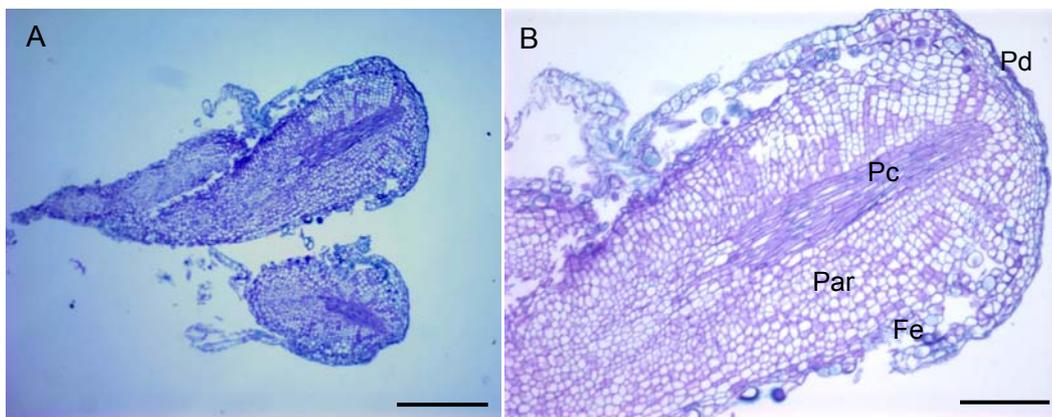


Figura 4 – Secção longitudinal de estruturas semelhantes a embriões somáticos de *Eucalyptus grandis* corados com Azul de Toluidina. A) estruturas independentes com sistema vascular fechado. Barra= 450 μ m. B) detalhe do embrião sugerindo a presença de protoderme (Pd), procâmbio (Pc), células parenquimáticas (Par) e de uma região em degeneração com a presença de compostos fenólicos (Fe). Barra = 150 μ m.

4. DISCUSSÃO

Em *Eucalyptus*, assim como na maioria das espécies florestais, observa-se certa dificuldade na obtenção de protocolos efetivos de embriogênese somática a partir de material adulto, utilizando-se explantes oriundos de árvores selecionadas. Em razão disso, na maioria dos trabalhos em que a embriogênese somática foi

alcançada, utilizou-se material juvenil, de origem seminal ou tecidos embriogênicos (Tibok et al., 1995; Major et al., 1997; Ruaud et al., 1997; Bandyopadhyay et al., 1999; Arruda et al., 2000; Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002).

A embriogênese somática a partir de embriões zigóticos maduros de *E. citriodora* foi obtida após a remoção dos tegumentos e utilizando 3–5 mg L⁻¹ de ANA (Muralidharan e Mascarenhas, 1987; 1995). Em *E. dunnii*, Termignoni et al. (1996) constataram formação de setores embriogênicos em plântulas com três dias de germinação em meio contendo ANA ou ANA/2,4-D nas proporções de 1:1 e 3:1. Pinto et al. (2002) observaram embriogênese somática em *E. globulus* em calos derivados de embriões zigóticos maduros inteiros na presença de 3-15 mg L⁻¹ de ANA isoladamente ou na combinação de 1 mg L⁻¹ de ANA com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D.

No presente trabalho, embriogênese somática ou calos embriogênicos não foram alcançados utilizando-se embriões zigóticos maduros como fonte de explantes e na presença de dicamba ou picloram no meio de indução. No entanto, quando cotilédones obtidos de plântulas com 10 dias de germinação foram utilizados, estruturas semelhantes a embriões somáticos foram obtidas em meio de indução contendo 0,5 mg L⁻¹ de dicamba ou 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ de picloram. Em segmentos de hipocótilos, dicamba e picloram induziram somente a formação de calos.

Embriogênese somática em *Eucalyptus* tem sido alcançada, geralmente, com a utilização de tratamentos com ANA e 2,4-D, isoladamente ou em combinação (Muralidharan e Mascarenhas, 1995; Termignoni et al., 1996; Pinto et al., 2002). Particularmente para *E. grandis*, embriões somáticos foram obtidos somente na presença de 2,4-D (Watt et al., 1991, 1999).

As auxinas dicamba e picloram, como indutoras de embriogênese somática, têm sido investigadas com frequência em espécies agrônômicas (George, 1993; Dineshkumar et al., 1995; Lee et al., 1997; Charrière e Hahne, 1998; Castillo et al., 2000; Little, 2000; Suzuki et al., 2002; Akutsu e Sato, 2002; Kaur e Kothari, 2004).

O picloram é, algumas vezes, usado para induzir e/ou manter calos ou cultura de suspensão em plantas de folhas largas, ou para induzir a formação de calos embriogênicos, onde pode ser mais efetivo que 2,4-D. A concentração requerida

(em torno de 0,01–1,0 mg L⁻¹) é, geralmente, menor que a necessária para outras auxinas (George, 1993). Calos embriogênicos foram induzidos em lírio (*Agapanthus praecox*) e mantidos, através de subcultivos mensais, em meio MS contendo 1,0 mg L⁻¹ de picloram. Numerosos embriões somáticos foram produzidos, os quais originaram plantas após a transferência para meio livre de regulador de crescimento (Suzuki et al., 2002). O dicamba é freqüentemente efetivo na indução e formação de calos embriogênicos em monocotiledôneas. O uso de 2 mg L⁻¹ permitiu a formação de calos em trigo, os quais, posteriormente, produziram maior quantidade de embriões em conjunto com 0,5–1,0 mg L⁻¹ de cinetina (6-furfurilaminopurina) do que aqueles induzidos a uma concentração ótima de 0,8 mg L⁻¹ de 2,4-D (Carman et al., 1988, citados por George, 1993). Provavelmente isso ocorreu porque o dicamba é metabolizado rapidamente em trigo, possivelmente mais rápido que o 2,4-D (George, 1993).

Referindo-se às espécies florestais, trabalhos que abordam a utilização dessas auxinas são escassos; contudo, tratando-se de *Eucalyptus*, sua utilização tem sido relatada. Nugent et al. (2001) obtiveram embriões somáticos em estágio cotiledonar a partir de calos embriogênicos formados em fragmentos de cotilédones e hipocótilos de embriões zigóticos maduros de *E. globulus* em tratamentos com 12,0 mg L⁻¹ de picloram. Arruda et al. (2000) relataram a formação de embriões somáticos em estágio globular em meio de indução de calos contendo 5,0 mg L⁻¹ de picloram. Pinto et al. (2002) utilizaram 0,5 mg L⁻¹ de dicamba sozinho ou associado com 1,0 mg L⁻¹ de zeatina [N-(4-hidroxi-3metilbut-2-enil) aminopurina] na indução de calos em *E. globulus*, porém não obtiveram sucesso na formação de embriões somáticos com estes tratamentos.

As estruturas semelhantes a embriões somáticos obtidas neste trabalho não mostraram claramente o desenvolvimento de meristemas apicais, assim como também esses resultados não foram reproduzíveis com freqüência definida. Segundo Nugent et al. (2001), embriões somáticos de *E. globulus* induzidos em picloram e AIB (ácido indolbutírico) mostraram polaridade; todavia, os cotilédones e os ápices caulinar e radicular foram pouco desenvolvidos, e os resultados obtidos

não apresentaram repetibilidade, fato comumente relatado para o gênero *Eucalyptus*.

Formação de embriões somáticos anormais, baixa frequência de regeneração, falta de sincronização no desenvolvimento, não-conversão desses embriões em plantas e não-repetibilidade dos resultados são grandes entraves que têm limitado a obtenção de um protocolo eficiente de embriogênese somática para *Eucalyptus grandis* e outras espécies do gênero. Estratégias de pesquisa têm sido desenvolvidas para a superação desses obstáculos, assim como para a produção de culturas embriogênicas de árvores adultas, em adição àquelas desenvolvidas para materiais juvenis.

Com a otimização dos protocolos e a confirmação da uniformidade genética, esta técnica terá grande impacto em programas de melhoramento e clonagem, uma vez que apresenta potencial tanto para preservação de genótipos-elite quanto para rejuvenescimento de material selecionado de difícil enraizamento, assim como na regeneração de plantas transformadas geneticamente.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que as auxinas dicamba e picloram são promissoras no desenvolvimento de um protocolo de embriogênese somática para *Eucalyptus grandis*.

Os melhores resultados foram obtidos com a utilização de 0,5 mg L⁻¹ de dicamba ou 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ de picloram, utilizando-se explantes cotiledonares de plântulas germinadas *in vitro* com 10 dias de idade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKUTSU, M., SATO, H. Induction of proembryos in liquid culture increases the efficiency of plant regeneration from *Alstroemeria* calli. **Plant Science**, v.163, p.475-479, 2002.

- ARRUDA, S.C.C., SOUZA, G.M., ALMEIDA, M., GONÇALVES, A.N. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.63, p.143-154, 2000.
- BAJAJ, Y.P.S. (Ed.). **Somatic embryogenesis and synthetic seed I**. Biotechnology in agriculture and forestry. New York, Springer-Verlag, 1995. 472p. (v.30)
- BANDYOPADHYAY, S., CANE, K., RASMUSSEN, G., HAMILL, J.D. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species – *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Plant Science**, v.140, p.189-198, 1999.
- BANDYOPADHYAY, S., HAMILL, J.D. Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. **Annals of Botany**, v.86, p.237-244, 2000.
- CASTILLO, P., MÁRQUEZ, J., RUBLUO, A., HERNÁNDEZ, G., LARA, M. Plant regeneration from callus and suspension cultures of *Valeriana edulis* ssp. *procera* via simultaneous organogenesis and somatic embryogenesis. **Plant Science**, v.151, p.115-119, 2000.
- CHARRIÈRE, F., HAHNE, G. Induction of embryogenesis versus caulogenesis on *in vitro* cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. **Plant Science**, v.137, p.63-71, 1998.
- DINESHKUMAR, V., KIRTI, P.B., SACHAN, J.K.S., CHOPRA, V.L. Picloram induced somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Science**, v.109, p.207-213, 1995.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture – The technology**. 6 ed. England: Exegetics, 1993. v.1, 575p.
- GUERRA, M.P., TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1999. v.2, p.533-568.
- KAUR, P., KOTHARI, S.L. *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.77, p.73-79, 2004.
- LEE, K.S., ZAPATA-ARIAS, F.J., BRUNNER, H., AFZA, R. Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.51, p.1-8, 1997.
- LITTLE, E.L., MAGBANUA, Z.V., PARROTT, W.A. A protocol for repetitive somatic embryogenesis from mature peanut epicotyls. **Plant Cell Reports**, v.19, p.351-357, 2000.

