

ELISA CRISTINA SOARES DE CARVALHO

ANTIOXIDANTES, REGULADORES DE CRESCIMENTO E ESTRESSE  
TÉRMICO NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Eucalyptus* spp.

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  
2007

ELISA CRISTINA SOARES DE CARVALHO

ANTIOXIDANTES, REGULADORES DE CRESCIMENTO E ESTRESSE  
TÉRMICO NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE *Eucalyptus* spp.

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: 17 de julho de 2007.

---

Prof. Wagner Campos Otoni  
(Co-orientador)

---

Prof. Sérgio Yoshimitsu Motoike  
(Co-orientador)

---

Prof. José Maria Moreira Dias

---

Pesq. Ivar Wendling

---

Prof. Aloísio Xavier  
(Orientador)

À minha família, especialmente aos meus pais Laércio e Coralice.

Ao meu filho Guilherme.

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, pela salvação.

Ao meu amado filho Guilherme, por suportar com paciência meus momentos de maior estresse.

Aos meus pais, meus irmãos Elissa e Alexandre e meus queridos cunhados Alex e Cristina, pela união, companheirismo e pelo incentivo.

À minha avó Eliza (*in memoriam*) pelas maravilhosas lembranças.

À Universidade Federal de Viçosa-UFV e ao programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, pela oportunidade de realização deste treinamento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo.

Ao professor Aloisio Xavier, pela orientação, amizade e confiança.

Aos membros da banca examinadora, pelas críticas e sugestões.

Aos amigos Rita e Wilson, meu agradecimento “ESPECIAL”, pelas portas sempre abertas e pelo amparo nos momentos mais difíceis.

À minha querida vizinha e amiga Maria Helena, pelas boas conversas, CDs e DVDs compartilhados.

À Eliana e Antônio, pela excelente companhia, “adoção” e por me proporcionarem domingos e feriados com cara de família.

Aos irmãos da Igreja Cristã Maranata do Vale do Sol, pelas orações, pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Às minhas amigas do Laboratório de Cultura de Tecidos, Fabiana, Miranda, Jaqueline, Maurecilne e Lili, por toda ajuda e amizade.

Aos meus estagiários, Silvano, Leandro e Livia, pelo companheirismo e ajuda na realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos (LCTII), especialmente ao Prof. Wagner Campos Otoni, pela agradável convivência e pelos ensinamentos

Aos meus colegas Lourdes e Ana Cláudia, pelo auxílio na anatomia, e a Roni, pelas dicas em estatística.

Aos meus dentistas Belizane e Marden, pela amizade, profissionalismo e pelo cuidado especial dispensado ao meu caso.

A todos que me ajudaram a cuidar do Guilherme, em especial, minha auxiliar Ana, à Valéria pela disposição em levá-lo à escola e buscá-lo, e à Dona Judite, por ser uma avó amorosa e presente.

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

## BIOGRAFIA

Elisa Cristina Soares de Carvalho, filha de Laércio Francisco de Carvalho e Coralice Soares de Carvalho, nasceu em 23 de novembro de 1971, em Muriaé, MG.

Em 1985, concluiu o 1º grau na Escola Estadual Padre Maximino Benassati, em Muriaé, MG.

Em 1988, concluiu o Curso Técnico em Contabilidade no Centro Educacional de Muriaé, em Muriaé, MG.

Em 1995, diplomou-se Engenheira Florestal pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

Em junho de 2002 obteve o título de “*Magister Scientiae*” em Ciência Florestal, na Área de Concentração em Silvicultura, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em agosto de 2003, 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 julho de 2007.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. PROPAGAÇÃO CLONAL DE <i>Eucalyptus</i> .....	3
2.2. MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Eucalyptus</i> .....	5
2.3. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	7
2.4. EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA EM <i>Eucalyptus</i> .....	9
2.5. FASES DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	11
2.6. FATORES ENVOLVIDOS NA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	13
2.6.1. Efeito dos meios de cultura.....	13
2.6.2. Tipos de explantes utilizados.....	15
2.6.3. Efeito dos reguladores de crescimento.....	16
2.7. APLICAÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA NA ÁREA FLORESTAL.....	18
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAPÍTULO I	
SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES NO CONTROLE DA OXIDAÇÃO EM CALOS OBTIDOS A PARTIR DE COTILÉDONES E HIPOCÓTILOS NA MICROPROPAGAÇÃO VIA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA DE <i>Eucalyptus grandis</i> E <i>E. urophylla</i> .....	
RESUMO.....	25
1. INTRODUÇÃO.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1. MATERIAL EXPERIMENTAL.....	28
2.2. OBTENÇÃO DOS EXPLANTES.....	28
2.3. INDUÇÃO DE CALOS.....	29
2.4. CONDUÇÃO E AVALIAÇÕES EXPERIMENTAIS.....	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4. CONCLUSÕES.....	51
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

CAPÍTULO II	
TDZ NA INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS EM FOLHAS E SEGMENTOS INTERNODAIS DE DOIS CLONES DE <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	55
RESUMO.....	55
1. INTRODUÇÃO.....	55
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1. MATERIAL EXPERIMENTAL.....	57
2.2. OBTENÇÃO DOS EXPLANTES.....	57
2.3. INDUÇÃO DE CALOS.....	58
2.3.1. EXPERIMENTO 1.....	58
2.3.2. EXPERIMENTO 2.....	58
2.3.3. EXPERIMENTO 3.....	59
2.4. CONDUÇÃO E AVALIAÇÕES EXPERIMENTAIS.....	59
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4. CONCLUSÕES.....	66
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
CAPÍTULO III	
PRÉ-TRATAMENTO COM TEMPERATURA EM EXPLANTES DE CLONES HÍBRIDOS DE <i>Eucalyptus urophylla</i> NA INDUÇÃO DA EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA.....	69
RESUMO.....	69
1. INTRODUÇÃO.....	69
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	72
2.1. MATERIAL EXPERIMENTAL.....	72
2.2. OBTENÇÃO DOS EXPLANTES.....	72
2.3. INDUÇÃO DE CALOS.....	73
2.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	74
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
4. CONCLUSÕES.....	85
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
CAPÍTULO IV	
TIBA, ÁCIDO SALICÍLICO E ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO NA INDUÇÃO DE CALOS EMBRIOGÊNICOS EM COTILÉDONES E HIPOCÓTILOS DE <i>Eucalyptus urophylla</i> .....	88
RESUMO.....	88
1. INTRODUÇÃO.....	88
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	90
2.1. MATERIAL EXPERIMENTAL.....	90
2.2. OBTENÇÃO DOS EXPLANTES.....	91
2.3. INDUÇÃO DE CALOS.....	91
2.4. CONDUÇÃO E AVALIAÇÕES EXPERIMENTAIS.....	92
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
3.1. TIBA (2,3,5-ácido triodobenzóico).....	93
3.2. ÁCIDOS SALICÍLICO E ACETIL SALICÍLICO.....	96
4. CONCLUSÕES.....	98
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	101



## RESUMO

CARVALHO, Elisa Cristina Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007. **Antioxidantes, reguladores de crescimento e estresse térmico na embriogênese somática de *Eucalyptus* spp.** Orientador: Aloisio Xavier. Co-orientadores: Wagner Campos Otoni e Sérgio Yoshimitsu Motoike.

O presente trabalho teve por objetivos avaliar: a) o efeito de substâncias antioxidantes no controle da oxidação em calos obtidos de explantes juvenis de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*; b) o efeito do TDZ na indução de calos embriogênicos em folhas e entrenós de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*; c) o efeito do pré-tratamento com temperatura em explantes na indução de calos embriogênicos de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla*; e d) o efeito das substâncias TIBA, ácido salicílico e ácido acetil salicílico na indução de calos embriogênicos em cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus urophylla*. Os parâmetros avaliados no presente trabalho foram o percentual de calejamento dos explantes, intensidade de calejamento, oxidação, coloração e textura dos calos e a presença de estruturas embriogênicas. Nos experimentos com as substâncias antioxidantes, a transferência dos calos para novos meios a cada 30 dias e os diferentes antioxidantes testados se mostraram ineficientes em conter a oxidação fenólica e subsequente morte dos explantes após um período prolongado de cultivo. Não foram observadas diferenças significativas quanto ao calejamento e textura nos diferentes tratamentos, contudo, a adição de 10% de água de coco proporcionou aumento na intensidade de calejamento dos explantes e maiores percentagens de calos friáveis. Nos experimentos com TDZ, a combinação de TDZ com dicamba e picloram proporcionou calos de coloração amarelada,

enquanto nas combinações com ZEA e ANA, os calos formados foram em sua maioria de coloração esbranquiçada. Os melhores resultados de calejamento foram obtidos nos tratamentos combinando TDZ, ZEA e ANA. Não foi observada presença de raízes em nenhum dos tratamentos, e calos friáveis foram obtidos somente em um dos clones, entretanto, nenhuma estrutura embriogênica foi observada. A utilização da substância inibidora do transporte de auxina TIBA promoveu aumento na intensidade de calejamento em calos formados com dicamba, picloran e 2,4-D. Nas concentrações de 0,75 e 1 mg L<sup>-1</sup> de TIBA, observou-se uma mudança na textura de calos semifriáveis passando para calos friáveis, sendo que estes apresentaram ao final de 50 dias uma coloração amarelo brilhante com pouca oxidação, todavia, não foi observada formação de estruturas embriogênicas. A utilização de um pré-tratamento a 4°C em combinação com os reguladores dicamba, picloran, TDZ e TDZ + AIA em dois clones de *Eucalyptus* não apresentou resultado satisfatório na indução da embriogênese somática. Contudo, foi observada para um clone a formação de aglomerados celulares diferenciados em calos friáveis obtidos com 1 mg L<sup>-1</sup> semelhantes a massas pré-embriogênicas, demonstrando que a citocinina TDZ é promissora no desenvolvimento de um protocolo de embriogênese somática para material adulto de *Eucalyptus*. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram a literatura existente no que diz respeito à dificuldade em estabelecer um protocolo eficiente e com repetibilidade de embriogênese somática para espécies de *Eucalyptus*. Dada a importância da técnica e suas aplicações na silvicultura clonal, ressalta-se a necessidade de novos estudos que abordem novas possibilidades para o sucesso na obtenção de um sistema eficiente e reproduzível de embriogênese somática para diferentes espécies do gênero *Eucalyptus*.

## ABSTRACT

CARVALHO, Elisa Cristina Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2007. **Effects of antioxidants, growth regulators and thermal stress on somatic embryogenesis of *Eucalyptus* spp.** Advisor: Aloisio Xavier. Co-advisors: Wagner Campos Otoni and Sérgio Yoshimitsu Motoike.

The objective of this work was to evaluate: a) effect of antioxidant substances on the control of oxidation in calli of juvenile explants from *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*; b) effect of TDZ on the induction of embryogenic calli in leaves and internodes of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* clones; c) effect of temperature pre-treatment of explants on the induction of embryogenic calli in hybrid clones of *Eucalyptus urophylla*, and d) effect of TIBA, salicylic acid and acetyl salicylic acid on induction of embryogenic calli in cotyledons and hypocotyls of *Eucalyptus urophylla*. The parameters evaluated in the present work included percentage of callusing explants, callusing intensity, oxidation, color and texture of calli, and presence of embryogenic structures. In the experiments with the antioxidant substances, callus subculture onto fresh medium every 30 days and the different tested antioxidants were shown inefficient in stopping phenolic oxidation with subsequent explant death after a prolonged culture period. Significant differences were not found for callusing and texture in the different treatments, however, the addition of 10% of coconut water increased callusing of the explants and gave larger percentages of friable calli. In the experiments with TDZ, the combination of TDZ with dicamba and picloram produced calli of yellowish color, whereas the combinations with ZEA and NAA produced most calli of whitish color. The best callusing results were obtained with the treatments

combining TDZ, ZEA and NAA. No root induction was observed in any of the treatments, and friable calli were produced only in one clone, but without any embryogenic structure. The use of TIBA, inhibitor of auxin transport, increased callusing intensity in calli induced by dicamba, picloram and 2,4-D. TIBA at the concentrations 0.75 and 1 mg L<sup>-1</sup> changed texture from semifriable calli to friable calli, which showed at the end of 50 days a brilliant yellow color with little oxidation, but no embryogenic structures were observed. The pre-treatment at 4°C in combination with the growth regulators dicamba, picloram, TDZ and TDZ + IAA of two *Eucalyptus* clones did not result in satisfactory induction of somatic embryogenesis. However, with 1 mg L<sup>-1</sup>, there was formation of cell clusters differentiated into friable calli similar to pro-embryogenic structures in one clone, demonstrating that the cytokinin TDZ is promising for the development of a somatic embryogenesis protocol for adult *Eucalyptus* explants. The results of this work corroborate with the existing literature with respect to the difficulty in establishing an efficient protocol, with repeatability, for somatic embryogenesis in *Eucalyptus* species. Nevertheless, the importance of the technique and its applications in clonal silviculture emphasize the need for further studies that approach new possibilities in order to develop an efficient and reproducible somatic embryogenesis system for different species of the genus *Eucalyptus*.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As espécies de *Eucalyptus* se encontram entre as árvores mais plantadas em todo o mundo, com o Brasil ocupando uma posição destacada no cenário tecnológico mundial em termos de silvicultura clonal desta espécie. Nos últimos anos tem-se verificado constante aumento do interesse pela silvicultura clonal, visando principalmente à uniformização dos plantios, maior produtividade, qualidade da madeira e adaptação dos clones à área a ser implantada, aliada a um custo competitivo. Além disso, as técnicas de clonagem têm possibilitado a implantação de projetos de reflorestamento em áreas até então não indicadas, dada a limitação de material genético via seminal para atender a tal propósito (Xavier, 2002).

A restauração da competência para enraizamento de clones de *Eucalyptus* tem sido conseguida pelo rejuvenescimento através de técnicas de cultivo *in vitro*, como a micropropagação, a partir de gemas axilares. O desenvolvimento de técnicas como a microestaquia (Assis et al., 1992; Xavier e Comério, 1996) e a miniestaquia (Xavier e Wendling, 1998; Wendling et al., 2000) também possibilitaram consideráveis ganhos, principalmente quanto ao aumento dos percentuais e da qualidade de enraizamento e redução do tempo para a formação da muda.

Entretanto, ainda existem dificuldades que têm limitado a propagação de forma plena na silvicultura clonal. Entre as alternativas apontadas para a otimização da clonagem e promissoras no processo de propagação vegetativa de material genético selecionado, situa-se o uso de sementes sintéticas, obtidas pela técnica da embriogênese somática. Em princípio, esta técnica apresenta-se como

a ferramenta mais indicada na obtenção de mudas clonais, por permitir explorar ao máximo a juvenilidade, além da capacidade de produção de um grande número de embriões geneticamente idênticos, tornando-se poderosa ferramenta, a ser explorada para diversos objetivos, como a propagação em massa. Resultados promissores indicam a possibilidade do seu uso em programas de seleção de células, visando à criopreservação de germoplasmas, bem como à obtenção de plantas geneticamente transformadas, plantas poliplóides ou de híbridos somáticos.

Trabalhos realizados visando à obtenção de embriogênese somática para espécies do gênero *Eucalyptus* têm sido relatados nos últimos anos (Muralidharan e Mascarenhas, 1987; Watt et al., 1991; Tibok et al., 1995; Termignoni et al., 1996; Ruad et al., 1997; Bandyopadhyay et al., 1999; Arruda et al., 2000; Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002; Titon, 2005; Prakash e Gurumurthi, 2005). Contudo, a aplicação da técnica tem apresentado dificuldades, como obtenção de embriões em baixa frequência, baixa conversão em plantas, alto índice de formação de embriões anormais e alta produção de compostos fenólicos.

Considerando a importância e o potencial de aplicação da embriogênese somática na propagação clonal de *Eucalyptus* e a inexistência de uma metodologia eficiente, o presente trabalho teve por objetivos:

- Avaliar a ação de diferentes antioxidantes no intuito de conter a produção e liberação de compostos fenólicos durante a formação de calos obtidos de explantes juvenis de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla*.
- Avaliar o efeito do TDZ na indução de calos embriogênicos em explantes de folhas e entrenós de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com temperatura em explantes na indução da embriogênese somática de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla*.
- Avaliar o efeito do TIBA, ácido salicílico e ácido acetil salicílico na indução de calos embriogênicos em cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus urophylla*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Propagação clonal de *Eucalyptus*

O Brasil ocupa hoje uma posição destacada no cenário tecnológico mundial em termos de silvicultura clonal de espécies de *Eucalyptus* (Silva, 2001). Os incentivos fiscais concedidos, a partir de 1967, ao setor de reflorestamento, em especial com espécies exóticas de rápido crescimento, tornaram o gênero *Eucalyptus* economicamente importante no Brasil, em virtude de seu rápido crescimento, sua elevada produtividade e suas várias aplicações (Oda et al., 2007), podendo-se dizer que a origem da silvicultura intensiva clonal está diretamente ligada a este programa de incentivos fiscais ao reflorestamento (Ferreira, 1992).