- MAJOR, G.; KRAUSE, M.; ROSS, S.; SOTELO, M. Preliminary studies on the somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo, PR: EMBRAPA, 1997. v. 1, p.137-142.
- MURALIDHARAN, E.M., MASCARENHAS, A.F. In vitro plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *E. citriodora*. **Plant Cell Reports**, v.6, p.256-259, 1987.
- MURALIDHARAN, E.M., MASCARENHAS, A.F. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus*. In: JAIN, S.M., GUPTA, P.K., NEWTON, R.J. (Eds.). **Somatic embryogenesis in woody plants**, vol.2. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.23-40.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NUGENT, G., CHANDLER, S.F., WHITEMAN, P., STEVENSON, T.W. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.67, p. 85-88, 2001.
- O'BRIEN, T.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne: Temarcarphi Pty Ltda, 1981. 45 p.
- PINTO, G., SANTOS, C., NEVES, L., ARAUJO, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, v.21, n.3, p.208-213, 2002.
- RUAUD, J.N., CHURCHILL, K., PEPPER, S. Somatic embryogenesis initiation in *Eucalyptus nitens*. **Acta Horticulturae**, v.447, p.185-186, 1997.
- SUZUKI, S., OOTA, M., NAKANO, M. Embryogenic callus induction from leaf explants of the Lilliacious ornamental plant, *Agapanthus praecox* ssp. *Orientalis* (Leighton) Leighton. Histological study and response to selective agents. **Scientia Horticulturae**. v.95, p.123-132, 2002.
- TERMIGNONI, R.R., WANG, P., HU, C. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, p.129-132, 1996.
- 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**, v.110, p.139-145, 1995.
- VICIENT, C.M., MARTINEZ, F.X. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, n.10, v.1, p.1-12, 1998.

WATT, M.P., BLAKEWAY, F., CRESSWELL, C.F., HERMAN, B. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, v.157, p.59-65, 1991.

WATT, M.P., BLAKEWAY, R. TERMIGNONI, R. JAIN, S.M. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* e *E. dunnii*. In: JAIN, S.M., GUPTA, P.K., NEWTON, R.J. (Eds.). **Somatic embryogenesis in woody plants**, vol.5. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999. p.63-78.

CAPÍTULO III

Efeito dos meios de cultura MS, WPM e JADS na indução de calos embriogênicos em explantes de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* x *E. grandis*

RESUMO – No presente trabalho investigou-se o efeito dos meios de cultura MS, WPM e JADS na indução de calos embriogênicos em cotilédones de *Eucalyptus grandis* e em folhas e entrenós de um clone híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis*. Calos foram induzidos em meio contendo dicamba (0,5 e 1,0 mg L⁻¹) ou 2,4-D (5 e 10 mg L⁻¹) em combinação com cada um dos meios nutritivos (MS, WPM e JADS). Em cotilédones de *E. grandis* não foram constatadas diferenças expressivas em termos de aspecto dos calos em função dos meios utilizados. No entanto, o meio MS apresentou maior massa fresca de calos e menores índices de oxidação, assim como mostrou menor regeneração de raízes. Diferença marcante foi observada em calos obtidos em folhas do clone híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis*, onde o meio WPM foi mais efetivo na formação de raízes em relação aos meios MS e JADS.

Palavras-chave: Embriogênese somática, cultura de tecidos, propagação clonal, micropropagação.

Effect of MS, WPM and JADS culture media on embryogenic callus induction of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* x *E. grandis* explants

ABSTRACT – The present work investigated the effect of MS, WPM and JADS culture media on embryogenic callus induction of *Eucalyptus grandis* cotyledons and in leaves and stem internodes of a *E. urophylla* x *E. grandis* hybrid clone. Calli were induced in medium supplemented with dicamba (0.5 and 1.0 mg L⁻¹) or 2,4-D (5.0 and 10.0 mg L⁻¹) in combination with each culture medium (MS, WPM and JADS). No significant differences for callus aspect in function of the used media were found for cotyledons of *E. grandis*. However, the MS medium gave larger callus fresh weight and lower oxidation indexes, as well as lower root regeneration. Marked difference was observed in calli obtained from leaves of the *E. urophylla* x *E. grandis* hybrid clone, in which WPM medium was more effective for root formation compared to MS and JADS media.

Key words: Somatic embryogenesis, tissue culture, clonal propagation, micropropagation.

1. INTRODUÇÃO

A embriogênese somática tem sido apontada como tecnologia promissora na área florestal, especialmente na clonagem de *Eucalyptus*, visto que apresenta potencial para ser usada na propagação em massa de genótipos selecionados e como técnica básica para auxiliar programas de transformação genética e hibridação somática. Aliado a isso, mostra-se como alternativa para multiplicação vegetativa de clones que apresentam dificuldades de ser propagados por meio de outras técnicas difundidas nas empresas florestais, como a estaquia, microestaquia e miniestaquia.

Diversos trabalhos de embriogênese somática em *Eucalyptus* são encontrados na literatura. No entanto, percebe-se que ainda existe uma carência de metodologia eficiente e reproduzível, uma vez que na maioria dos casos se relata a baixa taxa de obtenção de embriões normais hábeis a serem convertidos em plantas.

Reguladores de crescimento, principalmente as auxinas, são os aspectos mais investigados na indução de embriogênese somática. Contudo, a composição dos sais do meio também tem mostrado afetar a formação e posterior desenvolvimento de embriões somáticos em espécies lenhosas, como em *Cydonia oblonga* (Fisichella et al., 2000), *Larix leptolepis* (Kim et al., 1999), *Ocotea catharinensis* (Moser et al., 2004) e *Theobroma cacao* (Tan e Furtek, 2003).

Em *Eucalyptus*, a maioria dos trabalhos utiliza o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) como fornecedor de macro e micronutrientes às culturas embriogênicas (Watt et al., 1991; Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002; Tibok et al., 1995; Bandyopadhyay e Hamill, 2000); com menor frequência, os meios B5 (Gamborg et al., 1968), White (White, 1954) e WPM (Lloyd e McCown, 1981) também são citados (Termignoni et al., 1996; Muralidharan e Mascarenhas, 1995).

O meio JADS foi definido por Correia (1995) e tem sido usado comercialmente na micropropagação de gemas axilares de clones de *Eucalyptus* (Xavier e Comério, 1997). Contudo, seu efeito na indução de embriogênese somática ainda é pouco divulgado cientificamente.

No presente trabalho, investigou-se o efeito dos meios de cultura MS, WPM e JADS na indução de calos embriogênicos em cotilédones de *Eucalyptus grandis* e em folhas e entrenós de um clone híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material experimental

Foram utilizadas sementes de *Eucalyptus grandis*, procedentes da Área de Produção de Sementes, localizada na região de Mogi Guaçu – SP, da empresa International Paper do Brasil, e um clone híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* proveniente da empresa V & M Florestal LTDA.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa - UFV, localizada no município de Viçosa, Minas Gerais.

2.2. Obtenção dos explantes

Inicialmente, as sementes foram lavadas seis vezes com água deionizada e, sob condições assépticas, desinfestadas com solução de álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 5% durante 15 minutos, sendo então enxaguadas seis vezes com água deionizada e autoclavada.

Para germinação das sementes foram utilizados os meios MS, WPM e JADS, contendo a metade da concentração dos sais e vitaminas, acrescidos de 50 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1,5% de sacarose e 2,8 g L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma, USA). O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1, sendo os meios autoclavados por 15 minutos.

As sementes desinfestadas foram inoculadas em placas de Petri descartáveis estéreis (60 x 15 mm) contendo 15 ml de meio de cultura para germinação. Foram inoculadas 25 sementes por placa, e estas foram vedadas com filme de PVC (Goodyear, Brasil). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com

temperatura de 27 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e irradiância de $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fornecida por tubos fluorescentes, “Luz do dia”, Osram[®], 20 Watts), por um período de 10 dias, até completarem a germinação. Como fonte de explantes juvenis foram utilizados os cotilédones totalmente expandidos, os quais foram separados, retirando-se o meristema apical.

O clone utilizado encontrava-se estabelecido *in vitro*, em sistema de micropropagação por meio de proliferação de gemas axilares, com aproximadamente 30 subcultivos já realizados. Para multiplicação das gemas, o clone foi então submetido a mais dois subcultivos nos meios MS, WPM e JADS, sendo cada qual constituído por sais minerais e vitaminas na concentração total, 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 800 mg L^{-1} de PVP (polivinilpirrolidona), 30 g L^{-1} de sacarose, 5 g L^{-1} de ágar granulado Merck[®], $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP (6-benzilaminopurina) e $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA (ácido naftalenoacético), com o pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$.

No alongamento das gemas utilizou-se a mesma composição dos meios anteriormente descritos, sendo a modificação feita apenas com relação a concentração dos reguladores de crescimento para $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA. As condições de temperatura e fotoperíodo dentro da sala de crescimento para a multiplicação e o alongamento de gemas foram as mesmas descritas para germinação das sementes.

Das gemas alongadas *in vitro*, com aproximadamente 30 dias de cultivo, foram retirados segmentos internodais, medindo aproximadamente 0,5 cm, e folhas sem o pecíolo, os quais constituíram as fontes de explantes de material adulto.

2.3. Indução de calos

2.3.1. Explante juvenil

Para indução de calos em cotilédones foram utilizados os meios MS, WPM e JADS, sendo os sais e as vitaminas de cada um deles utilizados na concentração total, acrescidos de mio-inositol (100 mg L^{-1}), sacarose (3%) e Phytigel[®] ($2,8 \text{ g L}^{-1}$). Cada um dos meios foi combinado com os reguladores de crescimento dicamba -

ácido 3,6-dicloroanísico (0,5 e 1,0 mg L⁻¹) e 2,4-D - ácido 2,4-diclorofenoxiacético (5,0 e 10,0 mg L⁻¹). Os cotilédones foram inoculados com a superfície abaxial em contato com o meio, em placas de Petri descartáveis estéreis (60 x 15 mm) contendo 15 ml de meio para indução de calos.