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

Um programa de melhoramento genético deve ter suas estratégias bem definidas, planejadas em curto e longo prazo, e ser a base para a aplicação de técnicas de propagação clonal e de seleção de clones. A seleção de materiais genéticos superiores, em programas de melhoramento florestal, tem sido feita visando às características silviculturais de interesse, como volume de madeira para usos múltiplos e resistência às doenças (Oda et al., 2007).

No caso dos *Eucalyptus* spp., a silvicultura intensiva clonal adquire alta importância, pois propicia redução na idade de exploração, maior produção de madeira de melhor qualidade no menor espaço de tempo e por unidade de área, racionalização das atividades operacionais e redução nos custos de exploração e transporte (Ferreira, 1992).

Aliada à possibilidade de produção em massa de árvores-elite selecionadas e, conseqüentemente, uniformidade de material utilizado para plantio operacional e presença de características desejáveis (Watt et al., 1999), o uso da propagação clonal de *Eucalyptus* mostra vantagens mais importantes, resultantes da captura total do potencial genético de genótipos desejáveis (Zobel, 1993). Assim, a propagação clonal é vantajosa para a multiplicação de indivíduos superiores com combinações favoráveis de variação genética aditiva, possuindo a vantagem de ser isenta da segregação que normalmente ocorre durante a propagação sexual (Muralidharan e Mascarenhas, 1995).

Entre as técnicas de propagação clonal utilizadas em larga escala, a da estaquia é a mais difundida e amplamente utilizada, visto seus princípios já serem bem conhecidos, o que permitiu o desenvolvimento da silvicultura clonal intensiva em diversas partes do mundo (Xavier, 2003). Contudo, a propagação vegetativa de *Eucalyptus* por estaquia apresenta alguns problemas e não há um método padrão universal para sua propagação, sendo que, em muitas espécies e clones, as estacas oriundas de plantas adultas não enraízam (Assis, 1997; Watt et al., 1999).

Nos últimos anos, o aperfeiçoamento da técnica de estaquia, por intermédio da mini e microestaquia, proporcionou avanços consideráveis no processo de produção de mudas clonais de *Eucalyptus*, principalmente no que tange à maximização dos índices de enraizamento (Xavier et al., 2001). A microestaquia caracteriza-se primordialmente pela utilização de plantas rejuvenescidas *in vitro* como fontes de propágulos vegetativos, sendo a implementação desta técnica dependente da existência de laboratórios de cultura de tecidos que, além de limitar sua utilização, podem aumentar os custos de produção de mudas em função dos gastos com o rejuvenescimento dos clones *in vitro* (Assis, 1997). A alternativa da miniestaquia, precedendo à microestaquia, pode ser considerada uma boa estratégia, uma vez que a miniestaquia não necessita de estruturas de laboratório de cultura de tecidos, sendo justificada em



algumas situações em que a estaquia/miniestaquia apresentam resultados eficientes, tanto quanto aos da microestaquia. Em outras situações, a miniestaquia mostra-se como alternativa para certos clones que apresentam dificuldades no cultivo *in vitro* (recalcitrância, necessidades de ajustes de meio de cultura etc.), inviabilizando sua multiplicação vegetativa pela micropropagação (Xavier et al., 2001).

Diante do cenário florestal que se apresenta atualmente, toda tecnologia que facilite ou até mesmo viabilize comercialmente a produção de mudas de determinados clones é atrativa (Xavier et al., 2001). Para suprir um mercado cada vez mais exigente em quantidade e qualidade de produtos derivados de madeira e em consonância com o apelo para a preservação das florestas nativas ao redor do mundo, as florestas plantadas deverão produzir quantidades cada vez mais crescentes de biomassa, em menor tempo e, se possível, em áreas cada vez mais restritas. Para tanto, a contribuição da biotecnologia é a chave para que melhoristas florestais atinjam esses objetivos (Pasquali e Zanettini, 2007).

A biotecnologia tem apresentado oportunidades na clonagem massal de genótipos superiores, principalmente no caso de clones de difícil enraizamento pela técnica de estaquia convencional. Nesta situação, a micropropagação tem sido considerada uma técnica potencial no rejuvenescimento de clones, tornando-os aptos ao processo de produção de mudas (Xavier et al., 2001).

Há alguns anos, a micropropagação era considerada uma técnica interessante do ponto de vista teórico. Mas atualmente é cada vez maior o número de laboratórios comerciais que incluem a micropropagação, não como uma revolução da área florestal, mas como uma ferramenta útil capaz de ajudar a solucionar problemas diversos (Rodrigues et al., 2005), sendo o potencial desta técnica em espécies lenhosas descrito em repetidas ocasiões nos últimos anos, observando-se também um avanço na micropropagação de espécies recalcitrantes (Sánchez-Olate et al., 2005).

## **2.2. Micropropagação de *Eucalyptus***

A micropropagação de *Eucalyptus* pode ser definida como técnica de propagação vegetativa *in vitro* (Xavier et al., 2007) e compreende o cultivo

asséptico de partes de plantas em condições controladas de nutrição, umidade, luz e temperatura (Hartmann et al., 2002).

Por esta técnica, plantas completas podem ser obtidas a partir de gemas pré-existentes que são estimuladas a crescer e proliferar, pela morfogênese de gemas ou organogênese, em que novas gemas são induzidas a se formar em tecidos desorganizados denominados calos ou diretamente sobre o explante, assim como através da formação de embriões somáticos que se assemelham a embriões zigóticos, sendo este processo denominado embriogênese somática (Thorpe et al., 1991; Bonga e Von Aderkas, 1992; George, 1993).

O desenvolvimento *in vitro* de células e tecidos depende de diferentes fatores como: genótipo, idade e estágio de desenvolvimento do explante e estado fisiológico da planta doadora dos explantes e ambiente externo que incluem composição do meio de cultura e condições físicas de cultura. Interações entre todos estes fatores conduzem à indução e expressão de um modo específico de diferenciação celular e desenvolvimento (Gaj, 2004). Como para a maioria das espécies arbóreas, a micropropagação por proliferação de gemas axilares tem sido o método comumente utilizado para a multiplicação de *Eucalyptus* (Watt et al., 1999; Watt et al., 2003).

Dentre as vantagens do uso e aplicações deste sistema de micropropagação na área florestal, está a possibilidade de propagação de árvores selecionadas em todas as idades, constituindo-se em alternativa em relação aos métodos clássicos de propagação vegetativa (Xavier et al., 2007). Em *Eucalyptus*, também tem sido utilizada para aumentar a taxa de multiplicação na fase inicial do programa de propagação vegetativa, visando a encurtar o tempo entre a seleção das estacas e o uso do clone em plantios comerciais (Chaperon, 1987). Em adição, técnicas de transformação genética são dependentes do cultivo *in vitro* para obtenção e multiplicação de novos genótipos (Watt et al., 1999).

A seleção de genótipos mais responsivos à cultura *in vitro* e à morfogênese, bem como a de explantes com competência para a transformação constituem os fatores fundamentais para a transformação de arbóreas. Contudo, contrastando com a imensa importância econômica de árvores do gênero *Eucalyptus*, a literatura de impacto científico relevante e, conseqüentemente, de acesso público, é muito limitada em trabalhos que descrevem a obtenção de

plantas transgênicas completas para este gênero. Em um bom número de trabalhos, está descrita a geração de calos, tecidos e órgãos (como raízes) geneticamente transformados em cultura *in vitro*, porém, sem a comprovação de que plantas completas tenham sido obtidas a partir destes (Pasquali e Zanettini, 2007).

### **2.3. Embriogênese somática**

Embriogênese somática pode ser descrita como o processo a partir do qual estruturas bipolares semelhantes a embriões zigóticos se desenvolvem de células somáticas, seguindo uma seqüência de estádios característicos da embriogênese zigótica, dando origem a uma planta, sem que ocorra fusão de gametas (Guerra et al., 1999; Jiménez, 2001; Arnold et al., 2002). Os embriões somáticos se assemelham, morfológicamente, a embriões zigóticos, embora tenham a característica de não formar o suspensor, eles são bipolares e possuem órgãos tipicamente embriogênicos, como radícula, hipocótilo e cotilédone, com a particularidade de não apresentar conexão vascular com o tecido de origem (Howell, 1998; Arnold et al., 2002).

Embriões somáticos podem se diferenciar diretamente do explante sem a ocorrência de uma fase de calo ou indiretamente após a fase de formação de calo (George, 1993; Arnold et al., 2002). Segundo algumas hipóteses, a embriogênese somática direta ocorreria a partir de células embriogenicamente pré-determinadas, enquanto a embriogênese somática indireta ocorreria a partir de células indeterminadas em que os calos não diferenciados deveriam ser primeiramente formados. Contudo, na realidade, o calo formado pode ser embriogênico ou não (Howell, 1998).

Apenas algumas células somáticas são sensíveis aos fatores de indução que conduzem à embriogênese somática. Tais células representam um estado intermediário entre células somáticas e embriogênicas, sendo denominadas competentes (Gaj, 2004). A aquisição de competência embriogênica, em grande parte provém na desdiferenciação, um processo por meio do qual, perfis existentes são apagados ou alterados em ordem para permitir às células

estabelecer um novo programa de desenvolvimento (Fehér et al., 2003). Células competentes exibem sensibilidade a estímulos físicos e químicos que engatilham a rota embriogênica do seu desenvolvimento, enquanto células embriogênicas já são determinadas à embriogênese (Gaj, 2004).

A desdiferenciação de células vegetais somáticas está associada à ativação da divisão celular. Ambos os processos requerem a ação de reguladores de crescimento vegetais exógenos, mais especificamente auxinas e citocininas (Fehér et al., 2002). A auxina é o fator mais importante na regulação da indução e desenvolvimento da embriogênese e apresenta diferentes efeitos nas diferentes fases da embriogênese somática (Komamine et al., 1992), sendo considerada o principal regulador requerido para a ativação da divisão celular e na diferenciação das células tanto em sistemas *in vitro* como *in vivo* (Fehér et al., 2002).

A formação de aglomerados de células embriogênicas é dependente de sinais celulares promovidos pela presença de auxinas, indicando serem elas um fator essencial para indução da embriogênese. Em outras palavras, as auxinas são necessárias para as células competentes expressarem sua totipotencialidade. Contudo, ela é inibitória nas fases subseqüentes da embriogênese (Komamine et al., 1992).

Apesar do número considerável de pesquisas conduzidas nos últimos anos, o conhecimento ainda é vago com respeito aos mecanismos pelos quais os hormônios vegetais estão envolvidos na regulação da embriogênese somática. Existe um padrão bem definido para espécies e genótipos altamente responsíveis, nos quais auxinas, como o 2,4-D, desempenham um papel positivo durante a indução, enquanto a retirada deste composto ativa a expressão, permitindo o desenvolvimento de embriões somáticos. Contudo, este cenário não está tão claro para os genótipos mais recalcitrantes, nos quais os requerimentos podem variar grandemente (Jiménez, 2005).

Até recentemente, a embriogênese somática era possível apenas em poucas espécies florestais, contudo, está se tornando uma técnica de micropropagação comum para diversas espécies arbóreas, devido ao enorme aumento de conhecimento sobre fatores fisiológicos e bioquímicos que controlam sua indução e manutenção, tanto quanto sua subseqüente maturação e desenvolvimento de embriões somáticos (Benelli et al., 2001). Estudos

concernentes à determinação de condições *in vitro* para indução de embriões somáticos e sua conversão em plantas têm disponibilizado protocolos eficientes com vistas à embriogênese somática e à formação de plantas em diferentes espécies (Gaj, 2004), e, se utilizados em conjunto com métodos convencionais, podem contribuir notadamente para o progresso na multiplicação de genótipos de valores comerciais, tanto quanto no resgate e conservação de genótipos superiores (Watt et al., 1999).

#### **2.4. Embriogênese somática em *Eucalyptus***

Esforços para induzir embriogênese somática têm sido descritos para várias 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, tais como densidade de células, nutrientes ou iluminação (Howell, 1998). A embriogênese somática já foi relatada em mais de 300 espécies (Bajaj, 1995), com trabalhos publicados para algumas espécies do gênero *Eucalyptus* como: *E. citriodora* (Muralidharan e Mascarenhas, 1987; Muralidharan et al., 1989), *E. grandis* (Watt et al., 1991; Major et al., 1997; Titon, 2005), *E. globulus* (Nugent et al., 1997; Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002), *E. dunnii* (Termignoni et al., 1996), *E. urophylla* (Tibok et al., 1995; Arruda et al., 2000), *E. nitens* (Bandyopadhyay, et al., 1999; Ruad et al., 1997), *E. globulus* (Bandyopadhyay, et al., 1999) e *E. tereticornis* (Prakash e Gorumurthi, 2005).

Embriões zigóticos maduros com cotilédones e eixo embrionário intactos foram utilizados como fonte de explante em *Eucalyptus citriodora* em meio de cultura contendo 3 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 50 g L<sup>-1</sup> de sacarose, em que os embriões somáticos formados se desenvolveram em plantas normais, quando subcultivados para meio sem regulador de crescimento (Muralidharan e Mascarenhas, 1987). Pinto et al. (2002) conseguiram embriogênese somática em *Eucalyptus globulus* apenas na presença de ANA, tanto sozinha, como em combinação com 2,4-D, de onde calos embriogênicos emergiram principalmente a partir de cotilédones de embriões zigóticos inteiros na presença de ANA. A germinação de embriões zigóticos inteiros foi observada em todos os meios testados. Duas semanas após

a inoculação, o processo de germinação parou e a produção de calos foi iniciada principalmente nos cotilédones. Os calos embriogênicos eram compactos, castanhos esbranquiçados e compostos principalmente de pequenas células isodiamétricas. As melhores taxas embriogênicas foram obtidas na presença de 3 a 5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, em que aproximadamente 30% dos calos formados nestes meios produziram embriões somáticos. A conversão de embriões somáticos em plantas (21%) foi obtida quando estes eram transferidos para meio de cultura isento de reguladores de crescimento.

No trabalho de Pinto et al. (2002), plantas com dois meses de idade, oriundas de sementes, falharam em produzir embriões somáticos. Ocasionalmente, a embriogênese somática direta ocorreu na superfície superior de hipocótilos obtidos de plântulas com três dias de idade e, de forma indireta, em cotilédones com a mesma idade. De forma semelhante, Termignoni et al. (1996) obtiveram sucesso na indução de embriogênese somática em *Eucalyptus dunni*, utilizando sementes maduras germinadas ou tecidos derivados de plântulas. Os autores observaram que plântulas com 3 dias de idade foram eficientes na indução da embriogênese somática.

Explantos de hipocótilo de plântulas com idade de 14 dias de *Eucalyptus urophylla* em meio de cultura com TDZ mais ANA induziram tanto à organogênese, como à produção de estruturas semelhantes a embriões no estágio cordiforme (Tibok et al., 1995). Calos com resposta morfogênica em *Eucalyptus nitens* e *E. globulus* foram obtidos de explantes cotiledonares e hipocótilos, sendo mais observada a formação de gemas adventícias em ambos os explantes. Ocasionalmente, a embriogênese somática foi observada em *E. nitens* surgindo na superfície de calos organogênicos. Estruturas organizadas se assemelhando a embriões somáticos foram também observadas em *E. globulus* (Bandyopadhyay et al., 1999). Titon (2005) observou estruturas semelhantes a embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento em explantes cotiledonares de *Eucalyptus grandis*, no qual a análise histológica confirmou tratar-se de estruturas independentes, sugerindo a presença de um sistema vascular fechado.

Ruaud et al. (1997) reportaram a ocorrência de embriogênese somática secundária em *Eucalyptus nitens*. Embriões somáticos foram obtidos de explantes provenientes de cotilédones, hipocótilos, folhas e epicótilos, em que o maior

número de embriões por calo competente foi obtido em hipocótilo na presença de 0,1  $\mu\text{M}$  de BAP. Em meio contendo 0,5  $\mu\text{M}$  de BAP e 0,5  $\mu\text{M}$  de ANA, embriões somáticos globulares começaram a proliferar, dando origem a novos embriões.

Considerando a importância da embriogênese somática e seu potencial de aplicação, percebe-se, no contexto atual, uma carência de estudos com relação aos fatores que influenciam seu sucesso para *Eucalyptus*. Com a solução destes problemas, a embriogênese somática pode estar disponível para a propagação clonal em massa desta espécie num futuro próximo.

## **2.5. Fases da Embriogênese Somática**

A embriogênese somática é um processo que envolve uma seqüência de passos, começando com a formação de massas pró-embriogênicas, seguida pela formação do embrião somático, maturação e formação da planta (Arnold et al., 2002).