O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, sendo os meios autoclavados durante 15 minutos. As placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas no escuro, em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, por um período de 30 dias, quando se avaliaram: o percentual de explantes calejados; a intensidade de calejamento; a oxidação; a massa fresca de calos; a rizogênese; o aspecto dos calos em relação à coloração e textura; e a presença de estruturas embriogênicas.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (três meios de cultura e quatro concentrações de regulador de crescimento), com 12 repetições, sendo cada repetição (placa de Petri) composta por 10 explantes.

Após a avaliação aos 30 dias, os calos originados em cotilédones foram transferidos novamente para os três meios de cultura, acrescidos de 0,005 mg L⁻¹ de ANA, 0,05 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de GA₃ (ácido giberélico), e mantidos em condições de fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro por mais 30 dias, quando foram novamente avaliados em relação ao aspecto.

2.3.2. Explante adulto

A metodologia de indução de calos em entrenós e folhas do clone híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* foi semelhante à utilizada em cotilédones; no entanto, somente a concentração de 0,5 mg L⁻¹ de dicamba para os três meios de cultura foi testada.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (três meios de cultura e dois tipos de explantes), com 10 repetições, sendo cada repetição composta por cinco explantes.

Aos 30 dias de permanência no escuro, foram avaliados o percentual de explantes calejados; a intensidade de calejamento; a oxidação; a rizogênese; o aspecto dos calos em relação à coloração e textura; e a presença de estruturas

embriogênicas. A massa fresca de calos foi avaliada aos 60 dias de permanência dos explantes no escuro, quando também foram realizadas novas observações em relação ao aspecto dos calos.

3. RESULTADOS

3.1. Explante juvenil

Com relação ao calejamento total, em todas as combinações dos meios de cultura com reguladores de crescimento verificou-se calejamento superior a 97%, com exceção observada no meio MS, onde o calejamento total foi de 92,5 e 93,3%, respectivamente, para as concentrações de 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ de 2,4-D (Figura 1).

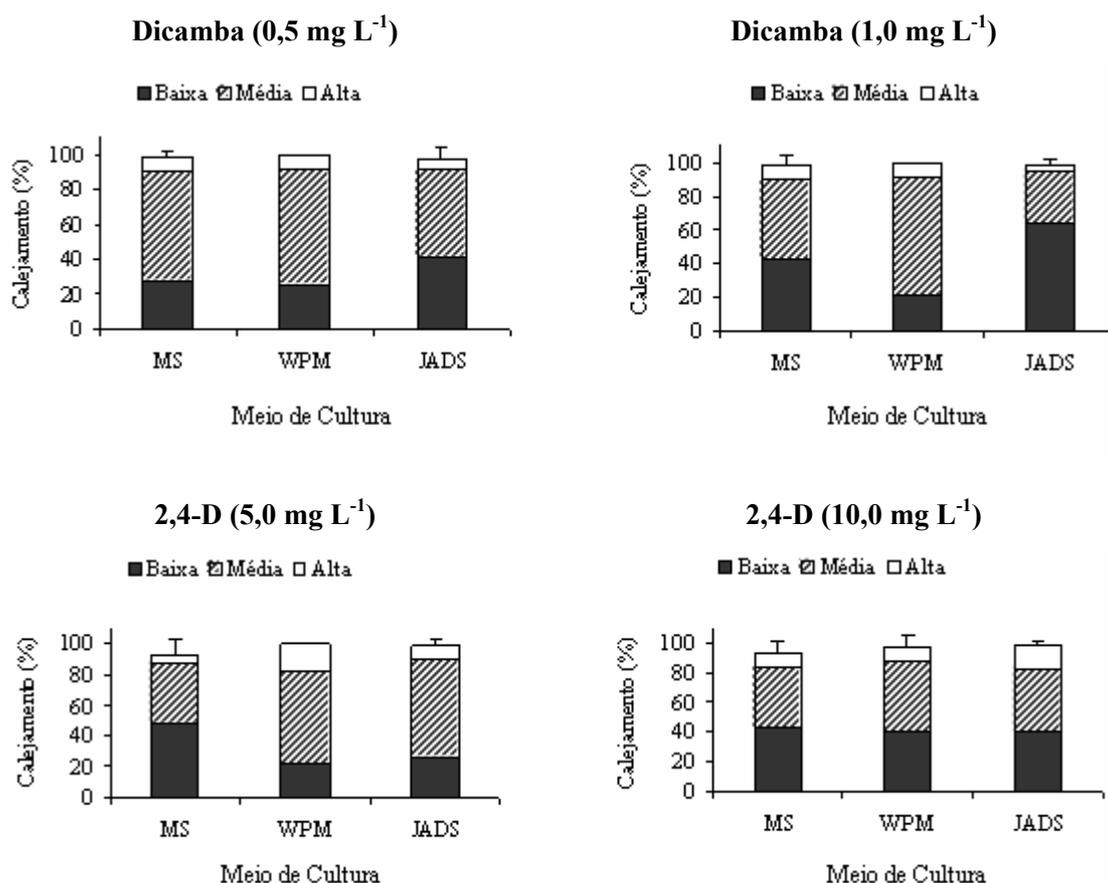


Figura 1 – Percentual e intensidade de calejamento em cotilédones de *E. grandis* nas combinações dos meios MS, WPM e JADS com dicamba e 2,4-D, aos 30 dias de permanência no escuro. As barras indicam o desvio-padrão em relação ao calejamento total.

Em geral, maiores índices de calejamento foram observados na intensidade média, com percentual inferior a 40%, obtido somente para o meio JADS em combinação com 1,0 mg L⁻¹ de dicamba. Para esta combinação, maior percentual de calejamento foi obtido na intensidade baixa (62,7%). Os percentuais para intensidade alta de calejamento foram inferiores a 10%, exceto para WPM associado com 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e JADS no tratamento de 10,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Os maiores percentuais de oxidação foram verificados para o meio JADS, em todas as combinações com reguladores de crescimento, sendo estes superiores nas concentrações maiores de dicamba e 2,4-D (Figura 2). Para os meios MS e WPM também se observou essa tendência de maior percentual de oxidação com o aumento das concentrações de dicamba e 2,4-D, sendo essa diferença gradual no caso de MS e muito expressiva em WPM. Ainda comparando MS com WPM, percebe-se que o primeiro apresentou maiores percentuais de oxidação nas menores concentrações dos reguladores de crescimento, sendo superado por WPM nas maiores concentrações.

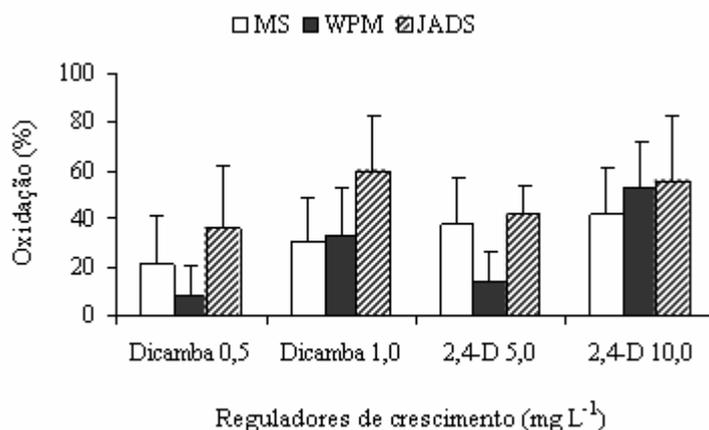


Figura 2 – Percentual de oxidação em cotilédones de *E. grandis* para os meios MS, WPM e JADS associados com dicamba e 2,4-D, aos 30 dias de permanência no escuro. As barras indicam o desvio-padrão.

Quanto à massa fresca de calo por explante (Figura 3), maiores médias foram obtidas quando se utilizou o meio MS, exceto na concentração de 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, onde o meio WPM foi superior. O meio JADS apresentou as menores massas de

calos em todas as concentrações de reguladores de crescimento, sendo essas diferenças mais evidentes nas duas concentrações de dicamba. Percebe-se uma associação negativa entre oxidação e massa fresca de calo, mostrando que os tratamentos que apresentaram as menores massas de calo foram aqueles em que ocorreram os maiores percentuais de oxidação (Figuras 2 e 3).

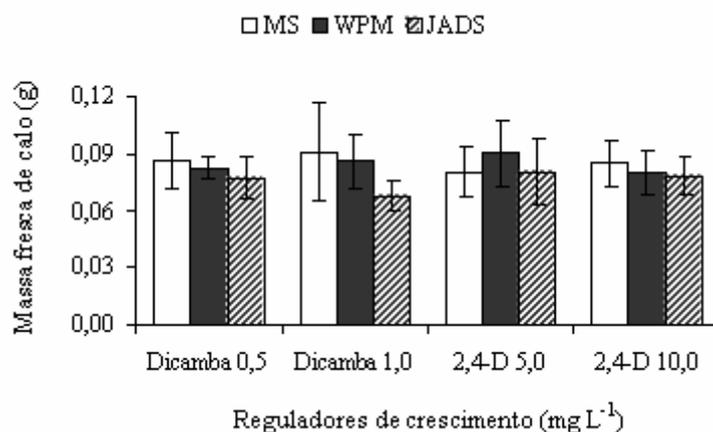


Figura 3 – Massa fresca de calo em cotilédones de *E. grandis* nos meios MS, WPM e JADS combinados com dicamba e 2,4-D, aos 30 dias de permanência no escuro. As barras indicam o desvio-padrão.

De acordo com o Quadro 1, observa-se que, em geral, a rizogênese foi mais intensa nas concentrações menores de dicamba e 2,4-D, sendo reduzida com o aumento da concentração dos reguladores. O meio MS apresentou somente intensidade baixa ou muito baixa de rizogênese, enquanto WPM apresentou intensidade média nos tratamentos com 0,5 mg L⁻¹ de dicamba e 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Intensidade alta só foi observada no meio JADS associado com 0,5 mg L⁻¹ de dicamba, sendo verificada, nos demais tratamentos para este meio, somente intensidade baixa de rizogênese.

O calejamento ocorreu na região abaxial dos cotilédones; quanto ao aspecto, para os três meios em geral, aos 30 dias de permanência no escuro, os calos apresentaram coloração amarela a bege e textura semicompacta tendendo à friabilização, com algumas regiões friáveis observadas nos tratamentos com 2,4-D e

calos mais compactos no tratamento com 1,0 mg L⁻¹ de dicamba. Foram observadas algumas estruturas semelhantes a embriões somáticos em estágio cordiforme e torpedo no meio WPM combinado com 0,5 mg L⁻¹ de dicamba.

Quadro 1 – Rizogênese observada em cotilédones de *E. grandis* nas combinações de meio de cultura (MS, WPM e JADS) e reguladores de crescimento

Regulador	Concentração (mg L ⁻¹)	Intensidade de Rizogênese*		
		MS	WPM	JADS
Dicamba	0,5	++	+++	++++
	1,0	++	++	++
2,4-D	5,0	++	+++	++
	10,0	+	+	++

* Rizogênese muito baixa (+), baixa (++), média (+++) e alta (++++).

Os calos transferidos para os meios acrescidos de 0,005 mg L⁻¹ de ANA, 0,05 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de GA₃ e mantidos em condições de fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, aos 30 dias, apresentaram-se bastante oxidados e compactados em relação às avaliações feitas quando o material permaneceu no escuro. O meio MS combinado com 1,0 mg L⁻¹ de dicamba e 10,0 mg L⁻¹ de 2,4-D apresentou calos menos oxidados de coloração amarela e tendendo a friabilização. Comportamento semelhante foi observado em meio JADS. Em WPM, o escurecimento dos calos e do meio de cultura decorrente da oxidação foi alto, assim como os calos mostraram-se mais compactados em relação a MS e JADS.

As estruturas semelhantes a embriões somáticos em estágio cordiforme e torpedo, observadas aos 30 dias de permanência no escuro, não se desenvolveram posteriormente.

3.2. Explante adulto

No que se refere ao percentual de calejamento em folhas e entrenós do clone híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis*, as respostas foram diferenciadas para os dois tipos de explante em relação aos meios de cultura (Figura 4). Em folhas, maiores

percentuais de calejamento total e de intensidade alta de calejamento foram observados em meio MS, enquanto em entrenós a intensidade alta de calejamento ocorreu somente nos meios WPM e JADS.

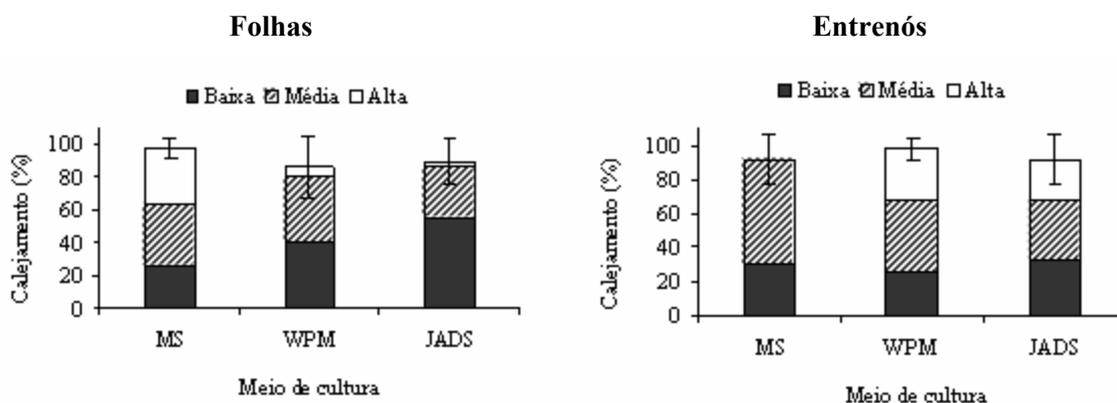


Figura 4 – Percentual e intensidade de calejamento em folhas e entrenós do clone híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* em função dos meios MS, WPM e JADS, aos 30 dias de permanência no escuro. As barras indicam o desvio-padrão em relação ao calejamento total.

Quanto à massa fresca de calos, maiores médias foram constatadas em meio WPM nos explantes foliares e em JADS nos explantes internodais. Em meio MS foram observadas as menores massas de calos, para os dois tipos de explante, assim como foram constatados também os maiores índices de oxidação (Quadro 2).

Quadro 2 – Massa fresca de calo e oxidação em folhas e entrenós do clone híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* em função dos meios MS, WPM e JADS

Meio	Massa fresca de calo (g)		Oxidação (%)	
	Folhas	Entrenós	Folhas	Entrenós
MS	0,12 ± 0,03	0,07 ± 0,01	6,0 ± 9,66	18,0 ± 17,51
WPM	0,20 ± 0,06	0,14 ± 0,04	0,0	0,0
JADS	0,13 ± 0,03	0,21 ± 0,05	0,0	4,0 ± 8,34

Folhas e entrenós apresentaram calos de textura semifriável e coloração amarela, com algumas regiões escurecidas devido à oxidação. O calejamento iniciou-se na base das folhas e extremidades dos entrenós, estendendo-se, posteriormente, por toda a superfície dos explantes. De acordo com a Figura 5, observa-se que, em termos de aspecto dos calos, não ocorreram diferenças marcantes entre os três meios de cultura para explantes internodais (e). Já em folhas (f), ocorreu diferença na intensidade de rizogênese, a qual foi baixa para os meios MS e JADS (A e C) e muito intensa em WPM (B). Calos formados em entrenós, em sua maioria, não formaram raízes. Quanto à presença de estruturas embriogênicas, estas não foram visualizadas nos tratamentos testados neste experimento.

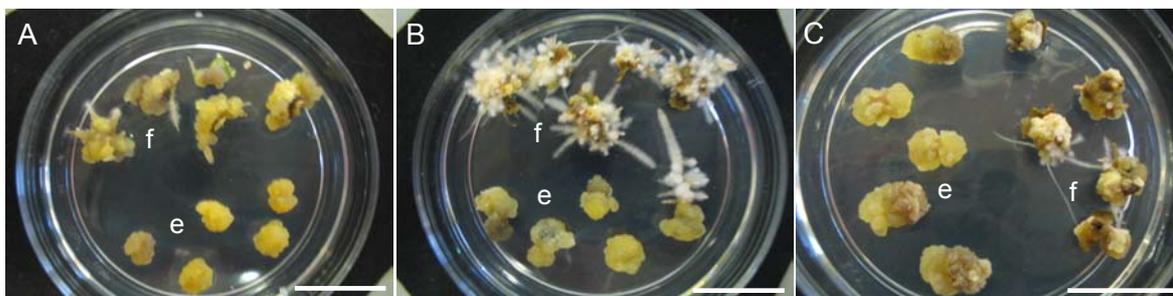


Figura 5 – Aspecto dos calos formados em folhas (f) e entrenós (e) do clone híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* em função dos meios MS (A), WPM (B) e JADS (C), aos 30 dias de permanência no escuro. Barras = 15 mm.

4. DISCUSSÃO

Nos trabalhos de embriogênese somática em *Eucalyptus*, o meio de cultura mais comumente utilizado é a formulação MS, estabelecida por Murashige e Skoog (1962). Sua utilização foi relatada para *E. grandis* (Watt et al., 1991), *E. globulus* (Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002), *E. urophylla* (Tibok et al., 1995) e *E. nitens* (Bandyopadhyay e Hamill, 2000). Termignoni et al. (1996) obtiveram embriões somáticos de *E. dunnii* utilizando os meios B5 (Gamborg et al., 1968) e MS modificado, sendo a concentração dos sais reduzida à metade e a de cálcio, a 1/6.

Muralidharan e Mascarenhas (1995) avaliaram o efeito dos meios de cultura MS, B5, White e WPM na manutenção de culturas embriogênicas de *E. citriodora*. O crescimento da massa embriogênica foi maior em meio MS, enquanto o número total de embriões formados e maduros foi maior em meio B5. O meio de White não apresentou embriogênese repetitiva.

O efeito do meio basal no crescimento e na manutenção de culturas embriogênicas tem sido investigado para diversas espécies lenhosas. Em *Ocotea catharinensis*, Moser et al. (2004) observaram acréscimo significativo na massa fresca das culturas embriogênicas utilizando meia-força dos meios MS e AR (Anderson, 1978), enquanto meia-força de B5 e White reduziu o crescimento. Esses resultados podem ser devido ao fato de os meios MS e AR terem composição mineral e taxas amônio/nitrato maiores que B5 e White.

Fisichella et al. (2000) testaram o efeito de diferentes combinações de macronutrientes na embriogênese somática de clones de marmeleiro (*Cydonia oblonga*). A produção de calos e as propriedades embriogênicas variaram em função dos clones e dos meios utilizados. Em geral, dos oito diferentes meios de cultura utilizados, o MS foi o mais favorável à formação de embriões somáticos, o que novamente pode estar associado ao maior conteúdo de nitrogênio, bem como à proporção balanceada entre nitrato e amônio.

Em *Larix leptolepis*, o meio LP (Quoirin e Lepoivre, 1977) inicialmente foi ligeiramente superior na formação de tecidos embriogênicos em relação aos meios LM (Litvay, 1985) e MS. Contudo, com o tempo, LM tornou-se mais efetivo nesta espécie, pois em LP e MS não houve proliferação dos tecidos embriogênicos (Kim et al., 1999).

No presente trabalho, não ocorreram diferenças marcantes com relação ao aspecto dos calos formados em cotilédones de *E. grandis* em função dos meios utilizados. No entanto, o meio MS apresentou maior massa fresca de calos e menor oxidação fenólica em comparação com WPM e JADS. Já no caso do clone híbrido de *E. urophylla* x *E. grandis* uma situação inversa foi observada: as menores massas de calo e os maiores índices de oxidação foram observados em MS.

Resposta diferenciada para os três meios foi observada em termos de regeneração de raízes em calos. Em cotilédones de *E. grandis*, os meios WPM e JADS apresentaram rizogênese mais intensa em relação ao meio MS. No caso do clone, calos obtidos a partir de folhas, quando o WPM foi utilizado, formaram raízes com intensidade muito superior à dos calos obtidos nos outros meios de cultura. Resposta semelhante foi obtida por Fisichella et al. (2000) em clones de marmeleiro (*Cydonia oblonga*), onde o WPM apresentou maior regeneração de raízes em comparação com os diversos meios de cultura testados, sendo possivelmente, devido ao fato de este meio apresentar níveis mais baixos de nitrogênio em sua composição, favorecendo a regeneração de raízes.