Culturas embriogênicas são geralmente iniciadas a partir de explantes embrionários, juvenis ou maduros, cultivados em meios semi-sólidos na presença de auxinas com ou sem uma citocinina. Nos modelos diretos, a primeira expressão morfogênica é o surgimento de estruturas globulares brancas e translúcidas que correspondem a embriões somáticos globulares. Em modelos indiretos, inicialmente há a diferenciação de calo e o surgimento nele de regiões friáveis, normalmente brancas e translúcidas, convencionalmente designadas de massas ou complexos celulares pró-embriogênicos, os quais se dividem para formar pró-embriões somáticos (Guerra et al., 1999).

No modelo de Komamine et al. (1992), observações morfológicas detalhadas revelaram quatro fases 0, 1, 2 e 3 no processo inicial de embriogênese. Na FASE 0, células competentes individuais (ESTADO 0) formam aglomerados celulares (ESTADO 1) na presença de auxina. Durante esta fase, os aglomerados celulares formados das células individuais ganham a habilidade de se desenvolver em embriões quando a auxina é removida do meio de cultura, dando origem ao aglomerado celular no ESTADO 1. A subsequente fase (FASE 1) é induzida pela transferência de aglomerados celulares no ESTADO 1 para um

meio isento de auxina. Durante a FASE 1, aglomerados celulares proliferaram lentamente e aparentemente sem marcada diferenciação. Após a FASE 1, uma rápida divisão celular ocorre em certas partes do aglomerado celular, conduzindo à formação de embriões globulares. Esta é designada FASE 2. Na FASE 3, plântulas se desenvolvem dos embriões globulares via embriões cordiforme e torpedo.

Na fase de manutenção e multiplicação das culturas embriogênicas, devem-se determinar as condições adequadas para o estabelecimento de ciclos repetitivos de divisão celular e o controle restrito dos processos de diferenciação, de tal maneira que as culturas sejam constituídas por células pró-embrionárias ou embriões somáticos em estádios globulares iniciais de desenvolvimento (Guerra et al., 1999).

A próxima fase compreende estimular a progressão das fases iniciais para as fases tardias, mediante desenvolvimento e maturação dos embriões somáticos, interrompendo os ciclos repetitivos de divisão celular e fornecendo estímulos fisiológicos, bioquímicos e ambientais para a diferenciação celular (Guerra et al., 1999).

Durante a fase de maturação, o embrião sofre várias mudanças morfológicas e bioquímicas que são evidenciadas pela deposição de material de reserva, repressão da germinação e aquisição de tolerância à dessecação. Contudo, existem diversos exemplos na literatura em que culturas embriogênicas somáticas não se desenvolvem normalmente, não germinam, nem se convertem em plantas normais. Em outros casos, o desenvolvimento e a maturação do embrião são interrompidos por germinação precoce, conduzindo à ocorrência de um pobre desenvolvimento das plantas. Têm sido dedicados grandes esforços para evitar estes problemas, especialmente pela adição ao meio de cultura de certos reguladores de crescimento, de modo a permitir que fases posteriores da embriogênese somática progridam similarmente às da embriogênese zigótica (Jiménez, 2005).

A inclusão de ácido abscísico no meio de cultivo durante as fases finais de desenvolvimento da embriogênese somática se assemelha, de certa forma, ao natural aumento endógeno de hormônios, observado em diversos embriões



zigóticos, sendo necessário para estimular a maturação e ao mesmo tempo prevenir a germinação precoce (Jiménez, 2005).

Em alguns sistemas embriogênicos, como no caso da cenoura, a embriogênese somática é um processo recorrente, ou seja, novos embriões somáticos são formados de embriões somáticos existentes, sendo esta proliferação denominada embriogênese secundária, recorrente ou repetitiva. Usualmente, calos embriogênicos são mantidos e proliferam em um meio similar ao usado para sua iniciação (George, 1993; Jiménez, 2005).

## **2.6. Fatores envolvidos na embriogênese somática**

O desenvolvimento de tipos celulares embriogênicos e não embriogênicos pode ser influenciado por diferentes fatores como: genótipo, idade e estágio de desenvolvimento do explante, estado fisiológico da planta doadora dos explantes e ambientes externos que incluem composição do meio de cultura e condições físicas de cultura. Interações entre todos estes fatores conduzem à indução e à expressão de um modo específico de diferenciação celular e desenvolvimento (Fehér et al., 2002; Gaj, 2004). É normalmente após uma mudança em uma ou mais condições de cultura que tecidos ou células induzidas alcançam o estágio de expressão, no qual as células exibem sua competência embriogênica e se diferenciam em embriões somáticos (Jiménez, 2005).

### **2.6.1. Efeito dos meios de cultura**

A forma como o nitrogênio é adicionado ao meio de cultura é determinante para o êxito da embriogênese somática, e a adição simultânea de compostos nitrogenados, na forma reduzida e de nitrato, tem efeito indutor na formação de embriões somáticos, ressaltando que o nitrogênio na forma amoniacal é essencial para o desenvolvimento do pró-embrião (Guerra et al., 1999). Em cultura de células de cenoura, um certo nível de amônio intracelular é requerido para que a embriogênese ocorra, e um suprimento de nitrogênio reduzido é necessário para induzir altos níveis de embriogênese somática (Fischella et al., 2000). Para

coníferas, a utilização de glutamina, sozinha ou em combinação com caseína hidrolisada, e de formas inorgânicas de nitrogênio tem sido, geralmente, o procedimento usado em diferentes fases da embriogênese somática (Garin et al., 2000).

A sacarose tem sido a fonte de carboidrato mais usada para a embriogênese somática, embora outros mono e dissacarídeos também possam ser utilizados. A concentração de sacarose influencia os processos de iniciação e diferenciação dos embriões somáticos, uma vez que seu metabolismo nas 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. Normalmente a concentração de 3% (p/v) de sacarose é satisfatória para os processos de iniciação e diferenciação (Guerra et al., 1999). O aumento da embriogênese somática em meios de cultura contendo sacarose pode resultar de um aumento na concentração de nutriente ou de um aumento no potencial osmótico do meio de cultura (Biahoua e Bonneau, 1999).

Arruda et al. (2000) relataram que um aumento nas concentrações de cálcio proporcionou alto conteúdo de proteína total e açúcar com aumento na atividade de peroxidases específicas, assim como mudanças nas características histológicas de explantes de *Eucalyptus urophylla*. Estes autores determinaram, com base nos resultados, que o cálcio é um importante agente na indução da morfogênese em *Eucalyptus urophylla*, especialmente da embriogênese somática. O efeito desse elemento sobre os conteúdos de proteína total, açúcares e atividade de peroxidases específicas conduz a mudanças que poderiam ser responsáveis pelas alterações observadas nas características histológicas dos explantes, ao longo do cultivo que levou à morfogênese. Foi relatado que o cálcio na concentração de 6,62 mM estimulou a formação de embriogênese somática direta e embriões somáticos globulares na superfície do explante. Contudo, a formação de plantas a partir destes embriões não foi observada.

Segundo Perrin et al. (2001), em videira, a embriogênese somática tem sido alcançada em alguns genótipos, mas a manutenção da cultura de calos embriogênicos friáveis ainda permanece restrita a poucos acessos. Acredita-se que a resposta de determinados acessos de videira recalcitrantes para o cultivo *in vitro* seja um reflexo dos nutrientes essenciais no meio de cultura, em que as

respostas observadas sejam devidas a um suprimento inadequado dos componentes do meio de cultura. Esses autores verificaram que o conteúdo de amônio desempenha um papel chave na viabilidade celular e transição de calos menos embriogênicos para mais embriogênicos, como também na formação de plantas. E que, ademais, a obtenção de calos embriogênicos é fator limitante na eficiência da embriogênese com vistas à obtenção de plantas, podendo tal fator ser superado pela melhoria do meio de cultura.

### **2.6.2. Tipos de explantes utilizados**

O sucesso no cultivo do material vegetal *in vitro* é marcadamente influenciado pela idade do tecido ou órgão que será utilizado como explante inicial. Assim, os requerimentos para calogênese freqüentemente diferem de acordo com a idade do explante (George, 1993). Há que considerar, ainda, que o tipo de material inicial, juvenil ou adulto, assim como a posição original do explante na planta refletem os níveis hormonais endógenos das células do tecido utilizado, podendo ter importante influência sobre cada processo como o da divisão celular e formação de órgãos e embriões (Pierik, 1997). Os níveis de substâncias reguladoras de crescimento endógenas são considerados como um dos fatores cruciais influenciando o potencial embriogênico dos explantes. Parece que explantes e culturas responsivas à embriogênese somática sofrem um acúmulo nas taxas de auxinas endógenas (AIA) em lugar de uma exibição estável (Gaj, 2004). Existem plantas recalcitrantes, nas quais, apenas explantes específicos, usualmente juvenis, são responsivos (Jiménez, 2005).

Ressalta-se que calos originados de tecidos juvenis e/ou herbáceos, geralmente proporcionam maiores respostas morfogênicas do que aqueles originados de materiais provenientes de plantas adultas e/ou lenhosas (Pierik, 1997). Na maioria dos casos, a embriogênese é iniciada em embriões imaturos ou maduros, como também em explantes provenientes de plântulas. O número de espécies em que a embriogênese tem sido alcançada em explantes de árvores maduras ainda é limitado (Bonga e Von Aderkas, 1992). A utilização de tecidos juvenis como embriões zigóticos e óvulos é ainda a estratégia mais viável para alcançar a embriogênese somática em angiospermas lenhosas e árvores frutíferas (Muralidharan e Mascarenhas, 1987). Explantes juvenis parecem ter

mais alta capacidade morfogênica em espécies lenhosas (Termignoni et al., 1996).

Nos trabalhos revisados para embriogênese somática em *Eucalyptus*, percebe-se, quase na sua totalidade, a utilização de materiais juvenis como fonte de explantes. Lakshmi Sita (1981), citado por Muralidharan e Mascarenhas (1995), descreve a formação de estruturas semelhantes a embriões em cultura de suspensão celular de *E. citriodora* e *E. grandis* obtidas de explantes caulinares de árvores maduras, porém, sem o posterior desenvolvimento de embriões ou plantas. Em trabalhos mais recentes, embriões somáticos ou estruturas semelhantes a embriões foram formados em explantes juvenis como embriões zigóticos maduros (Muralidharan e Mascarenhas, 1987; Pinto et al., 2002), sementes maduras germinadas (Termignoni et al., 1996), cotilédones (Ruad et al., 1997; Bandyopadhyay et al., 1999; Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002; Titon, 2005), hipocótilos (Tibok et al., 1995; Ruad et al., 1997; Bandyopadhyay et al., 1999; Arruda et al., 2000; Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002) e folhas obtidas de plântulas (Watt et al., 1991; Ruad et al., 1997).

### **2.6.3. Efeito dos reguladores de crescimento**

Com relação à importância alcançada pela embriogênese somática e dos muitos estudos que têm sido conduzidos neste processo de desenvolvimento, existem ainda muitos aspectos que não foram totalmente compreendidos. Entre os quais, o envolvimento dos hormônios vegetais e os reguladores de crescimento em determinar a conversão de tecidos somáticos em tecidos embriogênicos e em permitir a progressão e maturação de embriões somáticos, estão longe de ser completamente elucidados (Jiménez, 2005).

Entre diferentes estímulos externos que induzem à rota da embriogenia somática, os reguladores de crescimento vegetais, como auxinas e citocininas utilizados nos meios de cultura, têm sido mais freqüentemente considerados como os fatores de regulação do ciclo celular e os gatilhos para as divisões celulares. Diferentes dados documentam uma ligação entre o suprimento exógeno de reguladores de crescimento e a ativação de divisões celulares e subsequente diferenciação celular. A composição e a concentração relativa dos reguladores de

crescimento determinam tanto a habilidade do explante cultivado em responder, quanto o modo de reação morfo genética (Gaj, 2004).

Apenas em alguns poucos sistemas de clonagem de plantas pela via embriogênica somática, os reguladores de crescimento não têm sido requeridos para a indução do processo. Segundo Gaj (2004), meios de cultura sem fitorreguladores têm sido empregados em menos de 7% dos protocolos, e em mais de 80% dos protocolos responsivos à embriogênese somática a presença de auxinas em separado ou em combinação com citocininas é fundamental, sendo fatores chaves na determinação da resposta embriogênica, provavelmente devido à sua grande participação na regulação do ciclo celular e divisão celular. Contudo, ácido abscísico, etileno, giberelinas e outros fitorreguladores possuem um papel regulatório que não pode ser ignorado nos sistemas de cultura. Além disso, uma nova geração de reguladores de crescimento como o tidiazuron, uma citocinina que pertence ao grupo das fenil-uréias, está emergindo como uma alternativa promissora para aumentar a frequência de formação direta de embriões somáticos até mesmo em tecidos explantes bem diferenciados (Jiménez, 2005). Em alguns sistemas, citocininas ao invés de auxinas têm sido efetivas na indução da embriogênese somática, mas estes sistemas são mais raros e descritos em menos de 14% dos trabalhos mais recentes (Gaj, 2004).

Embora a presença de uma auxina seja requerida para a formação de aglomerados celulares embriogênicos, sua presença, contudo, é inibitória nas fases subseqüentes da embriogênese, ou seja, a auxina é requerida para a indução da embriogênese (processo desde células competentes a aglomerados celulares embriogênicos), mas é inibitória para seu desenvolvimento (processo desde os aglomerados celulares embriogênicos à formação das plantas) (Komamine et al., 1992).

Ao lado de uma grande variação de tipos indutores, a embriogênese somática não pode ser definida como uma resposta específica a um ou mais reguladores de crescimento exógenos aplicados. Muitas das observações indicam um papel crítico do estresse como um estímulo embriogênico. Níveis endógenos de fitorreguladores, contudo, podem ser considerados como um dos maiores fatores em determinar a especificidade de resposta celular destes estímulos gerais de estresse (Fehér et al., 2003). Em poucos trabalhos, nos quais os

conteúdos endógenos dos fitorreguladores foram acompanhados durante a indução da embriogênese somática, um aumento transitório dos níveis endógenos de AIA parece ser uma característica comum (Jiménez, 2005).

A despeito do requerimento absoluto de auxinas exógenas no cultivo *in vitro*, as células vegetais em cultura produzem quantidades substanciais de auxina endógena AIA, em que altas concentrações endógenas de AIA têm sido mostradas em diferentes espécies e explantes, estando associadas a um aumento na resposta embriogênica. Tem sido hipotetizado que a competência embriogênica em cenoura está intimamente associada a um aumento nos níveis endógenos de AIA devido à presença de 2,4-D. Esta auxina sintética provavelmente age nas células não diretamente como uma super auxina, mas por perturbar o metabolismo endógeno das auxinas (Fehér et al., 2002).

Uma vez que o estímulo para o posterior desenvolvimento dos embriões somáticos é dado (como retirada ou redução de auxinas), os níveis endógenos de AIA devem ser reduzidos para permitir o estabelecimento de um gradiente polar de auxinas. O crescimento contínuo em meio contendo 2,4-D não permite uma redução nos níveis de auxinas endógenas, resultando na inibição do desenvolvimento do embrião (Jiménez, 2005).

## **2.7. Aplicação da embriogênese somática na área florestal**

A produção de mudas de *Eucalyptus* a partir de embriões somáticos seria amplamente mais vantajosa, quando comparada com outras técnicas de propagação vegetativa, tal como a estaquia e a propagação *in vitro* pela via organogênica, uma vez que os embriões podem ser produzidos em grande número utilizando espaços reduzidos em laboratório. Posteriormente, esses embriões seriam induzidos a germinar como se fossem sementes e seriam plantados em viveiro por semeadura. Outra vantagem reside no fato de os embriões somáticos possuírem a mesma morfologia dos embriões zigóticos e, deste modo, o sistema radicular não ser adventício (Ratnieks e Assis, 1993). Para espécies florestais, acrescenta-se que a produção de sementes sintéticas em laboratório pode ocorrer em fluxo contínuo ao longo do ano, não dependendo de

perdas por condições climáticas desfavoráveis, ataque de pragas e doenças, ou danos de baixa produção, aspectos estes comumente associados à produção de sementes nessas espécies (Guerra et al., 1999).

Aliada à técnica de clonagem de *Eucalyptus*, utilizada 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 essas plantas, o material pode ser multiplicado em grande escala pela técnica de microestaquia, já difundida nas empresas florestais (Xavier et al., 2007)

Contudo, deve-se ressaltar que o êxito na indução de embriões somáticos e subsequente recuperação de plantas viáveis não é rotina ou eficiente para a maioria das espécies. A habilidade para o entendimento dos mecanismos envolvidos na indução e expressão da embriogênese somática em diferentes espécies aumentará o número de genótipos capazes de responder à propagação massal *in vitro* por este processo (Jiménez, 2001).