As diferenças de respostas observadas em calos obtidos em explantes adultos em relação aos obtidos em explantes juvenis podem tanto estar associadas a efeitos da idade dos explantes como à especificidade do genótipo, no caso do clone. A influência do genótipo em combinação com diferentes meios de cultura foi constatada por Fisichella et al. (2000), em cujo trabalho a regeneração de embriões somáticos e raízes em *Cydonia oblonga* variou, dependendo da combinação dos clones com os meios utilizados. A interação entre clones e meios basais na formação de embriões somáticos em *Theobroma cacao* também foi observada por Tan e Furtek (2003). Novos estudos devem ser realizados utilizando diferentes clones de *Eucalyptus* em combinação com os meios de cultura, visando à obtenção de resultados mais concisos com relação à interação de genótipos com diferentes concentrações ou combinações de nutrientes.

5. CONCLUSÕES

Em cotilédones de *E. grandis*, o meio de cultura MS apresentou maior massa fresca de calos e menores índices de oxidação e regeneração de raízes em relação aos meios WPM e JADS.

Em folhas de *E. urophylla* x *E. grandis*, o meio WPM foi mais efetivo na formação de raízes do que os meios MS e JADS. Neste caso, observou-se menor massa de calos e maior oxidação com a utilização do meio MS.

Em nenhum dos tratamentos e explantes foram obtidas estruturas embriogênicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, W.C. Tissue culture of Rhododendrons. *In Vitro*, v.14, p.334, 1978.

BANDYOPADHYAY, S., HAMILL, J.D. Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. *Annals of Botany*, v.86, p.237-244, 2000.

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 *E. urophylla* na multiplicação *in vitro*. *IPEF*, v.48/49, p.107-116, 1995.

FISICHELLA, M., SILVI, E., MORINI, S. Regeneration of somatic embryos and roots from quince leaves cultured on media with different macroelement composition. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.63, p.101-107, 2000.

GAMBORG, O.L., MILLER, R.A., OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, v.50, p.151-158, 1968.

KIM, Y.W., YOUN, Y., NOH, E.R., KIM, J.C. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.55, p.95-101, 1999.

LITVAY, J.D., VERMA, D.C., JOHNSON, M.A. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota*). *Plant Cell Reports*, v.4, p.325-328, 1985.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society*, v. 30, p. 421-427, 1981.

MOSER, J.R., GARCIA, M.G., VIANA, A.M. Establishment and growth of embryogenic suspension cultures of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.78, p.37-42, 2004.

- MURALIDHARAN, E.M., MASCARENHAS, A.F. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus*. In: JAIN, S.M., GUPTA, P.K., NEWTON, R.J. (Eds.). **Somatic embryogenesis in woody plants**, vol.2. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.23-40.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NUGENT, G., CHANDLER, S.F., WHITEMAN, P., STEVENSON, T.W. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.67, p. 85-88, 2001.
- PINTO, G., SANTOS, C., NEVES, L., ARAUJO, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, v.21, n.3, p.208-213, 2002.
- QUOIRIN, M., LEPOIVRE, P. Étude de milieux adates aux cultures *in vitro* de *Prunus*. **Acta Horticulturae**, v.78, p.439-442, 1977.
- TAN, C.L., FURTEK, D.B. Development of an *in vitro* regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. **Plant Science**, v.164, p.407-412, 2003.
- TERMIGNONI, R.R., WANG, P., HU, C. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, p.129-132, 1996.
- 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**, v.110, p.139-145, 1995.
- WATT, M.P., BLAKEWAY, F., CRESSWELL, C.F., HERMAN, B. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, v.157, p.59-65, 1991.
- WHITE, P.R. **The cultivation of animal and plant cell**. 2nd ed. New York: Ronald Press, 1954. p.57-63.
- XAVIER, A., COMÉRIO, J. Enraizamento *ex vitro* de gemas de *Eucalyptus* spp. multiplicadas e alongadas *in vitro*. **Scientia Forestalis**, v.51, p.29-36, 1997.

CAPÍTULO IV

Efeito de fontes de carboidratos na indução de calos embriogênicos em cotilédones de *Eucalyptus grandis*

RESUMO – Este trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes fontes de carboidratos na indução de calos embriogênicos em cotilédones de *Eucalyptus grandis*. Os calos foram induzidos em meio de cultura MS contendo 0,5 mg L⁻¹ de dicamba, sendo testadas diferentes concentrações de sacarose (0 a 12%), combinações de glicose e sacarose com maltose ou frutose e diferentes concentrações de glicerol (0 a 6%). As combinações de glicose e sacarose com maltose ou frutose, em algumas situações, apresentaram maiores índices de calejamento e massa fresca de calos em relação às concentrações de sacarose. Calos semifriáveis de coloração amarelo-clara foram observados nas concentrações de 1,5 e 3% de sacarose, enquanto em concentrações mais altas houve tendência de maior compactação e oxidação dos calos obtidos. O glicerol promoveu aumento na massa fresca de calos nas concentrações de 0,5 e 1%, sendo, a partir dessa concentração, observado decréscimo dos valores.

Palavras-chave: Embriogênese somática, cultura de tecidos, propagação clonal, micropropagação.

Effect of carbohydrate sources on embryogenic callus induction from cotyledon explants of *Eucalyptus grandis*

ABSTRACT – The objective of this work was to evaluate the effect of different carbohydrate sources on embryogenic callus induction from cotyledon explants of *Eucalyptus grandis*. Calli were induced in MS culture medium supplemented with dicamba (0.5 mg L⁻¹), with different sucrose concentrations (0 to 12%), combinations of glucose and sucrose with maltose or fructose and different glycerol concentrations (0 to 6%). The combinations of glucose and sucrose with maltose or fructose, in some situations, gave higher callusing indexes and callus fresh weight compared to the sucrose concentrations. Semi-friable, light-yellow calli were observed with sucrose (1.5 and 3%), whereas with higher concentrations there was a tendency for greater compactation and oxidation. Glycerol promoted increase in callus fresh weight at the concentrations of 0.5 and 1%, but higher concentrations lowered these values.

Key words: Somatic embryogenesis, tissue culture, clonal propagation, micropropagation.

1. INTRODUÇÃO

Embriogênese somática tem sido reportada para inúmeras espécies florestais, incluindo algumas do gênero *Eucalyptus*. A técnica apresenta potencial para propagação em massa de genótipos-elite e de regeneração e multiplicação de plantas transgênicas, assim como pode ser utilizada no rejuvenescimento de clones de difícil propagação, restaurando sua competência para o enraizamento.

A indução e a regeneração de embriões somáticos são muito sensíveis às condições de cultura, como a composição do meio, as condições físicas do ambiente, o genótipo e a fonte de explantes, entre outras.

Normalmente, para o cultivo de qualquer célula, tecido ou órgãos, é necessário incorporar uma fonte de carbono ao meio de cultura (George, 1993), e carboidratos específicos podem promover diferentes efeitos na morfogênese *in vitro* (Fuentes et al., 2000).

Diversas fontes de carbono têm sido testadas na formação de embriões somáticos em diferentes espécies, e estudos revelam que, geralmente, a sacarose é a melhor fonte de carbono para embriogênese (George, 1993; Bellettre et al., 1999), embora outros monossacarídeos, como a glicose e a frutose, e dissacarídeos, como a maltose, também possam ser utilizados (Guerra et al., 1999).

A concentração de sacarose influencia os processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos, uma vez que o seu metabolismo em plantas é regulado por um grupo de genes (sacarose sintase e sacarose invertase) cujas respostas são moduladas de acordo com a variação de sua concentração (Guerra et al., 1999).

A utilização do glicerol tem sido bastante restrita em cultura de tecidos, porém, em algumas situações, ele se mostrou apropriado para a formação de embriões somáticos. O glicerol mostrou ser eficiente fonte de carbono na promoção de embriogênese somática em algumas espécies ou variedades do gênero *Citrus* (Ben-Hayyim e Neumann; 1983; Antunes, 1996) e, em combinação com sacarose, reduziu o tempo requerido para a indução de embriões somáticos em *Cichorium* (Bellettre et al., 1999).

Em *Eucalyptus*, a sacarose tem sido o carboidrato mais usado em trabalhos de embriogênese somática, sendo as concentrações de 2% (Tibok et al., 1995; Termignoni et al., 1996) e 3% (Watt et al., 1991; Bandyopadhyay e Hamill, 2000; Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002) as mais utilizadas. No entanto, a literatura é carente de trabalhos que comparam diversas concentrações de sacarose, ou que tratam da utilização de outras fontes de carboidratos influenciando a embriogênese somática em *Eucalyptus*.

Assim, este trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes fontes de carboidratos na indução de calos embriogênicos em cotilédones de *Eucalyptus grandis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa - UFV, localizada no município de Viçosa, Minas Gerais.

Como material genético foram utilizadas sementes de *Eucalyptus grandis* procedentes da Área de Produção de Sementes, localizada no município de Mogi Guaçu, São Paulo, da empresa International Paper do Brasil.

2.2. Obtenção dos explantes

As sementes foram inicialmente lavadas seis vezes com água deionizada e manipuladas em câmara de fluxo laminar, onde foram desinfestadas com solução de álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 5% durante 15 minutos, sendo então enxaguadas seis vezes com água deionizada e autoclavada.

A seguir, as sementes desinfestadas foram inoculadas em placas de Petri descartáveis estéreis (60 x 15 mm) contendo 15 ml de meio de cultura para

germinação. Foi utilizado o meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) contendo a metade da concentração dos sais e vitaminas, 50 mg L⁻¹ de mio-inositol, 1,5% de sacarose, 2,8 g L⁻¹ de Phytigel[®] (Sigma, USA), sendo o pH ajustado para 5,7 ± 0,1 e o meio autoclavado por 15 minutos. As placas foram vedadas com filme de PVC (Goodyear, Brasil) e as culturas mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹ (fornecida por tubos fluorescentes, “Luz do dia”, Osram[®], 20 Watts), por um período de 7 a 10 dias, até completarem a germinação.

Como fonte de explantes foram utilizados os cotilédones totalmente expandidos, obtidos das sementes germinadas *in vitro*, os quais foram separados, retirando-se o meristema apical.

2.3. Indução de calos

O meio de cultura básico utilizado nos experimentos foi composto por sais e vitaminas de MS, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,5 mg L⁻¹ de dicamba (ácido 3,6-dicloroanísico) e 2,8 g L⁻¹ de Phytigel[®]. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1 e os meios autoclavados por 15 minutos. Foram utilizados 15 ml de meio por placa de Petri descartável estéril (60 x 15 mm), e estas foram vedadas com filme de PVC antes de serem incubadas em sala de cultura.