Em adição à dificuldade de iniciação da embriogênese somática em alguns genótipos, em um grande número de espécies lenhosas, existem problemas na maturação e conversão (germinação) de embriões somáticos e no desenvolvimento de plantas completas (Ahuja, 1993). Outro problema intrínseco está associado à passagem pela fase de calo, que pode levar à ocorrência de alterações cromossômicas, possibilitando a perda da fidelidade genética (Ratnieks e Assis, 1993). Com a solução desses problemas, a embriogênese somática pode estar disponível para a propagação clonal em massa de espécies lenhosas num futuro próximo.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUJA, M. R. Micropropagation *à la carte*. In: Ahuja, M. R. (Ed.). **Micropropagation of woody plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993. p.3-9.
- ARNOLD, S. V.; 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.
- 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. 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, 1992, Nova Prata. **Anais...** Santa Maria, RS. UFSM, 1992. p.824-836.
- BAJAJ, Y. P. S. **Somatic embryogenesis and synthetic seed**. 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.
- BENELLI, C.; FABBRI, A.; GRASSI, S.; LAMBARDI, M.; RUGINI, E. Histology of somatic embryogenesis in mature tissue of olive (*Olea europaea* L.). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.76, n. 1, p.112-119, 2001.



BIAHOUA, A.; BONNEAU, L. Control of *in vitro* somatic embryogenesis of the spindele tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium. **Plant Cell Reports**, v.19, p.185-190, 1999.

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

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.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; ÖTVÖS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia, Bratislava**, v.57, n.1, p.5-12, 2002.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cell to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.74, p.201-228, 2003.

FERREIRA, M. Melhoramento e a silvicultura intensiva clonal. **IPEF**, v.45, p.22-30, 1992.

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.

GAJ, M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v.43, p.27-47, 2004.

GARIN, E.; CARDOU, M. B.; ISABEL, N.; KLIMASZEWSKA, K.; PLOURDE, A. Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.62, p.27-37, 2000.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture - The technology**. 2. ed. England: Exegetics, 1993. v.1, 575 p.

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.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7<sup>th</sup> ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880p.

HOWELL, S. H. **Molecular genetics of plant development**. Cambridge: University Press, 1998. 365p.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v.47, p.91-110, 2005.

KOMAMINE, A.; KAWAHARA, R.; MATSUMOTO, M.; SUNABORI, S.; TOYA, T.; FUJIWARA, A.; TSUKAHARA, 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.

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 *E. camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v.6, p.256-259, 1987.

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.; GUPTA, P.; NEWTON, R. (Eds.). **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. v.2, p.23-40.

NUGENT, G.; CHANDLER, S. F.; WHITEMAN, P.; STEVENSON, T. W. 1997. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus* LABILL. In: IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalyptus, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo, PR: EMBRAPA, 1997. v.1, p.183-185.

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.

ODA, S.; MELLO, E. J.; SILVA, J. F.; SOUZA, I. C. G. Melhoramento florestal. In: BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**. Viçosa: UFV, 2007. p.123-142.

PASQUALI, G.; ZANETTINI, M. H. B. Transgênese florestal. In: BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**. Viçosa: UFV, 2007. p.317-334.

PERRIN, M.; MARTIN, D.; JOLY, D.; DEMANGEAT, G.; THIS, P.; MASSON, J. E. Medium-dependent response of grapevine somatic embryogenic cells. **Plant Science**, v.161, p.107-116, 2001.

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

- PINTO, G.; SANTOS, C.; NEVES, L.; ARAÚJO, C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. **Plant Cell Reports**, v.21, n.3, p.208-213, 2002.
- PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis* Sm. **Current Science**, v.88, n.8, p.1311-1316, 2005.
- RATNIEKS, E., ASSIS, T. F. O que há adiante da árvore? **O papel**, v.54, n.1, p.41-48, 1993.
- RESENDE, M. D. V. Melhoramento de essências florestais. In: BORÉM, A. Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, 1999. p.589-647.
- RODRÍGUES, R.; CASTAÑÓN, S. Y.; URIBE, M. Biotecnología Forestal: Presente y Futuro. In: SÁNCHEZ-OLATE, M. E.; LEAL, D. G. R. (eds.). **Biotecnología Vegetal en Especies Leñosas de Interés Forestal**. Concepción: Inprenta Austral, 2005. p. 5-16.
- RUAUD, J. N.; CHURCHILL, K.; PEPPER, S. Somatic embryogenesis initiation in *Eucalyptus nitens*. **Acta Horticulturae**, v.447, p.185-186, 1997.
- SÁNCHEZ-OLATE, M. E.; LEAL, D. G. R.; RODRIGUES, E. R. La biotecnología vegetal y el mejoramiento genético de especies leñosas de interés forestal y sus proyecciones en Chile. In: SÁNCHEZ-OLATE, M. E.; LEAL, D. G. R. (eds.). **Biotecnología Vegetal en Especies Leñosas de Interés Forestal**. Concepción: Inprenta Austral, 2005. p. 17-28.
- SILVA, L. F. Propagação vegetativa do eucalipto. A experiência da International; Paper do Brasil. IPEF, Notícias, v.25, p.156, 2001
- TERMIGNONI, R. R.; WANG, P. J.; HU, C. Y. Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45, p.129-132, 1996.
- THORPE, T. A.; HARRY, I. S.; KUMAR, P. P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.). **Micropropagation, technology and application**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.311-336.
- 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. **Indução de embriogênese somática em *Eucalyptus grandis***. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2005. 106p. Tese (Doutorado em Ciência florestal)- Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**. Viçosa: UFV, 2007. p.55-74.

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

XAVIER, A. Silvicultura clonal I: Princípios e técnicas de propagação vegetativa. Viçosa, MG: UFV, 2002. 64p. (Caderno Didático, 92).

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

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

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

WATT, M. P.; BERJAK, P.; MAKHATHINI, A.; BLAKEWAY, F. *In vitro* field collection techniques for *Eucalyptus* micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.75, p.233-240, 2003.

WATT, M. P.; BLAKEWAY, F. C.; TERMIGNONI, R.; JAIN, S. M.. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunnii*. In: JAIN, S. M; GUPTA, P. K.; NEWTON, R. J (Eds.). **Somatic Embryogenesis in Woody Plants**. Great Britain: Kluwer Academic Publishers, 1999. v.5, p.63-78.

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.

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.

ZOBEL, B. J. Clonal Forestry in the *Eucalyptus*. In: AHUJA, M. R.; LIBBY, W. J (Eds.). **Clonal Forestry II, Conservation and Application**. Berlin: Springer-Verlag, 1993, p.139-148.

## CAPÍTULO I

### **Substâncias antioxidantes no controle da oxidação em calos obtidos a partir de cotilédones e hipocótilos na micropropagação via embriogênese somática de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla***

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de substâncias antioxidantes no controle da oxidação fenólica, intensidade de calogênese e textura em calos de cotilédones e hipocótilos na micropropagação de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*. Foram avaliadas diferentes concentrações de L-cisteína (0, 50, 100, 150 e 200 mg L<sup>-1</sup>), sulfato de adenina (0, 20, 40 e 80 mg L<sup>-1</sup>), ácido cítrico (0, 100, 200 e 300 mg L<sup>-1</sup>), ácido ascórbico (0, 100, 200 e 300 mg L<sup>-1</sup>), Polivinilpirrolidona (0; 0,8; 1,2 e 1,6 g L<sup>-1</sup>), o efeito da adição de 10% de água de coco em meio de cultura utilizando PVP (0,8 g L<sup>-1</sup>), ácido cítrico (100 mg L<sup>-1</sup>) e ácido ascórbico (100 mg L<sup>-1</sup>), assim como a imersão de explantes em solução composta por 50 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico mais 75 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico por 1 minuto. O regulador de crescimento utilizado em todos os experimentos foi dicamba na concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup>. Os calos foram subcultivados a cada 30 dias e avaliado seu grau de oxidação. A oxidação fenólica e o escurecimento dos calos foram intensos principalmente após o primeiro mês de cultivo. A adição de antioxidantes e o subcultivo dos calos a cada 30 dias se mostraram ineficientes no controle da oxidação fenólica para *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*. A adição de 10% (v/v) de água de coco promoveu um aumento na intensidade de calejamento dos explantes, contudo, não apresentou efeito antioxidante, e a transferência dos calos para meio sem regulador de crescimento proporcionou um maior escurecimento dos explantes e do meio de cultura.

## 1. INTRODUÇÃO

A aplicação comercial da cultura de tecidos em espécies de interesse florestal tem aumentado continuamente, podendo ser citados exemplos satisfatórios para espécies como sequóia, eucalipto, pinus etc. e tem sido demonstrado que a micropropagação pode ser uma estratégia útil junto às técnicas convencionais de propagação vegetativa (Rodríguez et al., 2005).

Entre as alternativas apontadas para a otimização da clonagem e promissoras no processo de propagação vegetativa de material genético selecionado está o uso de sementes sintéticas, obtidas pela técnica de embriogênese somática. A embriogênese somática é uma técnica da 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 posterior conversão em plantas, passando por estádios semelhantes aos observados na embriogênese zigótica (Guerra et al., 1999). Uma vez obtidos, os embriões somáticos podem ser encapsulados em alginato para obtenção de sementes sintéticas, permitindo assim o armazenamento em baixas temperaturas e posterior cultivo de maneira semelhante à verdadeira (Guerra et al., 2001).

Além do uso para sementes sintéticas, a embriogênese somática pode ser usada para obtenção de plantas geneticamente transformadas, plantas poliplóides ou de híbridos somáticos, como também em programas de seleção de células e na criopreservação de germoplasma (Vicient e Martínez, 1998). Também como técnica de propagação, a embriogênese somática, em princípio, apresenta-se como ferramenta indicada para obtenção de mudas clonais por explorar ao máximo a juvenilidade, tendo sido reportada, na última década, a formação de embriões somáticos ou estruturas embriogênicas para um grande número de espécies, incluindo algumas espécies do gênero *Eucalyptus* (Muralidharan e Mascarenhas, 1987; Watt et al., 1991; TiboK et al., 1995; Termignoni et al., 1996; Bandyopadhyay et al., 1999; Arruda et al., 2000; Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002; Titon, 2005; Prakash e Gurumurthi, 2005).

Em adição às características que determinam o sucesso do cultivo *in vitro*, como o genótipo utilizado, ambiente físico, meio de cultura e reguladores de

crescimento, o desenvolvimento e a morfogênese são governados por propriedades intrínsecas aos tecidos utilizados como explantes (George, 1993). Algumas plantas cultivadas *in vitro* liberam no meio de cultura substâncias denominadas compostos fenólicos, os quais, em alguns casos, podem se apresentar em diferentes colorações e ser tóxicos aos explantes (Paiva et al., 2000), sendo a concentração destes compostos freqüentemente afetada por diversos fatores internos e externos (Lorenzo et al., 2001).

A produção excessiva de polifenóis, possivelmente pela ativação de reações de defesa, é um problema freqüentemente encontrado durante os estádios iniciais da cultura, resultando no escurecimento e eventual morte dos tecidos. Os polifenóis são comumente considerados substâncias inibidoras que devem ser evitadas ou eliminadas do ambiente de cultivo *in vitro*. Vários métodos de prevenção ao surgimento dos fenóis têm sido propostos, sendo o método mais amplamente utilizado o da transferência dos explantes para um novo meio. Contudo, o aumento do número de subcultivos resulta, em alguns casos, no acúmulo de mutação das células, podendo causar perdas na habilidade de as células afetadas sofrerem embriogênese (Pan e Van Staden, 1998).

Na propagação *in vitro* de *Eucalyptus*, a produção de substâncias fenólicas pelo explante em cultivo pode dificultar e até mesmo impedir os processos morfogênicos conduzindo o tecido à morte. Pinto et al. (2002) atribuíram ao acúmulo de compostos fenólicos uma das causas envolvidas na baixa freqüência de indução de embriogênese somática em *Eucalyptus globulus*.

O termo substância fenólica engloba grande variedade de compostos, todos eles apresentando um grupo hidroxila ligado a um anel aromático. Eles estão quase universalmente presentes nas plantas e são conhecidos por acumular-se em todas as partes do vegetal (Raven et al., 2001). O escurecimento dos explantes e sua subsequente morte, geralmente atribuído a substâncias fenólicas, são um dos principais problemas na iniciação de culturas *in vitro* de espécies lenhosas. Interações fenólicas expressas pelo escurecimento do explante podem conduzir o tecido à morte. Radicais livres de oxigênio podem ser gerados durante a excisão do material e resultar em aumento da atividade de enzimas polifenoloxidasas e peroxidases, que agem para superar os efeitos dos radicais oxidativos (Antony et al., 2004). Estas enzimas estão associadas a

mecanismos de injúria e a respostas a estresses ambientais como ferimentos. Essas respostas ao estresse envolvem a liberação de polifenóis do vacúolo como também a síntese de fenóis no citoplasma, com a morte celular estando correlacionada com elevados níveis de peroxidases (Tang et al., 2004).

Os agentes antioxidantes podem eficientemente melhorar a propagação de plantas pela redução no escurecimento dos tecidos e melhorar o crescimento das estruturas propagativas. Estes antioxidantes doam hidrogênio e podem também reagir com compostos que são derivados de injúrias mecânicas e estresses ambientais para formar compostos complexos estáveis (Tang et al., 2004). Na tentativa de reduzir ou eliminar a ação dos polifenóis produzidos durante o cultivo *in vitro*, diferentes substâncias denominadas antioxidantes têm sido adicionadas ao meio de cultura.

No presente trabalho, avaliou-se a eficiência das substâncias antioxidantes L-cisteína, sulfato de adenina, ácido cítrico, ácido ascórbico, PVP e água de coco com o intuito de conter a produção e liberação de substâncias fenólicas durante o cultivo de calos embriogênicos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*.

## **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, localizado no município de Viçosa, Minas Gerais.

Como material genético, foram utilizadas sementes de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urophylla* oriundas da área de produção de sementes da empresa International Paper do Brasil, localizada no município de Mogi Guaçu, São Paulo.

### **2.2. Obtenção dos explantes**

As sementes utilizadas no presente trabalho foram inicialmente lavadas em água corrente por cerca de um minuto e em seguida levadas à câmara de fluxo



laminar e desinfetadas com solução de álcool 70% (v/v) por 30 segundos e hipoclorito de sódio 5% (v/v) durante 15 minutos, sendo posteriormente enxaguadas seis vezes com água desionizada e autoclavada.

No processo de germinação das sementes, foi utilizado o meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), contendo metade da concentração dos sais e vitaminas, 50 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 1,5% (v/v) de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck®, tendo sido o pH ajustado para 5,7 ± 0,1 e autoclavado por 15 minutos.

As sementes foram transferidas para placas de Petri descartáveis estéreis (60 x 15 mm) contendo 15 ml de meio de cultura e vedadas com filme de PVC. Estas sementes foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2° C, fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro, com irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecidas por lâmpadas “luz do dia” branca fluorescentes e com potência de 20 Watts, por um período 10 dias, quando se dava a completa germinação das sementes.

Foram utilizados como fonte de explantes, segmentos de hipocótilos com cerca de 1,0 cm de comprimento e cotilédones totalmente expandidos, sendo estes dispostos com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

### **2.3. Indução de calos**

Na indução de calos em todos os experimentos, foi utilizado o meio de cultura composto pelos sais MS e vitaminas White (White, 1943), acrescido de 100 mg L<sup>-1</sup> de mio inositol, 3% de sacarose, 2,9 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (Sigma), 0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba e pH ajustado para 5,7 ± 1.

As culturas foram mantidas no escuro em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2° C. Os calos formados nos diferentes tratamentos foram subcultivados para novo meio de cultura aos 30 dias, quando foram avaliados o grau de oxidação dos explantes, a textura do calo, a intensidade de calejamento e a emissão de raízes. Uma nova avaliação do nível de oxidação foi feita aos 60 dias.

Para o presente estudo foram utilizadas placas de Petri descartáveis contendo 15 ml de meio de cultura com 10 explantes por placa, e, dependendo do experimento, foram utilizadas 5 e 10 placas por tratamento. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado.

### **2.3.1. Experimento 1— Controle da oxidação em calos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* pela adição de diferentes concentrações de L-cisteína, sulfato de adenina, ácido cítrico, ácido ascórbico e PVP (polivinilpirrolidona).**

Os explantes foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura básico variando a concentração de L-cisteína (0; 50; 100; 150 e 200 mg L<sup>-1</sup>) e sulfato de adenina (0, 20, 40 e 80 mg L<sup>-1</sup>) para *Eucalyptus grandis*; e de ácido cítrico (0; 100; 200 e 300 mg L<sup>-1</sup>), ácido ascórbico (0; 100; 200 e 300 mg L<sup>-1</sup>) e PVP (0; 0,8; 1,2 e 1,6 g L<sup>-1</sup>) para *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*. Foram utilizadas 5 placas por tratamento, respectivamente, com 10 explantes de hipocótilo e 10 de cotilédones em cada placa.