2.3.1. Experimento 1

Neste experimento foram testadas as concentrações de 0; 1,5; 3,0; 6,0; 9,0; e 12% de sacarose e mais dois tratamentos, que consistiram de combinações de fontes de carboidratos, sendo: 1% glicose + 1% maltose + 1% sacarose (GMS) e 1% glicose + 1% frutose + 1% sacarose (GFS). Para todos os tratamentos foram testadas duas orientações dos cotilédones sobre o meio de cultura (superfície abaxial e adaxial) e duas condições de cultura, sendo uma delas a manutenção das culturas em condições de escuro e outra em condições de fotoperíodo de 16 horas de luz (irradiância de 36 μmol m⁻² s⁻¹) e 8 horas de escuro.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial (oito tratamentos relacionados à fonte ou concentração de carboidratos, duas orientações do explante e duas condições de incubação), sendo utilizadas três a cinco repetições para cada tratamento, e a repetição composta por cinco explantes. Em cada placa de Petri foram colocados 10 explantes, sendo cinco para cada orientação do explante. As culturas foram então mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C.

2.3.2. Experimento 2

Foram avaliadas as concentrações de 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; e 6% de glicerol, sendo todos os tratamentos acrescidos ou não de 3% de sacarose. Foram testadas novamente as duas orientações dos cotilédones sobre o meio de cultura (abaxial e adaxial).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (seis concentrações de glicerol, duas concentrações de sacarose e duas orientações do explante), com 10 repetições por tratamento, sendo a repetição constituída por cinco explantes. Em cada placa de Petri foram colocados 10 explantes, sendo cinco para cada orientação do explante. As placas foram mantidas no escuro, em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C.

2.3.3. Avaliações

Para os dois experimentos, aos 30 dias foram avaliados: o percentual de explantes calejados; a intensidade de calejamento; a oxidação; a rizogênese; o aspecto dos calos em relação à coloração e textura; e a presença de estruturas embriogênicas. Aos 60 dias avaliou-se a massa fresca de calos, considerando-se todos os explantes calejados da placa; posteriormente, foi calculado o peso médio de calo por explante. Nesta avaliação a orientação do explante não foi considerada.

3. RESULTADOS

3.1. Experimento 1

As respostas foram variadas em termos de percentuais de calejamento em relação às combinações de tratamentos utilizadas (Figura 1). No entanto, em todas as combinações das condições de incubação com a orientação do explante, quando o meio não continha sacarose (tratamento 0), não ocorreu calejamento.

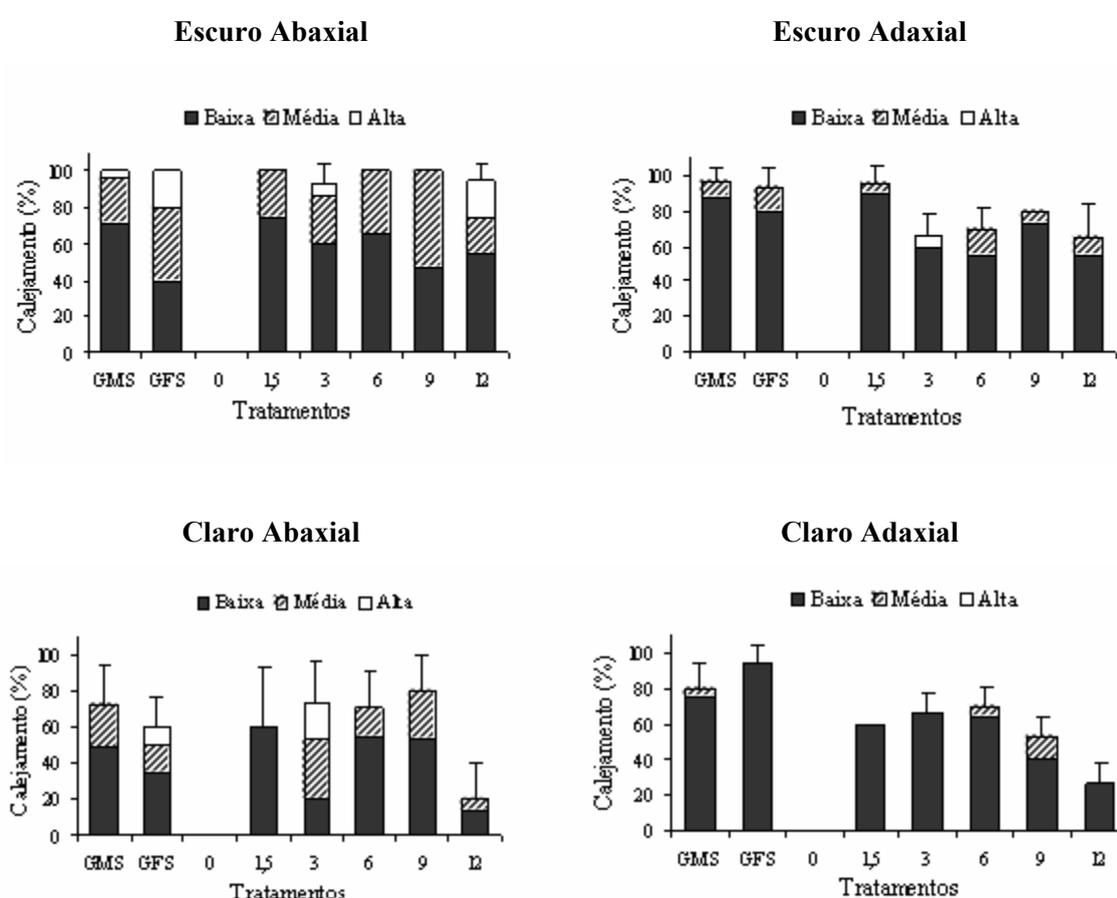


Figura 1 – Percentual e intensidade de calejamento em cotilédones de *E. grandis* em função das concentrações de sacarose (0; 1,5; 3; 6; 9; e 12%) e das combinações de carboidratos (GMS e GFS), considerando-se as duas orientações do explante (abaxial e adaxial) e as duas condições de incubação (escuro e claro). As barras indicam o desvio-padrão em relação ao calejamento total.

Maiores percentuais de calejamento total foram observados quando os calos permaneceram no escuro e com a superfície abaxial em contato com o meio de cultura. Nesta combinação (escuro/abaxial) os percentuais de calejamento total foram superiores a 93,3%, sendo os menores observados nas concentrações de 3 e 12% de sacarose. Considerando a intensidade de calejamento, os maiores índices foram obtidos na intensidade baixa de calejamento, exceto para os tratamentos GFS e 9% de sacarose, em que os maiores percentuais foram obtidos na intensidade média de calejamento. Intensidade alta de calejamento foi observada somente nos tratamentos GMS, GFS, 3 e 12% de sacarose.

Na combinação escuro/adaxial, foram obtidos percentuais de calejamento total acima de 93,3% nos tratamentos GMS e GFS e na concentração de 1,5% de sacarose; a partir dessa concentração de sacarose, os percentuais de calejamento total foram inferiores a 80%. Os percentuais de intensidade média de calejamento foram inferiores a 15%, e intensidade alta foi observada somente no tratamento com 3% de sacarose (6,7%).

Quando os explantes foram mantidos no claro, nas duas orientações dos explantes os percentuais de calejamento total foram inferiores a 80%, com exceção do tratamento GFS na orientação adaxial (95%). Na orientação abaxial, a maioria dos tratamentos apresentou intensidades baixa e média de calejamento, sendo observada intensidade alta somente para os tratamentos GFS e 3% de sacarose. Já na posição adaxial, somente os tratamentos GMS, 6 e 9% de sacarose apresentaram intensidade média de calejamento, sendo estes percentuais inferiores a 13%; para os demais tratamentos, somente intensidade baixa de calejamento foi verificada.

Com relação à oxidação (Figura 2), percebe-se a influência direta da condição de incubação nos percentuais de explantes oxidados. Na condição de escuro, oxidação foi observada somente nos tratamentos GMS e 6, 9 e 12% de sacarose, sendo os percentuais inferiores a 15% em todos os casos. Em contrapartida, quando os explantes permaneceram no claro, em todos os tratamentos ocorreu oxidação, sendo os maiores percentuais encontrados em explantes com a superfície abaxial em contato com o meio e nas concentrações mais altas de sacarose.

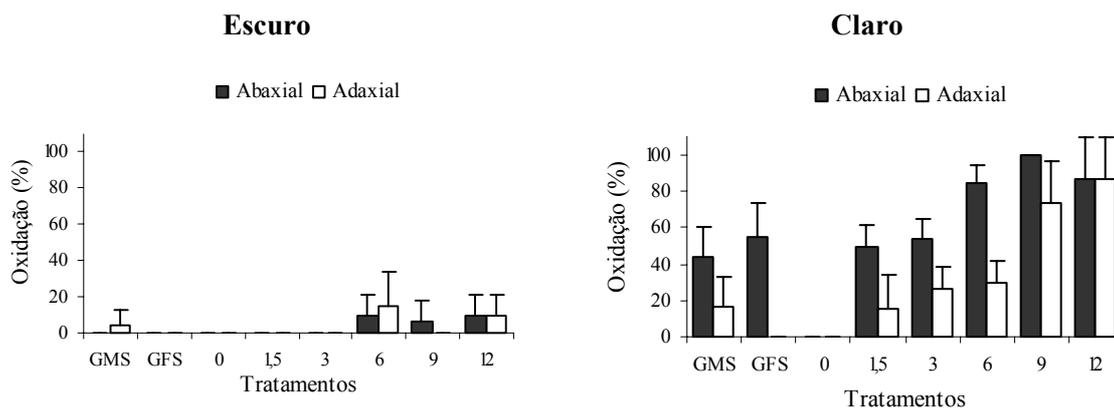


Figura 2 – Percentual de oxidação em cotilédones de *E. grandis* em função das concentrações de sacarose (0; 1,5; 3; 6; 9; e 12%) e das combinações de carboidratos (GMS e GFS), considerando-se as duas orientações do explante (abaxial e adaxial) e as duas condições de incubação (escuro e claro). As barras indicam o desvio-padrão.