### **2.3.2. Experimento 2— Controle da oxidação em calos de *Eucalyptus grandis* pela imersão de explantes cotiledonares em solução antioxidante.**

Cotilédones obtidos de sementes de *Eucalyptus grandis* germinadas *in vitro* foram excisados e imersos em solução antioxidante filtro-estéril composta por 50 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico mais 75 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico por 1 minuto e, em seguida, inoculados em meio de cultura básico e mantidos no escuro em sala de crescimento, à temperatura de 27 ± 2°C por 20 dias. Após este período, os calos formados foram novamente submersos na referida solução antioxidante e transferidos para os seguintes tratamentos: 3 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 50 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico + 75 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 10 µM de STS (til sulfato de prata), 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico e sem antioxidante, permanecendo nas mesmas condições de incubação. Após 30 dias de cultivo foi realizada uma avaliação dos níveis de oxidação fenólica. Foram utilizadas 5 placas por tratamento com 10 explantes de cotilédones em cada placa.

### **2.3.3. Experimento 3— Água de coco (10% v/v) em meio de cultura contendo PVP, ácido cítrico e ácido ascórbico no controle da oxidação de calos de *Eucalyptus urophylla*.**

Avaliou-se o efeito da adição de 10% (v/v) de água de coco em calos oriundos de cotilédones e hipocótilos de *E. urophylla*, obtidos em meio de cultura básico contendo os seguintes antioxidantes: 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 100

mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico e 0,8 g L<sup>-1</sup> de PVP. Foram utilizadas 10 placas por tratamento com seus respectivos 10 explantes de hipocótilo e 10 de cotilédones em cada placa. Aos 30 dias foram realizadas avaliações quanto à intensidade de calejamento, textura dos calos, presença de raízes e níveis de oxidação fenólica. Os calos foram em seguida transferidos para meio JADS (Correia et al., 1995) com regulador (0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba) e sem regulador; e realizada nova avaliação aos 60 dias. Nesta etapa, foram utilizadas 5 placas por tratamento com 10 explantes de hipocótilo e 10 de cotilédones em cada placa.

#### **2.4. Condução e avaliações experimentais**

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o inteiramente casualizado, utilizando-se 5 repetições por tratamento e 10 explantes por repetição, exceto para o experimento com água de coco, em que foram utilizadas 10 repetições na primeira etapa e 5 repetições na segunda.

O desenvolvimento dos calos foi acompanhado periodicamente e avaliados a intensidade de calejamento, textura dos calos e níveis de oxidação fenólica.

Para as avaliações visuais, foi utilizada uma lupa binocular com aumento de 10 vezes, enquanto as avaliações de intensidade de calejamento foram feitas por comparação, sendo discriminadas como baixa, média e alta.

Para avaliação da textura, os calos foram classificados como friáveis (células frouxamente ligadas), compactos (células firmemente ligadas) e texturas intermediárias, classificadas como semifriáveis e semicompactas.

Com relação aos níveis de oxidação: baixo se refere ao calo com coloração amarelo-escura tendendo a um marrom claro; nível médio ao calo com maior parte da área escurecida ou apresentando uma coloração marrom mais escura; e alto ao calo totalmente escurecido.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Independentemente do experimento realizado com diferentes substâncias antioxidantes, observou-se alto índice de calejamento nos explantes obtidos em meio básico, utilizando-se 0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba. Os calos formados, tanto nos explantes cotiledonares, como nos de hipocótilos, apresentavam coloração

amarelo-clara, e os calos compactos obtidos de hipocótilos tendiam a apresentar aspecto aquoso e, embora calejassem pouco, expandiam-se chegando a atingir duas vezes seu comprimento original. Esta característica pode ser observada nos diferentes experimentos com antioxidantes. O início do calejamento se dava na face abaxial dos explantes em contato com o meio de cultura e, ao final de 20 dias, estavam totalmente calejados.

### **3.1. Controle da oxidação em calos de *Eucalyptus grandis* pela adição de L-cisteína.**

Os explantes cultivados em meio com diferentes concentrações de L-cisteína apresentaram 100% de calejamento em todos os tratamentos, exceto para o tratamento testemunha (0 mg L<sup>-1</sup> de L-cisteína) em hipocótilo, que foi de 98%. A intensidade de calejamento observada foi de baixa a alta para os tratamentos de 0; 100; 150 e 200 mg L<sup>-1</sup>, sendo observados 2% de intensidade alta no tratamento de 50 mg L<sup>-1</sup>, tanto para hipocótilo, como para cotilédone (Figura 1).

Calos friáveis puderam ser observados com maior intensidade no tratamento sem antioxidante em cotilédones, predominando a textura semifriável para este tipo de explante, tendo havido no hipocótilo predominância de calos compactos e semicompactos (Figura 2).

Embora a oxidação tenha sido observada em todos os tratamentos aos 30 dias de cultivo, ela ocorreu em sua maioria nos níveis baixo e médio, com maior porcentagem de calos com baixa oxidação para os dois tipos de explantes utilizados, mas não apresentando diferença significativa entre os tratamentos pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Problemas decorridos do acúmulo de compostos fenólicos para *Eucalyptus* também foram citados por Nugent et al. (2001), na obtenção de embriões somáticos em *Eucalyptus globulus*, em que calos que formaram embriões somáticos tendiam a acumular compostos fenólicos com poucas semanas de iniciação.

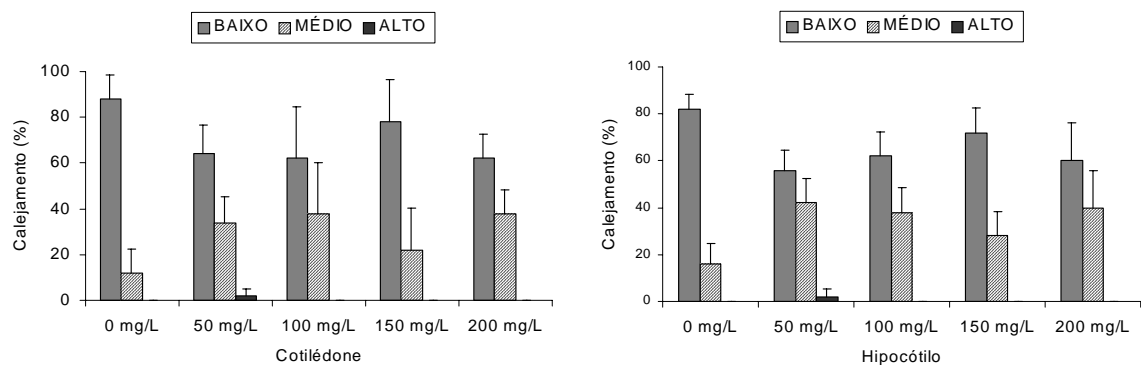


Figura 1- Intensidade de caleijamento em cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* aos 30 dias de cultivo em diferentes concentrações de L-cisteína. As barras indicam o desvio das médias.

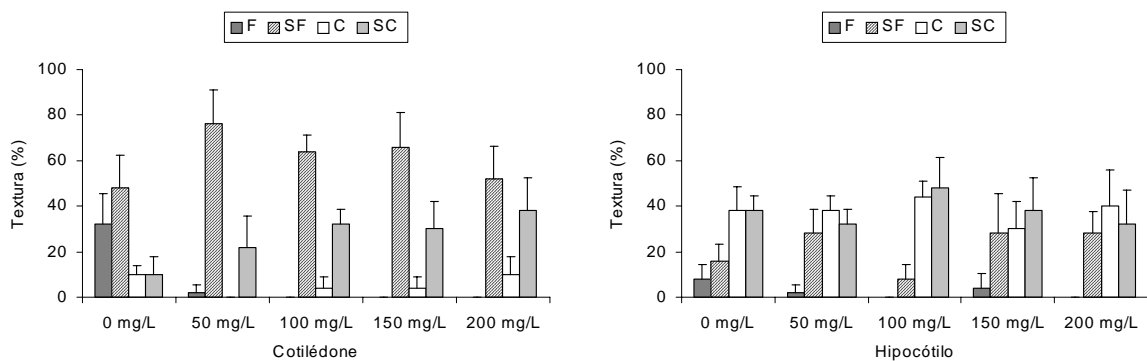


Figura 2- Textura dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* aos 30 dias de cultivo em diferentes concentrações de L-cisteína, sendo F (friável), SF (semifriável), C (compacto) e SC (semicompacto). As barras indicam o desvio das médias.

No presente trabalho, pôde-se observar uma porcentagem maior de calos no nível baixo de oxidação nos tratamentos de 50 mg L<sup>-1</sup> para cotilédones e 150 mg L<sup>-1</sup> para hipocótilos (Figura 3).

Após 60 dias de cultivo, todos os explantes apresentaram 100% de oxidação. Para os calos obtidos de cotilédones, a concentração de 200 mg L<sup>-1</sup> proporcionou a menor porcentagem de calos no nível alto e a maior porcentagem de calos no nível baixo, quando comparado com os demais tratamentos, porém, sem diferença significativa. Para o hipocótilo, as concentrações de 50 e 150 mg L<sup>-1</sup> foram mais efetivas no controle da oxidação, com menor porcentagem de calos

com nível alto, quando comparado com a testemunha (sem antioxidante), porém, não diferindo de 100 e 200 mg L<sup>-1</sup> pelo teste Tukey a de 5% de probabilidade.

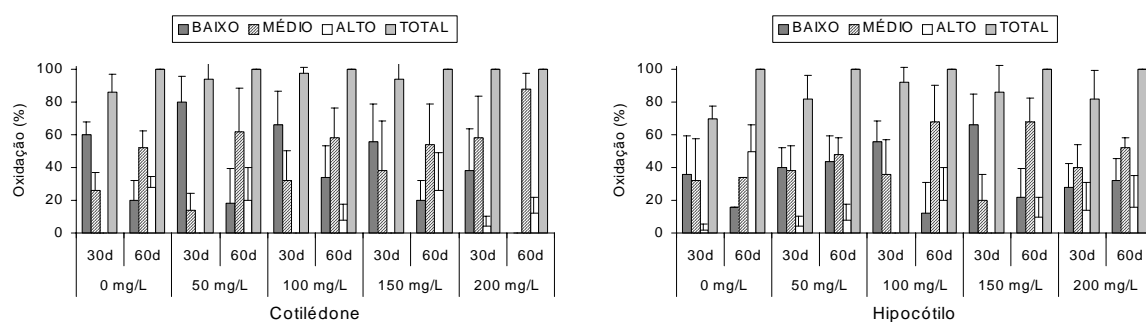


Figura 3- Nível de oxidação dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* aos 30 e 60 dias (30d e 60d) de cultivo nos diferentes tratamentos de L-cisteína. As barras indicam o desvio das médias.

Lorenzo et al. (2001), na formação de gemas adventícias em cana de açúcar, demonstraram que, embora a L-cisteína tenha promovido redução de compostos fenólicos no meio de cultura, ela reduziu a formação de gemas. No presente estudo, a adição de L-cisteína ao meio de cultivo não promoveu mudanças na resposta morfológica observada, quando comparado com o tratamento sem a referida substância, não tendo evitado, contudo, a liberação e o acúmulo de compostos fenólicos.

### 3.2. Controle da oxidação em calos de *Eucalyptus grandis* pela adição de diferentes concentrações de sulfato de adenina.

A intensidade de calejamento observada nos diferentes tratamentos foi em sua maioria baixa para os dois tipos de explantes utilizados, não tendo sido observado calejamento na intensidade alta (Figura 4).

Calos friáveis foram observados nos tratamentos de 0 e 20 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina para cotilédones e 40 mg L<sup>-1</sup> para hipocótilo, contudo, em pequena porcentagem. A textura predominante dos calos obtidos de cotilédones foi o semifriável, sendo que para calos obtidos de hipocótilos predominaram os calos compactos e semcompactos (Figura 5).

Segundo Dhar e Upreti (1999), aliado a características antioxidantes, o sulfato de adenina pode estimular o crescimento celular e melhorar a morfogênese por proporcionar uma fonte de nitrogênio disponível para a célula, podendo geralmente ser disponibilizado mais rapidamente que os nitrogênios orgânicos. Contudo, no presente trabalho, a adição desta substância não influenciou na resposta morfogênica de calos obtidos de cotilédones e hipocótilos de *E. grandis*.

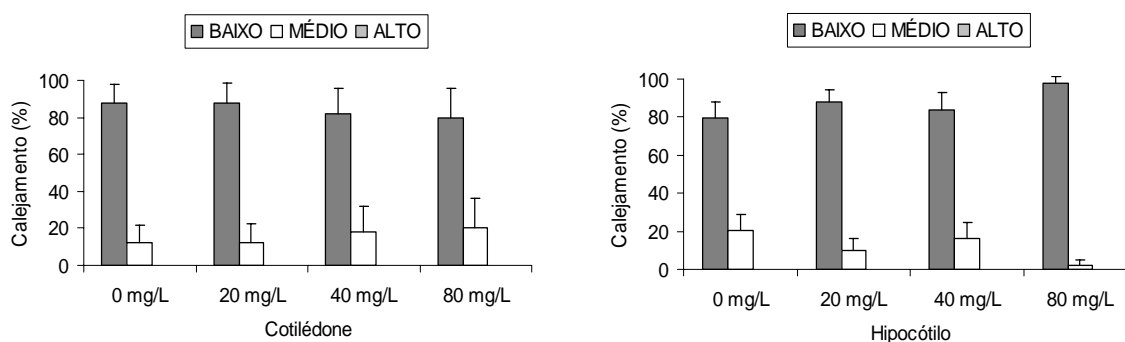


Figura 4- Intensidade de calejamento em cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* aos 30 dias de cultivo em diferentes concentrações de sulfato de adenina. As barras indicam o desvio das médias.

Foram observados os três níveis de oxidação para calos oriundos de explante cotiledonar aos 30 dias de cultivo. Embora as médias obtidas nos diferentes tratamentos para este tipo de explante não diferissem estatisticamente, o controle sem antioxidante apresentou o melhor resultado seguido da concentração de 40 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina aos 30 dias de cultivo. Aos 60 dias de cultivo, a porcentagem de calos com alta taxa de oxidação se mostrou elevada, sendo os melhores resultados de 20 e 40 mg L<sup>-1</sup> (Figura 6).

Para os calos obtidos de hipocótilos, não foi observado nível alto de oxidação aos 30 dias de cultivo, sendo que a concentração de 80 mg L<sup>-1</sup> apresentou o pior resultado nesta data, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Aos 60 dias de cultivo, os melhores resultados foram obtidos para o controle, com as menores médias de calos no nível alto de oxidação, que se apresentou superior aos tratamentos de 20 e 40 mg L<sup>-1</sup>, sendo que o tratamento de 80 mg L<sup>-1</sup> apresentou o pior resultado.

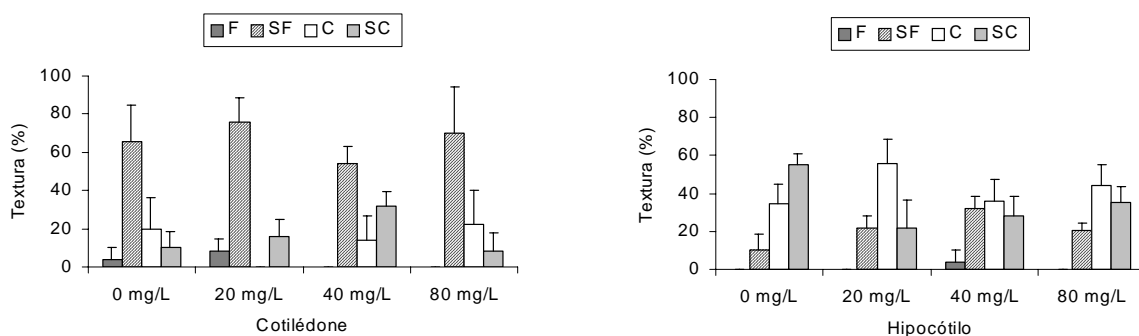


Figura 5- Textura dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* aos 30 dias de cultivo em diferentes concentrações de sulfato de adenina, sendo F (friável), SF (semifriável), C (compacto) e SC (semicompacto). As barras indicam o desvio das médias.

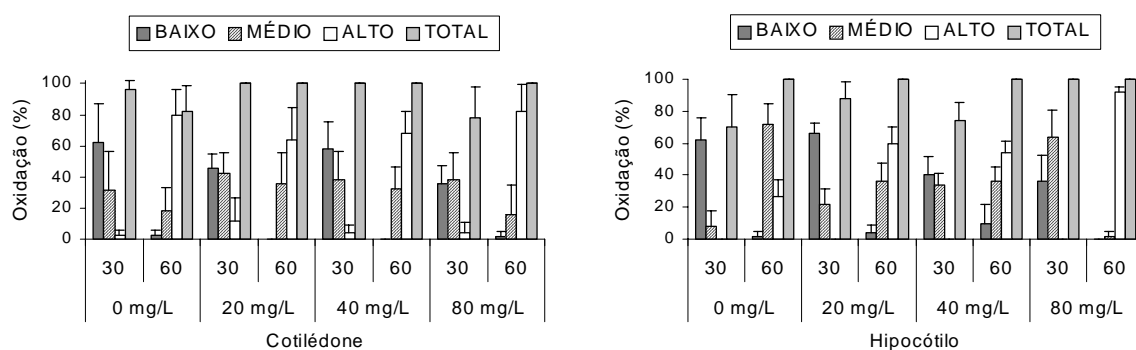


Figura 6- Nível de oxidação dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* aos 30 e 60 dias (30d e 60d) de cultivo nos diferentes tratamentos de sulfato de adenina. As barras indicam o desvio das médias.