Observa-se, conforme a Figura 3, que não houve influência das condições de incubação na massa fresca de calos, sendo os maiores pesos obtidos pelos tratamentos GFS e GMS no escuro, seguidos pelos tratamentos 9 e 12% de sacarose que permaneceram no claro. Observou-se também, para os explantes que permaneceram no escuro, um acréscimo na massa de calos com o aumento da sacarose até 6%, e, a partir dessa concentração, houve decréscimo nos valores deste parâmetro.

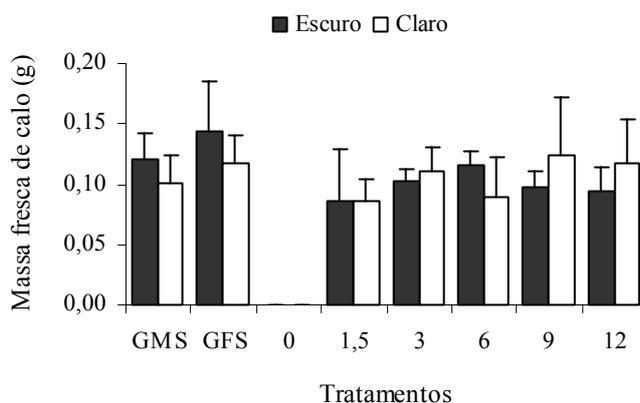


Figura 3 – Massa fresca de calo em cotilédones de *E. grandis* em função das concentrações de sacarose (0, 1,5; 3; 6; 9; e 12%) e das combinações de carboidratos (GMS e GFS), considerando-se as duas condições de incubação (escuro e claro). As barras indicam o desvio-padrão.

Em geral, calos formados em explantes que permaneceram no escuro apresentaram baixa rizogênese e coloração amarela. A textura foi semifriável nas concentrações de 1,5 e 3% de sacarose, tendendo à compactação e ao escurecimento com o aumento da concentração de sacarose. Nos tratamentos GMS e GFS, os calos apresentaram textura semicompacta e coloração amarela tendendo a bege. Os explantes com a superfície adaxial em contato com o meio de cultura tornaram-se mais compactos do que aqueles orientados com a superfície abaxial. Foram observadas estruturas semelhantes a embriões em estádios globulares a cordiformes na concentração de 1,5% de sacarose e nos tratamentos GMS e GFS, porém estas estruturas não se desenvolveram posteriormente.

Os explantes que permaneceram no claro apresentaram calos de textura compacta e coloração variando de branca a amarela, sendo visualizados, também, calos clorofilados e com presença de antocianina. A rizogênese foi baixa ou ausente em todas as combinações e não foram observadas estruturas embriogênicas.

3.2. Experimento 2

Nos tratamentos com glicerol e 3% de sacarose (Figura 4), o calejamento total apresentou tendência de redução dos percentuais nas concentrações de 4 e 6%, sendo esse decréscimo mais expressivo nos explantes com a superfície adaxial em contato com o meio de cultura. Explantes na orientação abaxial apresentaram, em geral, maiores percentuais na intensidade média de calejamento, sendo observada também intensidade baixa e alta em todas as concentrações de glicerol, exceto no tratamento com 6%, o qual apresentou somente calejamento de intensidade baixa e média. Nos explantes dispostos com a superfície adaxial em contato com o meio, os maiores índices foram observados na intensidade baixa de calejamento, sendo estes superiores a 60% em todas as concentrações de glicerol.

Nos tratamentos destituídos de sacarose, não ocorreu calejamento em nenhuma das concentrações de glicerol testadas.

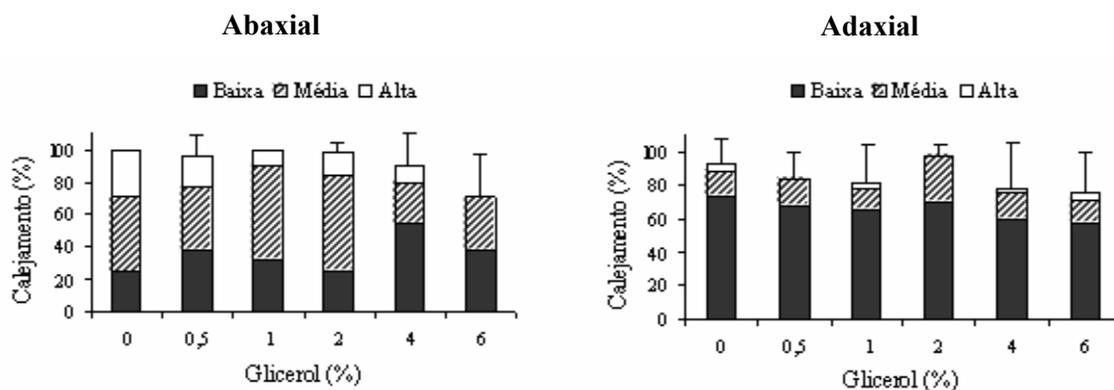


Figura 4 – Percentual e intensidade de calejamento em cotilédones de *E. grandis* em função dos tratamentos com glicerol (0; 0,5; 1; 2; 4; e 6%) acrescidos de 3% de sacarose e das orientações do explante (abaxial e adaxial). As barras indicam o desvio-padrão em relação ao calejamento total.

Não houve tendência definida dos percentuais de oxidação em relação às concentrações de glicerol; no entanto, em relação à orientação do explante no meio de cultura, aqueles com a superfície abaxial em contato com o meio mostraram maiores índices de oxidação do que aqueles com a superfície adaxial (Figura 5).

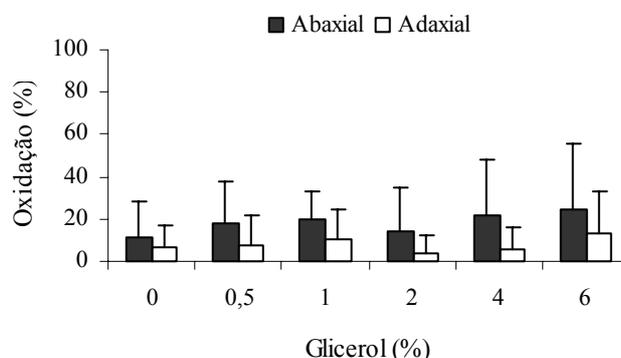


Figura 5 – Percentual de oxidação em cotilédones de *E. grandis* em função dos tratamentos com glicerol (0; 0,5; 1; 2; 4; e 6%) acrescidos de 3% de sacarose e das orientações do explante (abaxial e adaxial). As barras indicam o desvio-padrão.

O glicerol influenciou diretamente a massa fresca de calos, sendo os maiores pesos obtidos nas concentrações de 0,5 e 1%. A partir dessa concentração, entretanto, seu efeito foi negativo, e os pesos obtidos nas concentrações de 2, 4 e

6% foram inferiores ao obtido pelo tratamento no qual não se utilizou glicerol (Figura 6).

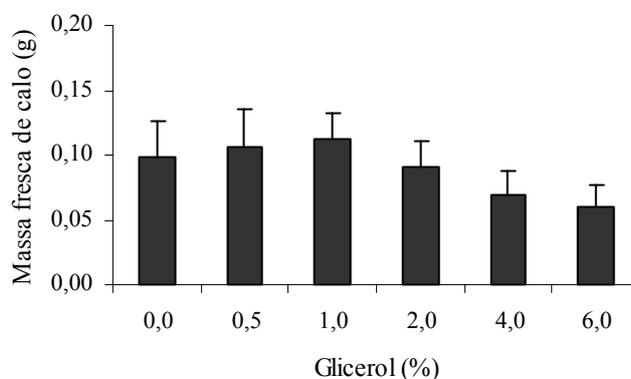


Figura 6 – Massa fresca de calo em cotilédones de *E. grandis* em função dos tratamentos com glicerol (0; 0,5; 1; 2; 4; e 6%) acrescidos de 3% de sacarose. As barras indicam o desvio-padrão.

Quanto ao aspecto, os calos apresentaram textura semifriável a semicompacta e coloração amarela nas concentrações de 0 a 2% de glicerol, ocorrendo escurecimento e tendência de degeneração dos calos nas concentrações mais altas. A rizogênese foi baixa em todos os tratamentos, e em nenhum deles foi observada a formação de embriões somáticos.

4. DISCUSSÃO

O carboidrato mais comumente utilizado em cultura de células e tecidos de plantas é a sacarose, que é também a mais usada em trabalhos de embriogênese somática em *Eucalyptus*. A concentração de 3% de sacarose foi satisfatória para os processos de iniciação e diferenciação de embriões somáticos em *E. grandis* (Watt et al., 1991) *E. nitens* (Bandyopadhyay e Hamill, 2000) e *E. globulus* (Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002). Em *E. dunnii* (Termignoni et al., 1996) e *E. urophylla* (Tibok et al., 1995) utilizaram-se 2% de sacarose, enquanto em *E. citriodora* embriões somáticos foram obtidos tanto em 5% (Muralidharan et al., 1989) como

em 3% (Muralidharan e Mascarenhas, 1995). No entanto, os autores não compararam os resultados obtidos com outras concentrações de sacarose ou outras fontes de carboidratos.

No presente trabalho, as combinações de glicose e sacarose com maltose ou frutose (GMS e GFS), em algumas situações, apresentaram maiores índices de calejamento e massa fresca de calo em relação às concentrações de sacarose. Contudo, melhores resultados em termos de textura e coloração dos calos foram observados nos tratamentos com 1,5 e 3% de sacarose; em concentrações mais altas de sacarose, houve tendência de maior compactação e oxidação dos calos.

Em *Coffea canephora*, a utilização de maltose, glicose, frutose ou sacarose produziu diferentes respostas, dependendo do genótipo. A frutose aumentou significativamente a produção de embriões somáticos em dois genótipos, enquanto a maltose foi altamente efetiva para um terceiro genótipo. Em adição, maior sincronia no desenvolvimento de embriões foi observada quando glicose foi usada em vez de sacarose (Fuentes et al., 2000).