O escurecimento de explantes nodais de lianas (*Bauhinia vahlii*) pela produção de compostos fenólicos no estabelecimento de culturas *in vitro* desta espécie foi o maior obstáculo enfrentado por Dhar e Upreti (1999), tendo a adição de 100 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina ao meio de cultivo proporcionado um aumento no índice de sobrevivência dos explantes.

No presente trabalho, a adição de diferentes concentrações de sulfato de adenina não proporcionou uma diminuição nos níveis de oxidação, tendo sido os melhores resultados obtidos aqueles observados nos tratamentos sem sulfato de adenina.



### 3.3. Controle da oxidação em calos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* pela adição de diferentes concentrações de ácido cítrico.

O calejamento experimentado pelos explantes de hipocótilos e cotilédones obtidos nos diferentes tratamentos com ácido cítrico foi em sua maioria de baixa intensidade para *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis* (Figura 7).

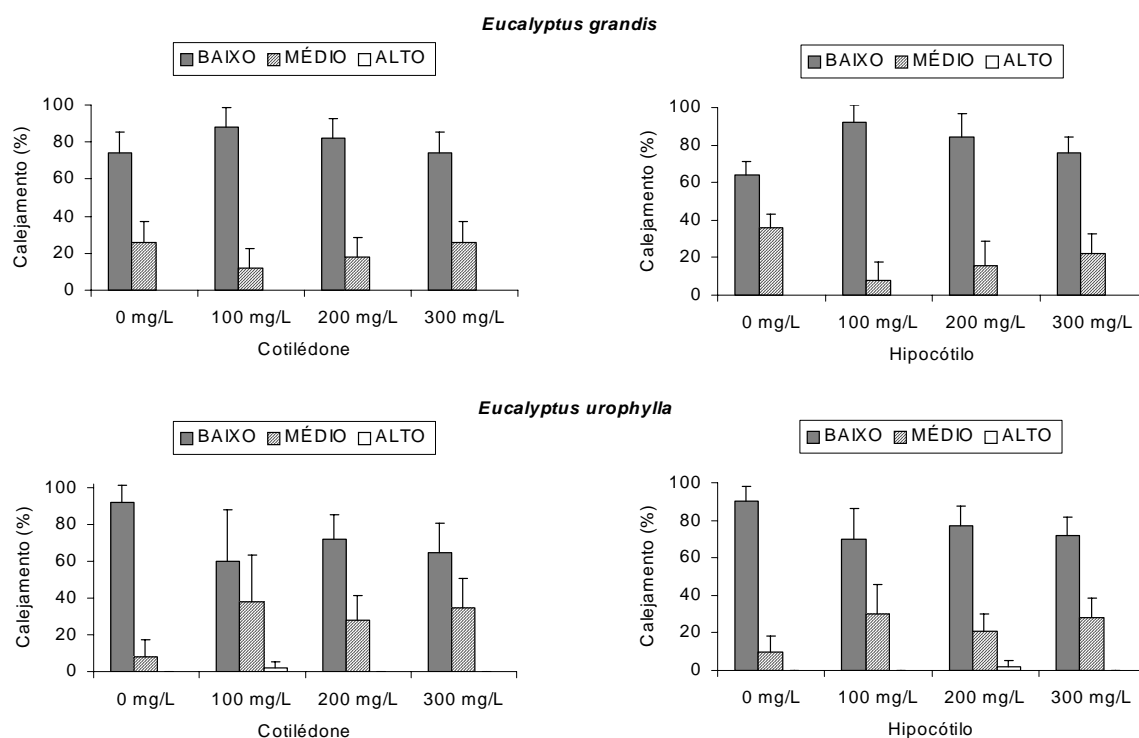


Figura 7- Intensidade de calejamento em cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* aos 30 dias de cultivo em diferentes concentrações de ácido cítrico. As barras indicam o desvio das médias.

Tanto para *Eucalyptus urophylla*, como *E. grandis*, a testemunha sem ácido cítrico foi a que apresentou maior porcentagem de calos compactos em explantes cotiledonares, quando comparada com os demais tratamentos, tendo sido, contudo, superior às texturas semifriável e semicomcompacta somente para *E. urophylla*. Calos obtidos de hipocótilos de *E. urophylla* também apresentaram porcentagens maiores de calos compactos, quando comparados com *E. grandis* (Figura 8).

Para explantes cotiledonares de *Eucalyptus urophylla*, pôde-se observar, aos 30 dias de cultivo, alta taxa de calos apresentando nível médio de oxidação, sendo nesta data o melhor tratamento para controle da oxidação, obtido na

concentração de 300 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico para as duas espécies de *Eucalyptus*. No entanto, aos 60 dias de cultivo, calos de *E. urophylla* apresentaram 100% de alto nível de oxidação, exceto para o controle sem antioxidante. Calos de *E. grandis* aos 60 dias de cultivo apresentaram melhor resultado de controle da oxidação com a concentração de 300 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, embora não tenha apresentado diferença estatística com os demais tratamentos (Figura 9).

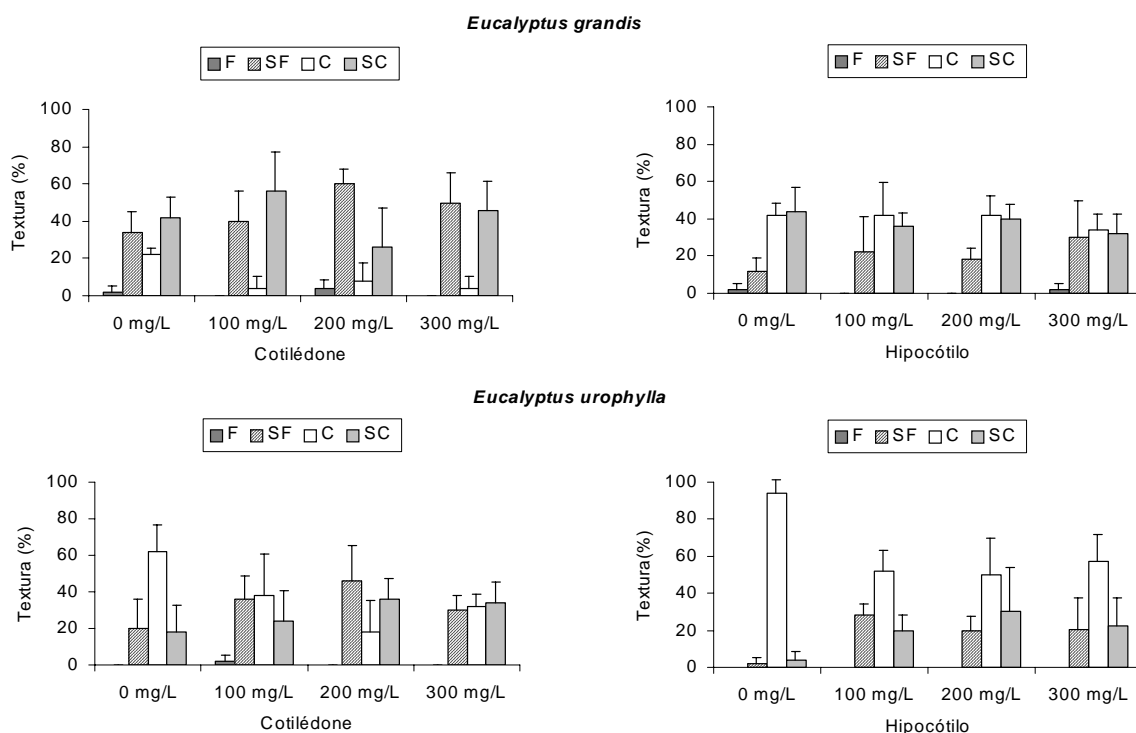


Figura 8- Textura dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* em diferentes concentrações de ácido cítrico aos 30 dias de cultivo, sendo F (friável), SF (semifriável), C (compacto) e SC (semicompacto). As barras indicam o desvio das médias.

As três concentrações de ácido cítrico utilizadas mostraram ser mais efetivas no controle da oxidação para calos de hipocótilos de *E. urophylla*, quando comparadas à testemunha sem antioxidante, com maiores percentagens de calos na classe de nível baixo de oxidação aos 30 dias de cultivo. Aos 60 dias, embora não tenha havido diferença significativa entre os tratamentos, as menores percentagens de calos com oxidação na classe alta foram encontradas na testemunha. Para calos de hipocótilo de *E. grandis*, a concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> apresentou a maior percentagem de calos com baixo nível de oxidação aos 30

dias de cultivo, porém, não diferindo significativamente dos demais tratamentos. Todavia, aos 60 dias de cultivo, a concentração de 300 mg L<sup>-1</sup> foi mais efetiva no controle da oxidação.

A utilização de ácido cítrico na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> na micropropagação de *Gymnema sylvestre* promoveu o controle da oxidação fenólica, além de proporcionar um aumento na produção de gemas normais e saudáveis, assim como sua melhor diferenciação (Komalavalli e Rao, 2000).

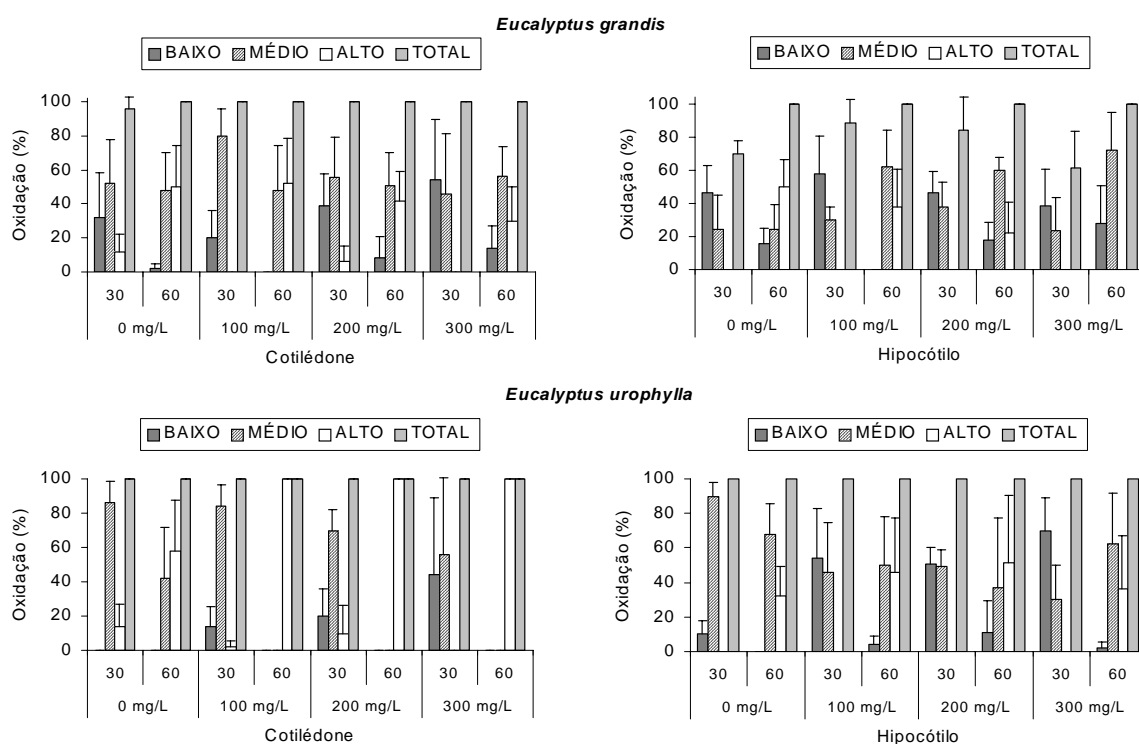


Figura 9- Nível de oxidação dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* aos 30 e 60 dias (30d e 60d) de cultivo nos diferentes tratamentos de ácido cítrico. As barras indicam o desvio das médias.

Segundo Antony et al. (2004), o ácido cítrico é um antioxidante que pode ser inicialmente benéfico na redução da oxidação fenólica, mas sua presença em altos níveis pode interferir no sistema de transporte de elétrons, perturbando o metabolismo de energia durante o crescimento.

No presente estudo, aos 30 dias de cultivo, a utilização de ácido cítrico na concentração de 300 mg L<sup>-1</sup> apresentou bons resultados no controle da oxidação de calos cotiledonares nas duas espécies estudadas, permanecendo eficiente aos 60 dias de cultivo somente para *E. grandis*. Para calos oriundos de hipocótilo em

*E. urophylla*, as três concentrações utilizadas mostraram ser mais efetivas no controle da oxidação aos 30 dias de cultivo, quando comparadas com a testemunha.

#### **3.4. Controle da oxidação em calos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* pela adição de diferentes concentrações de ácido ascórbico.**

Assim como nos experimentos anteriores, a intensidade de calejamento foi baixa na maioria dos tratamentos para ambos os explantes e espécies, com exceção dos tratamentos de 100 e 200 mg L<sup>-1</sup> para explante cotiledonar em *E. grandis* que tiveram, respectivamente, as porcentagens de 58 e 61% de calos com intensidade média de calejamento.

Para os explantes cotiledonares, pôde-se observar uma predominância de calos semifriáveis, com baixa porcentagem de calos compactos, exceto para o tratamento de 300 mg L<sup>-1</sup> em *E. urophylla*, sendo que para hipocótilos predominou a textura compacta (Figura 10).

Com relação aos níveis de oxidação, aos 30 dias de cultivo para explantes cotiledonares predominou o nível médio em *E. urophylla*, em que o melhor resultado obtido foi com 100 mg L<sup>-1</sup>, com as porcentagens de 46 e 54% de intensidades baixa e média, respectivamente. Para *E. grandis*, o tratamento testemunha, sem antioxidante, proporcionou o melhor resultado aos 30 dias de cultivo, porém, sem diferença significativa com relação aos demais tratamentos (Figura 11). Aos 60 dias de cultivo, embora não tenha havido diferença estatística entre os tratamentos para *E. grandis*, a testemunha proporcionou o melhor resultado com a maior porcentagem de calos no nível baixo, quando comparada esta mesma variável para os demais tratamentos. Em *E. urophylla*, contudo, a concentração de 300 mg L<sup>-1</sup> foi mais eficaz em conter a oxidação, apresentando as menores porcentagens de calos no nível alto, sendo estatisticamente superior à testemunha.

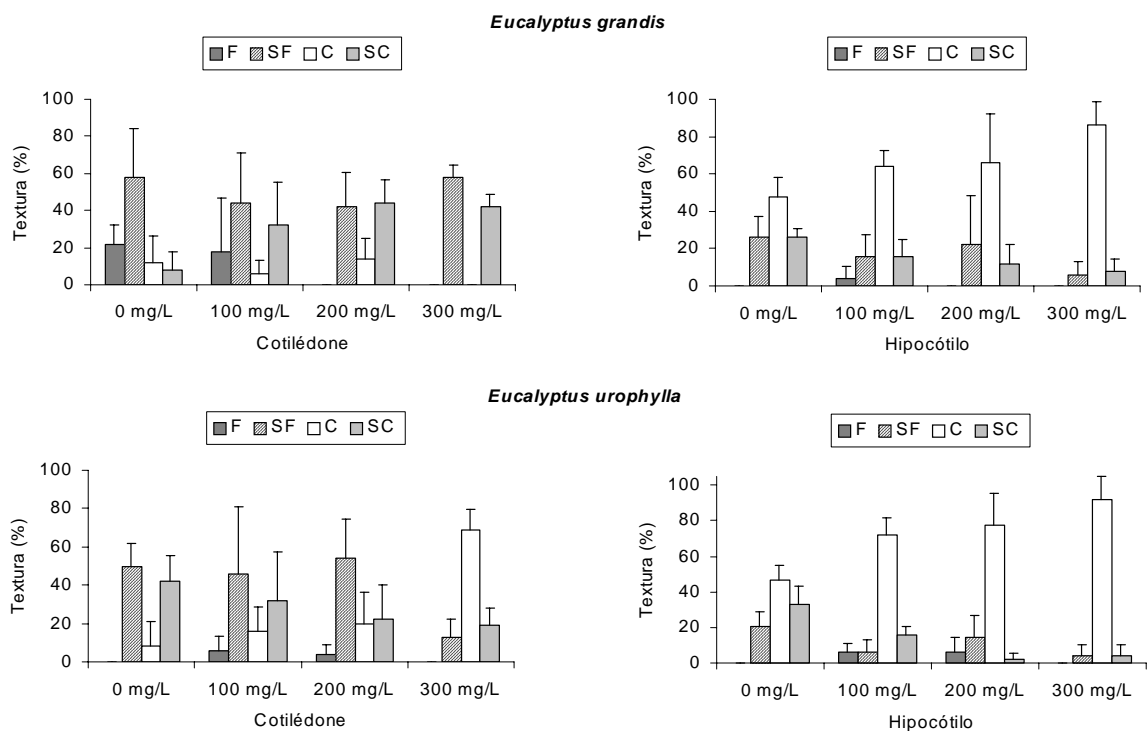


Figura 10- Textura dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* aos 30 dias de cultivo, nos diferentes tratamentos com ácido ascórbico, sendo F (friável), SF (semifriável), C (compacto) e SC (semicompacto). As barras indicam o desvio das médias.

Para calos obtidos de hipocótilos, aos 30 dias de cultivo para *E. urophylla*, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, com o controle apresentando as maiores porcentagens de calos com nível baixo de oxidação. Em calos de *E. grandis*, os tratamentos testemunha e 100 mg L<sup>-1</sup> apresentaram as maiores porcentagens de calos no nível baixo de oxidação, tendo o tratamento de 100 mg L<sup>-1</sup> sido o mais eficaz para o controle de oxidação aos 30 dias de cultivo.

Os níveis de oxidação observados aos 60 dias de cultivo mostraram ser os tratamentos de 0 e 100 mg L<sup>-1</sup> mais eficazes no controle da oxidação, com a testemunha sem antioxidante apresentando as menores taxas de calos no nível alto de oxidação para as duas espécies de *Eucalyptus* estudadas.

O cultivo *in vitro* de espécies de *Acacia* manifesta um escurecimento do meio de cultura e um prejuízo à micropropagação. Os compostos polivinilpirrolidona (PVP), ácido ascórbico, ácido cítrico e carvão ativado são comumente utilizados como antioxidantes e adsorventes na prevenção do escurecimento em *Acacia auriculiformis*, *A. catechu* e *A. sinuata*. Dos compostos

citados acima, o ácido ascórbico na concentração de 567,7  $\mu\text{M}$  tem sido o mais eficaz, sustentando a proliferação de gemas axilares e prevenindo o escurecimento do meio de cultura, ao contrário dos ácido cítrico e PVP, menos eficientes no controle da oxidação em *A. sinuata* (Vengadesan et al., 2002).

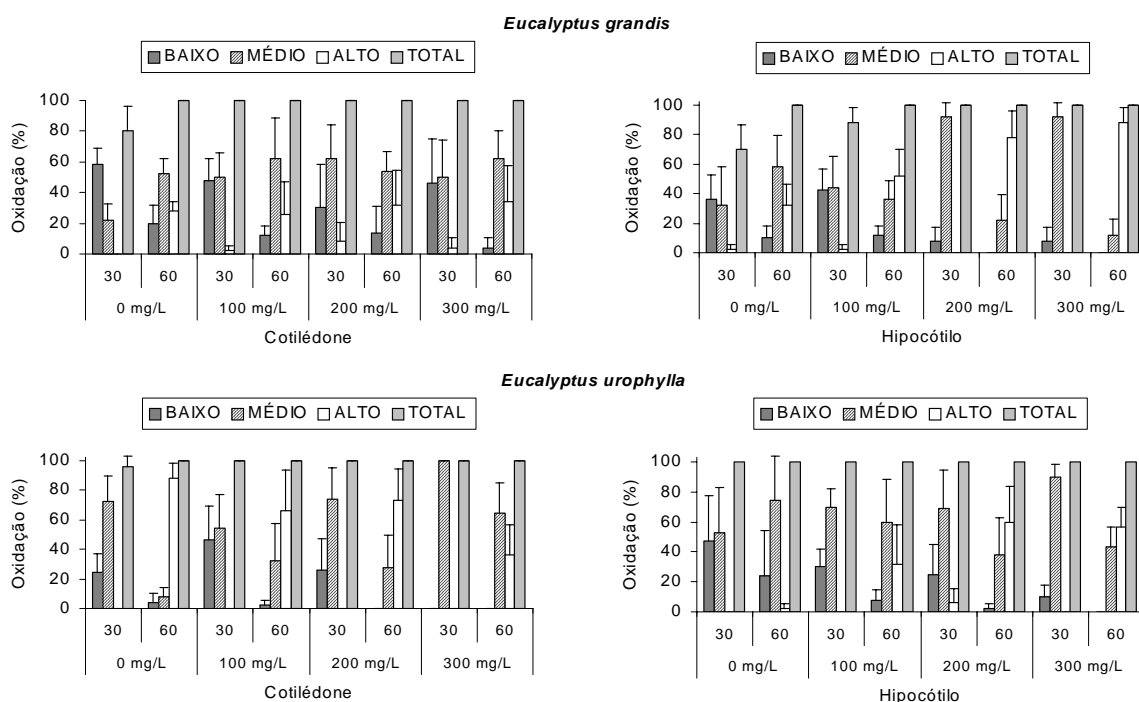


Figura 11- Nível de oxidação dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* aos 30 e 60 dias (30d e 60d) de cultivo nos diferentes tratamentos com ácido ascórbico. As barras indicam o desvio das médias.

Em explante cotiledonar de *E. urophylla*, o ácido ascórbico na concentração de 300 mg L<sup>-1</sup> mostrou-se eficaz em conter a oxidação fenólica aos 60 dias de cultivo. Melo et al. (2001) observaram que o ácido ascórbico foi a substância mais eficiente no controle da oxidação e proporcionou as maiores porcentagens de germinação em embriões zigóticos de guarirrobeira. No presente estudo, aos 60 dias de cultivo para explante obtido de hipocótilo nas duas espécies estudadas, as menores taxas de oxidação foram observadas em calos cultivados em meio sem adição de ácido ascórbico, não tendo a referida substância influenciado de forma positiva no controle da oxidação fenólica.

### 3.5. Controle da oxidação em calos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* pela adição de diferentes concentrações de Polivinilpirrolidone (PVP).

As diferentes concentrações de PVP utilizadas no presente estudo para os tipos de explantes e espécies de *Eucalyptus* analisados não influenciaram a calogênese, com as maiores porcentagens no nível baixo de calejamento (Figura 12).

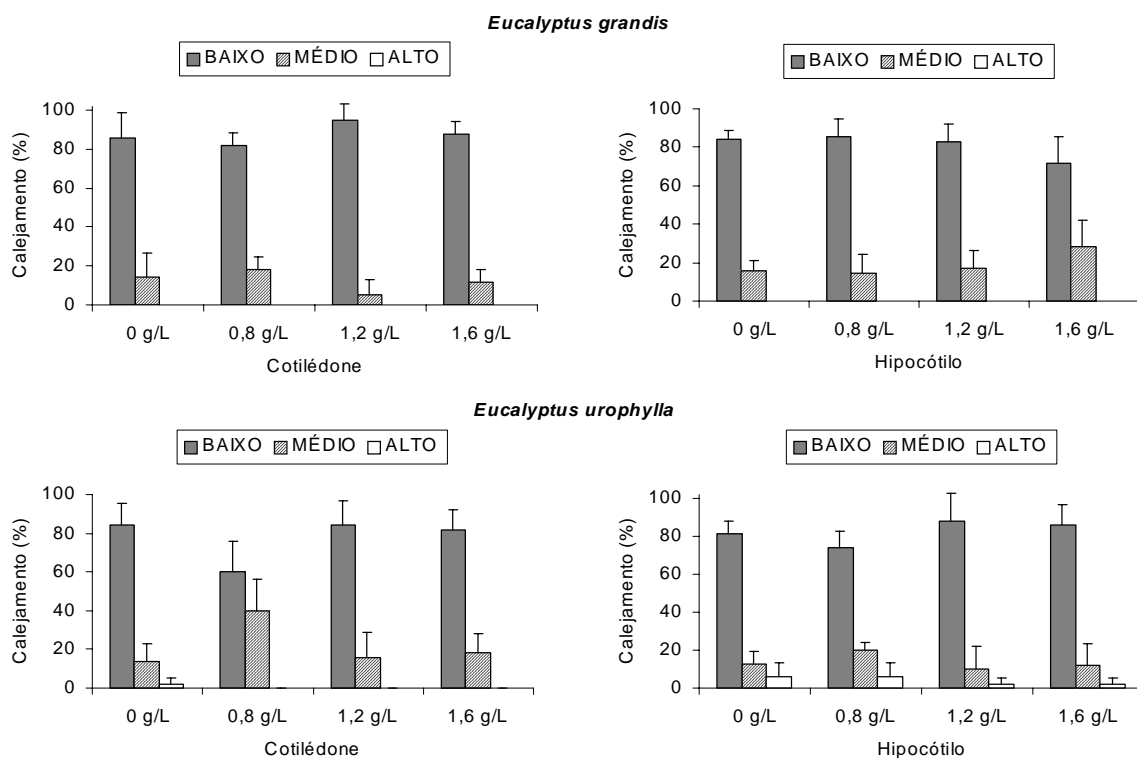


Figura 12- Porcentual de calejamento em cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* aos 30 dias de cultivo, nos diferentes tratamentos com PVP. As barras indicam o desvio das medis.

Em calos cotiledonares de *E. grandis*, as texturas predominantes foram a friável e a semifriável, enquanto em calos cotiledonares de *E. urophylla*, as texturas predominantes foram a semifriável e a semicompacta. Em calos oriundos de hipocótilo, observou-se uma porcentagem maior de calos compactos em relação aos calos cotiledonares (Figura 13).

Os níveis de oxidação dos calos formados em explantes cotiledonares e de hipocótilo das duas espécies de *Eucalyptus* estudadas aos 30 dias de cultura não diferiram estatisticamente. Pôde-se observar, contudo, em calos cotiledonares de

*E. urophylla* formados em 0,8 g L<sup>-1</sup> de PVP e em 1,6 g L<sup>-1</sup> de PVP para *E. grandis*, uma porcentagem maior de calos com baixo nível de oxidação (Figura 14).

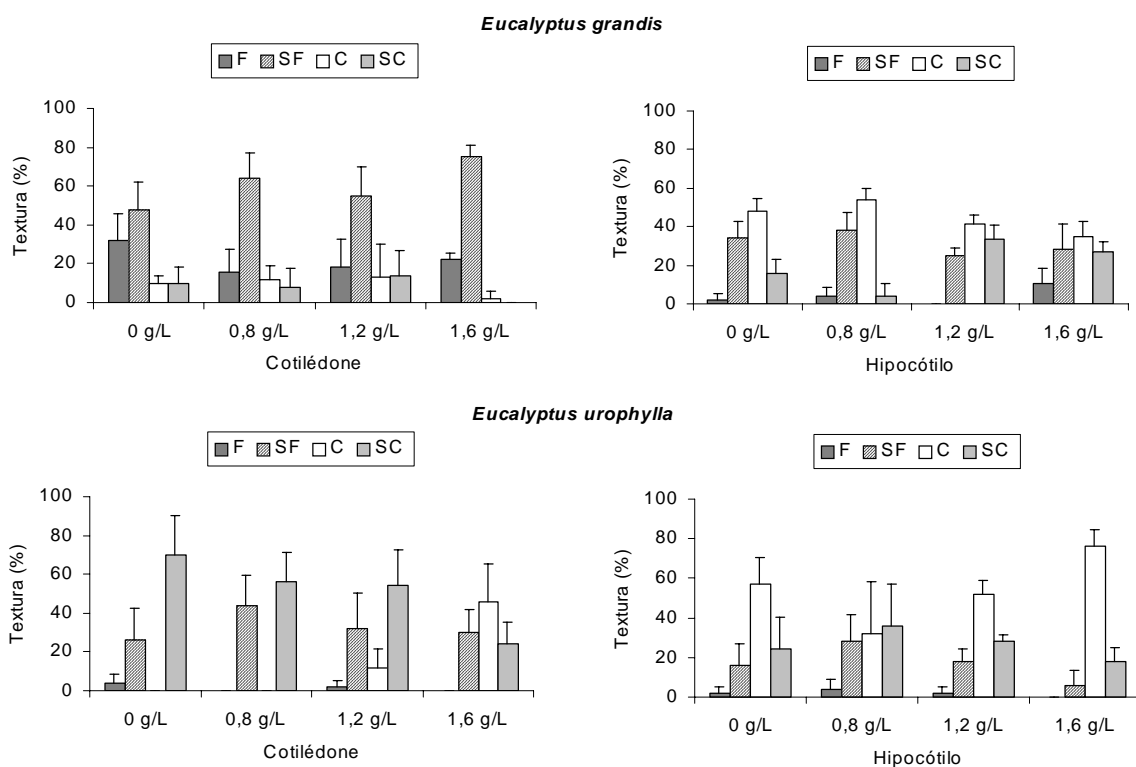


Figura 13- Textura dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* aos 30 dias de cultivo nos diferentes tratamentos com PVP, sendo F (friável), SF (semifriável), C (compacto) e SC (semicompacto). As barras indicam o desvio das médias.

Para calos provenientes de hipocótilo, aos 30 dias de cultivo, as maiores porcentagens de calos no nível baixo de oxidação foram alcançadas com 0,8 g L<sup>-1</sup> de PVP em *E. urophylla* e 0,0 g L<sup>-1</sup> para *E. grandis*, com estes tratamentos apresentando a menor porcentagem de explantes totais oxidados. Aos 60 dias de cultivo, para *E. urophylla*, os tratamentos não apresentaram diferença quanto ao nível de oxidação, podendo-se observar que na concentração de 0,8 mg L<sup>-1</sup> de PVP os calos apresentaram as maiores porcentagens no nível baixo e as menores no nível alto, quando comparados os diferentes tratamentos. Em *E. grandis*, as maiores porcentagens de calos com níveis baixo e médio de oxidação puderam ser observados nos tratamentos com 1,6 g L<sup>-1</sup> de PVP e na testemunha sem antioxidante.



Segundo Pan e Van Staden (1998), a incorporação de compostos como PVP e carvão ativado ao meio de cultura pode amenizar o problema da oxidação, prevenindo o escurecimento do explante em algumas espécies pela adsorção dos compostos fenólicos e inativação das polifenoloxidasas e peroxidases. Na produção de gemas axilares de macieira, a utilização de 1 g L<sup>-1</sup> de PVP no meio de cultura mostrou ser benéfica ao estabelecimento dos explantes, quando comparado com o controle sem antioxidante, impedindo a liberação dos compostos fenólicos, melhorando a cor e a textura dos explantes e aumentando sua porcentagem de sobrevivência (Modgil et al., 1999).

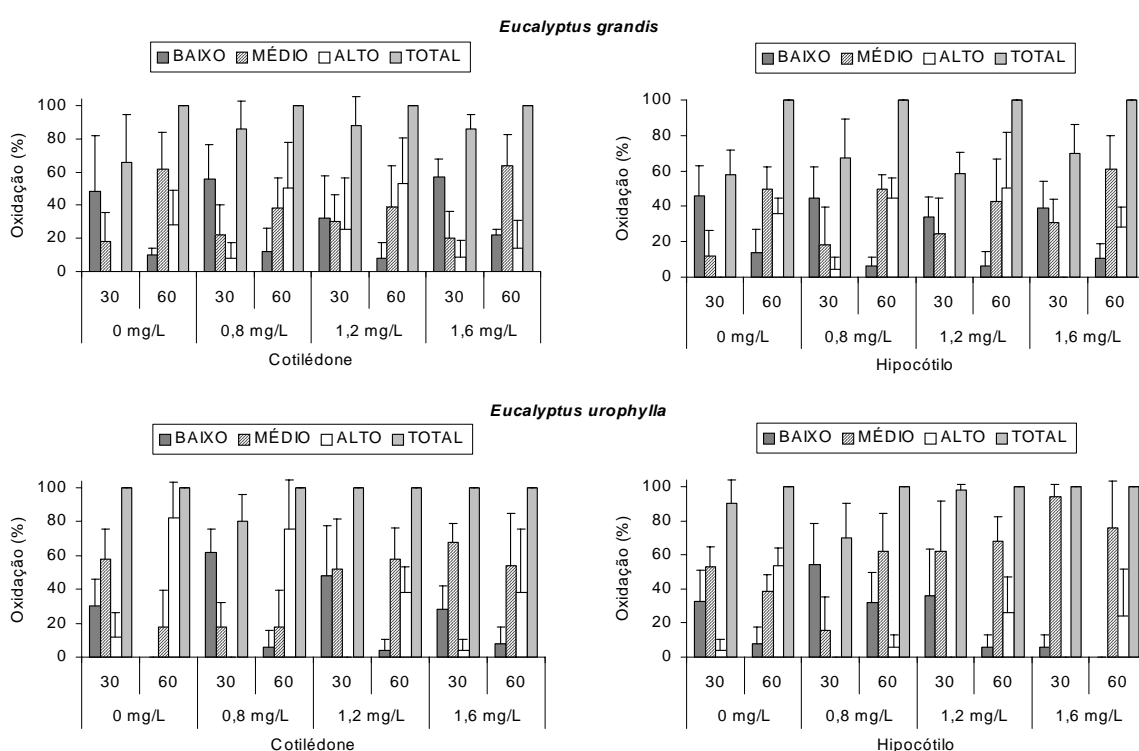


Figura 14- Nível de oxidação dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* aos 30 e 60 dias (30d e 60d) de cultivo nos diferentes tratamentos com PVP. As barras indicam o desvio das médias.