Embriões somáticos ou gemas foram induzidas *in vitro* em embriões zigóticos de *Helianthus annuus*, dependendo da concentração de sacarose no meio de cultura. Em meio contendo 3% de sacarose, somente gemas adventícias foram induzidas, enquanto no meio com 12% de sacarose embriões somáticos foram formados. Apesar de as duas diferentes respostas não terem sido induzidas por mudanças na concentração externa pelo suprimento de reguladores de crescimento, a indução de ambos os eventos morfogênicos foi provavelmente dependente da regulação hormonal interna, em resposta à composição do meio (Charrière e Hahne, 1998). A natureza da resposta morfogênica é influenciada pela concentração de açúcar e, conseqüentemente, pelo potencial osmótico do meio (Jeannin et al., 1995). É possível que a resposta do tecido ao potencial osmótico seja mediada por sinais internos, como os hormônios vegetais, sendo o equilíbrio destes possivelmente o responsável por uma ou outra resposta morfogênica (Charrière e Hahne, 1998).

A adição de componentes ao meio, especialmente macronutrientes e fontes de carbono, representa consideráveis decréscimos no potencial osmótico, influenciando fortemente o crescimento de células, tecidos e órgão e a morfogênese

in vitro (George, 1993). A contribuição osmótica da fonte de carbono tem uma correlação inversa com a concentração dessa fonte de carbono, causando inicialmente um acréscimo, seguido pela redução dos valores do parâmetro avaliado. Essa redução pode ser causada pela excessiva contribuição osmótica ou pela toxicidade do carboidrato (Paiva Neto e Otoni, 2003).

Neste trabalho, o glicerol proporcionou acréscimo na massa fresca de calos nas concentrações de 0,5 e 1%, sendo, a partir dessa concentração, observado decréscimo dos valores. O glicerol foi eficiente em promover a formação de embriões somáticos em calos nucelares de laranjeira ‘Seleta Branca’ (*Citrus sinensis*), sendo a concentração de 4,0% a que proporcionou os melhores resultados, transformando completamente os calos em embriões somáticos (Antunes, 1996). O mecanismo de ação do glicerol na indução de embriogênese somática em citros não é bem conhecido. Sabe-se, entretanto, que condições de cultivo que causam a redução dos níveis endógenos de auxina em calos habituados promovem a embriogênese nesses calos. No entanto, não se pode afirmar a ocorrência de interação do carboidrato com a síntese de auxina (Ben-Hayyim e Neumann, 1983; Antunes, 1996).

O glicerol modificou o metabolismo dos carboidratos e foi transportado nos tecidos, fornecendo carbono e energia para formação de embriões somáticos em folhas de *Chicorium*, reduzindo assim o tempo requerido para iniciação do evento embriogênico (Belletre et al., 1999).

Explantos que permaneceram no escuro formaram calos de coloração mais clara e textura tendendo à friabilização, sendo observada oxidação somente nas concentrações de 6, 9 e 12% de sacarose. Calos originados de explantes mantidos no claro foram mais compactos e com altos percentuais de oxidação, sendo estes aumentados à medida que se aumentou a concentração de sacarose. Segundo Davies (1972), o aumento de sacarose no meio de cultivo leva ao aumento no acúmulo de polifenóis. A oxidação fenólica tem sido reportada como um dos problemas mais sérios para o estabelecimento de culturas organogênicas e embriogênicas em *Eucalyptus* e, provavelmente, a principal causa envolvida na baixa frequência de indução de embriões somáticos (Pinto et al., 2002). Na tentativa de contornar ou

reduzir a acumulação de fenóis, a manutenção das culturas de *Eucalyptus* durante um período no escuro, geralmente na fase de indução, tem sido citada (Watt et al., 1991; Bandyopadhyay et al., 1999). Em contrapartida, a luz demonstrou ser fator decisivo na promoção de resposta embriogênica em *E. dunnii*, com embriões somáticos ocorrendo em irradiâncias variando de 40 a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Termignoni et al., 1996; Nugent et al., 2001).

No que se refere à orientação dos cotilédones sobre o meio de cultura, foram observados maiores percentuais de calejamento e de oxidação na orientação abaxial. Calos orientados com a superfície adaxial em contato com o meio, apesar de apresentarem menores índices de oxidação, tornaram-se mais compactos que os demais. A orientação do explante foi importante na indução de calos em *E. globulus* (Bandyopadhyay et al., 1999). Segundo esses autores, calos abundantes, os quais regeneraram plantas posteriormente, foram observados somente em cotilédones orientados com a superfície adaxial em contato com o meio. Nessa condição, 90% dos explantes formaram calo, enquanto em cotilédones orientados com a superfície abaxial em contato com o meio o calejamento foi muito baixo ou ausente.

5. CONCLUSÕES

A utilização de glicose e sacarose em combinação com maltose ou frutose, em algumas situações, proporcionou maiores índices de calejamento e massa fresca de calo em relação às concentrações de sacarose.

No que diz respeito à textura e coloração dos calos, 1,5 e 3% de sacarose apresentaram calos semifriáveis de coloração amarelo-clara; em concentrações mais altas, houve tendência de maior compactação e oxidação dos calos.

O glicerol promoveu aumento na massa fresca de calos nas concentrações de 0,5 e 1%, sendo, a partir dessa concentração, observado decréscimo dos valores.

Não foram observadas estruturas embriogênicas nos tratamentos testados no presente trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, M.S. **Isolamento de protoplastos de folhas de limoeiro cravo (*Citrus limonia* (L.) Osb.) e embriogênese somática em calos nucleares de laranja seleta branca (*Citrus sinensis* (L.) Osb.)**. Viçosa, MG: UFV, 1996, 43p.
Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.
- BANDYOPADHYAY, S., CANE, K., RASMUSSEN, G., HAMILL, J.D. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species – *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. **Plant Science**, v.140, p.189-198, 1999.
- BANDYOPADHYAY, S., HAMILL, J.D. Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos found in mature seeds. **Annals of Botany**, v.86, p.237-244, 2000.
- BELLETTRE, A., COUILLEROT, J.P., VASSEUR, J. Effects of glycerol on somatic embryogenesis in *Chicorium* leaves. **Plant Cell Reports**, v.19, p.26-31, 1999.
- BEN-HAYYIM, G., NEUMANN, H. Stimulatory effect of glycerol on growth and somatic embryogenesis in *Citrus* callus cultures. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v.110, p.331-337, 1983.
- CHARRIÈRE, F., HAHNE, G. Induction of embryogenesis versus caulogenesis on *in vitro* cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. **Plant Science**, v.137, p.63-71, 1998.
- DAVIES, M.E. Effects of auxin on polyphenol accumulation and the development of phenylalanine ammonia-lyase activity in dark-grown suspension cultures of Paul's Scarlet Rose. **Planta**, v.104, p.66-77, 1972.
- FUENTES, S.R.L., CALHEIROS, M.B.P., MANETTI-FILHO, J., VIEIRA, L.G.E. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.60, p.5-13, 2000.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture – The technology**. 6 ed. England: Exegetics, 1993. v.1, 575p.
- GUERRA, M.P., TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, 1999. v.2, p.533-568.

- JEANNIN, G., BRONNER, R., HAHNE, G. Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated *in vitro*: role of the sugar. **Plant Cell Reports**, v.15, p.200-204, 1995.
- MURALIDHARAN, E.M., GUPTA, P.K., MASCARENHAS, A.F. Plantlet formation through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *E. citriodora*. **Plant Cell Reports**, v.8, p.41-43, 1989.
- MURALIDHARAN, E.M., MASCARENHAS, A.F. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus*. In: JAIN, S.M., GUPTA, P.K., NEWTON, R.J. (Eds.). **Somatic embryogenesis in woody plants**, vol.2. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.23-40.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NUGENT, G., CHANDLER, S.F., WHITEMAN, P., STEVENSON, T.W. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.67, p. 85-88, 2001.
- PAIVA NETO, V.B., OTONI, W.C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? **Scientia Horticulturae**, v.97, p.193-202, 2003.
- PINTO, G., SANTOS, C., NEVES, L., ARAUJO, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, v.21, n.3, p.208-213, 2002.
- TERMIGNONI, R.R., WANG, P., HU, C. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, p.129-132, 1996.
- 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**, v.110, p.139-145, 1995.
- WATT, M.P., BLAKEWAY, F., CRESSWELL, C.F., HERMAN, B. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis*. **South African Forestry Journal**, v.157, p.59-65, 1991.

4. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos e nas condições em que foram realizados os experimentos, conclui-se que:

- Utilizando-se 2,4-D, os melhores resultados de calogênese foram observados em cotilédones, nos tratamentos com 5 e 10 mg L⁻¹, sendo 30 dias no escuro o melhor tempo e condição de indução; no entanto, não foram observadas estruturas embriogênicas.
- As auxinas dicamba e picloram demonstraram-se promissoras no desenvolvimento de um protocolo de embriogênese somática para *Eucalyptus grandis*. Foram observadas estruturas semelhantes a embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento quando se utilizou 0,5 mg L⁻¹ de dicamba ou 5,0 e 10,0 mg L⁻¹ de picloram, utilizando-se explantes cotiledonares.
- Quanto aos meios de cultura, em cotilédones de *E. grandis*, o meio MS apresentou maior massa fresca de calos e menores índices de oxidação e regeneração de raízes em relação aos meios WPM e JADS. Em folhas de *E. urophylla* x *E. grandis*, o meio WPM foi mais efetivo na formação de raízes do que os meios MS e JADS. No entanto, em nenhum dos tratamentos e explantes utilizados foram obtidas estruturas embriogênicas.

- Em relação à fonte de carboidratos, maltose e frutose em combinação com glicose e sacarose, em algumas situações, apresentaram maiores índices de calejamento e massa fresca de calos em relação às concentrações de sacarose utilizadas. No entanto, quanto ao aspecto dos calos, melhores resultados foram obtidos quando se utilizou 1,5 e 3% de sacarose, sendo observados calos de textura semifriável e de coloração amarelo-clara, enquanto em concentrações mais altas de sacarose houve tendência de maior compactação e oxidação. A utilização de glicerol promoveu aumento na massa fresca de calos nas concentrações de 0,5 e 1%, sendo, a partir dessa concentração, observado decréscimo dos valores desse parâmetro. Também nesses experimentos não foram obtidos embriões somáticos.

- Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, e em conformidade com a literatura existente sobre o tema, percebe-se que as espécies de *Eucalyptus* apresentam dificuldades de propagação vegetativa por embriogênese somática. Entretanto, considerando a importância da técnica e o potencial de aplicação desta na silvicultura clonal, novos estudos são necessários, visando à obtenção de um protocolo eficiente e reproduzível de embriogênese somática em *E. grandis*.