Bandyopadhyay et al. (1999), em trabalhos de organogênese em *Eucalyptus nitens* e *Eucalyptus globulus*, não observaram nenhum efeito positivo de PVP (0,1 – 1,0% p/v) quando este foi adicionado ao meio de cultura. A adição de PVP na micropropagação de *Gymnema sylvestre* no trabalho de Komalavalli e Rao (2000) reduziu o número de gemas formadas por explante, provavelmente

devido à adsorção de componentes essenciais que acompanham a adsorção de fatores inibitórios.

No presente estudo, a adição de PVP não promoveu a redução da oxidação fenólica, resultado que corrobora aqueles encontrados por Titon (2005), em que não foi observada redução da oxidação fenólica em calos formados de explantes juvenis de *Eucalyptus grandis* com a adição de PVP.

### **3.6. Controle da oxidação em calos de *Eucalyptus grandis* pela imersão de explantes cotiledonares em solução antioxidante.**

A porcentagem de oxidação de calos cotiledonares de *E. grandis* variou em função do tipo de antioxidante utilizado (Figura 15). O melhor resultado de controle da oxidação, aos 50 dias de cultivo, foi alcançado com a concentração de 10  $\mu\text{M}$  de STS. Com exceção do tratamento com carvão em que não foram observados calos com nível baixo de oxidação, nos demais tratamentos não houve diferença significativa neste nível de oxidação. O tratamento com carvão proporcionou os piores resultados com 100% dos explantes exibindo alto nível de oxidação aos 50 dias de cultivo, com o tratamento com STS proporcionando as menores taxas de oxidação aos 50 dias de cultivo.

A prática de imersão dos explantes em solução antioxidante, como forma de minimizar a oxidação fenólica, foi utilizada por Dhar e Upreti (1999), em que, após os cortes, os explantes nodais de *Bauhinia vahlii* foram imersos em solução filtro estéril de 50  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido ascórbico + 75  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido cítrico antes da inoculação no meio de cultura. Da mesma forma, o controle da alta oxidação em explantes adultos de *Cleistanthus collinus* e, conseqüentemente, sua sobrevivência, foi satisfatório imergindo os explantes em uma solução estéril de PVP 40 (3,75  $\mu\text{M}$ ) e ácido cítrico (520,5  $\mu\text{M}$ ) por 10 minutos antes da inoculação e pela adição desses compostos ao meio de cultivo (Quraishi e Mishra, 1998).

No presente estudo, a imersão dos explantes em solução filtro-estéril composta por 50  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido ascórbico mais 75  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido cítrico e posterior inoculação em meio de cultivo com diferentes substâncias antioxidantes não foram eficientes no controle da oxidação fenólica para explante cotiledonar de *Eucalyptus grandis*, em que o experimento utilizando carvão ativado proporcionou os piores resultados quando comparado com os demais tratamentos.

Bandyopadhyay et al. (1999) não observaram nenhum efeito positivo na adição de carvão ativado quando 1% (p/v) dessa substância foi adicionada ao meio de cultivo para produção de gemas adventícias em *Eucalyptus nitens* e *Eucalyptus globulus*. A utilização do carvão ativado também não minimizou a oxidação fenólica em calos formados de explante juvenil de *Eucalyptus grandis*, sendo também inibitório na fase de indução de calos (Titon, 2005).

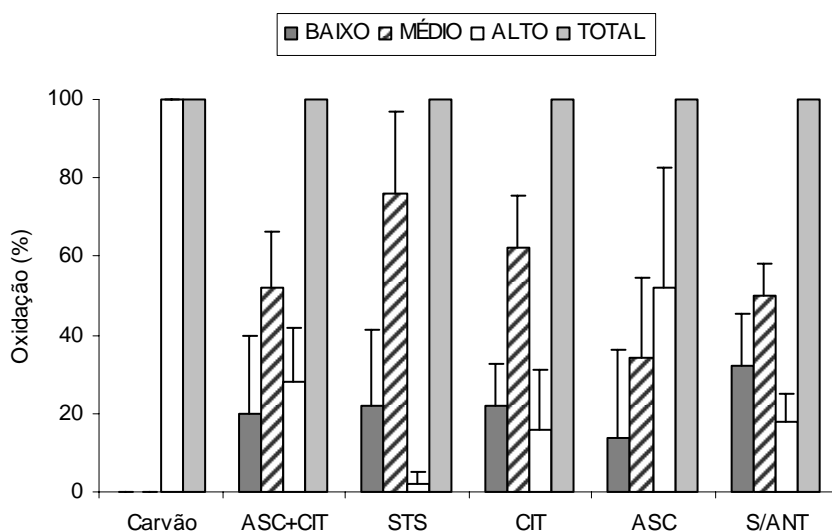


Figura 15- Nível de oxidação dos calos obtidos em explantes de cotilédones de *Eucalyptus grandis* aos 50 dias de cultivo nos diferentes tratamentos com os antioxidantes S/ANT (sem antioxidante), STS (10  $\mu$ M de tilsulfato de prata), CIT (100 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico), ASC+CIT (50 mg L<sup>-1</sup> ácido ascórbico + 75 mg L<sup>-1</sup> ácido cítrico), ASC (100 mg L<sup>-1</sup> ácido ascórbico) e carvão (3 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado). As barras indicam o desvio das médias.

### 3.7. Adição de água de coco (10% v/v) em meio de cultura contendo PVP (0,8 g L<sup>-1</sup>), ácido cítrico (100 mg L<sup>-1</sup>) e ácido ascórbico (100 mg L<sup>-1</sup>) para controle da oxidação de calos de *Eucalyptus urophylla*.

A adição de água de coco ao meio de cultura aumentou a intensidade de calejamento, tanto para explantes cotiledonares, como para hipocotiledonares de *E. urophylla*, sendo que a maior porcentagem de calos na intensidade alta de calejamento foi obtida no tratamento de PVP adicionado de água de coco para os dois tipos de explantes (Figura 16).

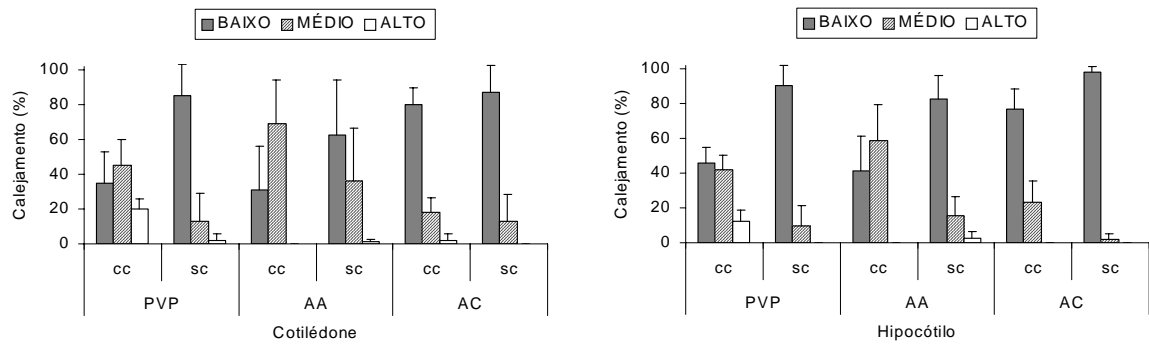


Figura 16- Intensidade de calejamento em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus urophylla* nos tratamentos de  $0,8 \text{ g L}^{-1}$  de PVP,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido ascórbico (AA) e  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido cítrico (AC) com (cc) e sem (sc) adição de 10% (v/v) de água de coco. As barras indicam o desvio das médias.

A textura dos calos formados pelos dois tipos de explantes também foi influenciada pela adição de água de coco ao meio de cultura, com maiores porcentagens de calos na classe friável, quando comparado com os diferentes tratamentos com e sem água de coco. Nos tratamentos sem água de coco, as texturas predominantes foram a semifriável e a semicompacta, sendo poucos os calos na textura compacta nos diferentes tratamentos (Figura 17). A adição de água de coco (5 – 10%) em trabalho de organogênese para *Eucalyptus nitens* e *E. globulus* provou ser benéfica para a formação de calos de boa aparência em ambas as espécies de *Eucalyptus* estudadas (Bandyopadhyay et al., 1999).

Com relação aos níveis de oxidação, na avaliação feita aos 30 dias de cultivo para calo cotiledonar, não foi encontrada diferença significativa nos níveis médio e alto de oxidação para os diferentes tratamentos. No nível baixo, pôde ser observado, para os tratamentos com PVP e ácido cítrico, que calos em meio de cultura sem água de coco apresentaram taxas estatisticamente maiores nesta categoria, o mesmo ocorrendo com ácido ascórbico, porém, de forma não significativa. Contudo, a adição de água de coco influenciou positivamente os níveis totais de oxidação, em que as menores porcentagens totais de oxidação foram obtidas nos meios com água de coco.

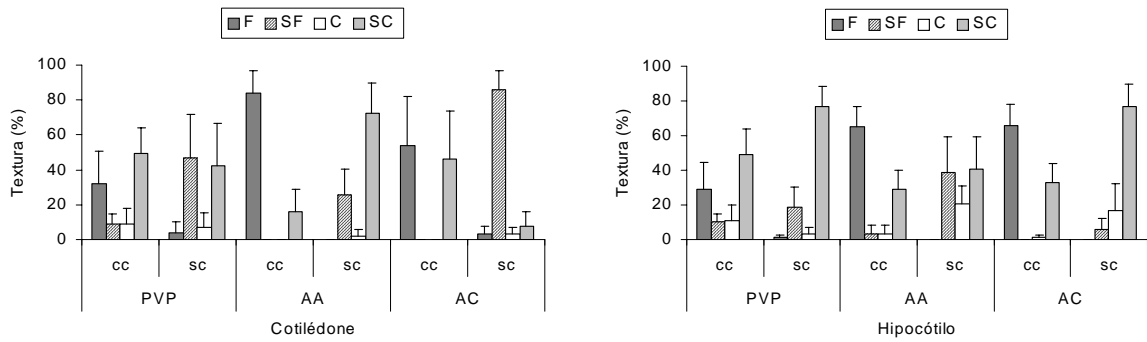


Figura 17- Textura dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus urophylla*, nos tratamentos de  $0,8\text{g L}^{-1}$  de PVP,  $100\text{mg L}^{-1}$  de ácido ascórbico (AA) e  $100\text{mg L}^{-1}$  de ácido cítrico (AC) com (cc) e sem (sc) adição de 10% (v/v) de água de coco, sendo F (friável), SF (semifriável), C (compacto) e SC (semicompacto). As barras indicam o desvio das médias.

Em calos provenientes de hipocótilos não foi observada diferença significativa nos níveis baixo, médio e alto de oxidação para os diferentes tratamentos, mas os tratamentos sem água de coco proporcionaram uma taxa melhor de calos com baixo nível de oxidação (Figura 18). Para porcentagens totais de oxidação, não houve diferença significativa para ácido cítrico e PVP, mas para o ácido ascórbico, a adição de água de coco ao meio de cultura proporcionou uma média significativamente menor de oxidação nos calos, quando comparado ao tratamento sem água de coco.

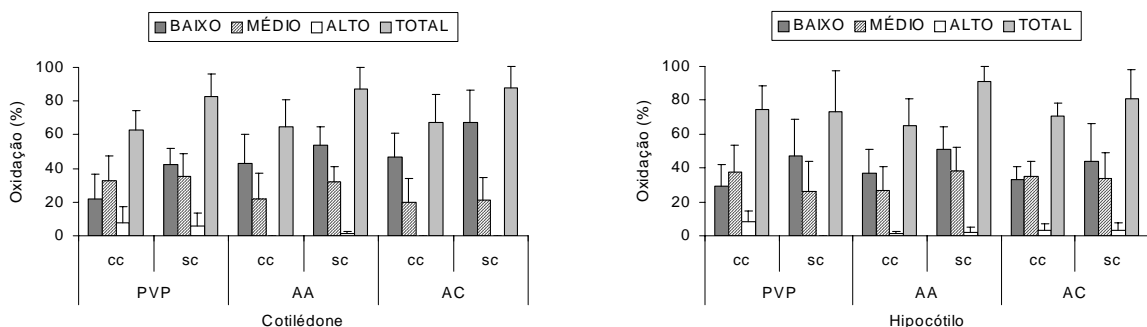


Figura 18- Nível de oxidação dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus urophylla* aos 30 dias de cultivo nos tratamentos de  $0,8\text{g L}^{-1}$  de PVP,  $100\text{mg L}^{-1}$  de ácido ascórbico (AA) e  $100\text{mg L}^{-1}$  de ácido cítrico (AC) com (cc) e sem (sc) adição de 10% (v/v) de água de coco. As barras indicam o desvio das médias.

Aos 60 dias de cultivo, quando foi analisado o efeito da interação entre água de coco e adição ou não de reguladores de crescimento para hipocótilo, não foi encontrada diferença significativa para as variáveis estudadas. Embora a adição de água de coco e de reguladores de crescimento não tenha interferido nos níveis de oxidação, com a maior porcentagem dos calos com taxas altas de oxidação os meios sem regulador de crescimento apresentaram neste período um grande escurecimento do meio de cultura, fato não foi observado nos meios com regulador de crescimento (Figura 19). Pinto et al. (2002) observaram, em trabalho com produção de embriões somáticos de *Eucalyptus globulus*, que calos embriogênicos com estruturas globulares transferidos para meio de cultura sem reguladores de crescimento se tornavam intensamente amarronzados devido à produção de compostos fenólicos, contudo, era possível detectar aglomerados embriogênicos de coloração amarela em diferentes estádios de diferenciação.

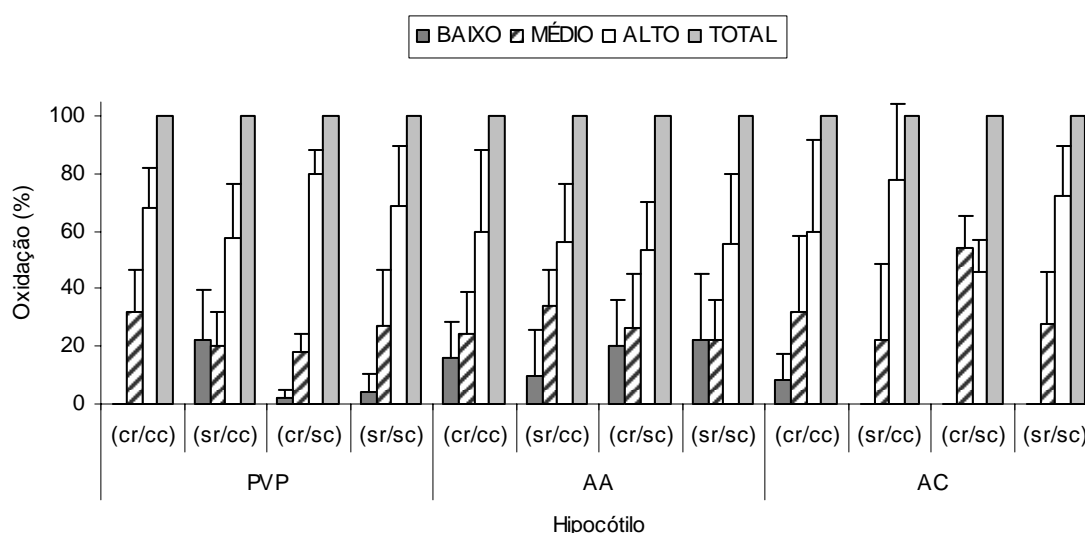


Figura 19- Nível de oxidação dos calos obtidos em explantes de hipocótilos de *Eucalyptus urophylla* aos 60 dias de cultivo nos tratamentos de 0,8 g L<sup>-1</sup> de PVP, 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico (AA) e 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico (AC) com (cc) e sem (sc) adição de 10% (v/v) de água de coco e com (cr) e sem (sr) adição de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba. As barras indicam o desvio das médias.

Os níveis de oxidação aos 60 dias de cultivo para explantes cotiledonares se mostraram altos nos diferentes tratamentos com e sem água de coco e regulador de crescimento. Nos tratamentos em que o antioxidante foi adicionado juntamente com regulador e água de coco, pôde ser observado que 100% dos

calos nos tratamentos de ácido ascórbico e ácido cítrico e 96% dos calos com PVP estavam com nível alto de oxidação, não tendo a adição de água de coco proporcionado uma diminuição nos níveis altos de oxidação. O melhor resultado alcançado foi proporcionado pelo ácido ascórbico sem água de coco e com regulador de crescimento. Assim como ocorreu com os calos provenientes do hipocótilo, meios de cultura isentos de regulador de crescimento apresentaram um alto escurecimento no meio de cultura (Figura 20).

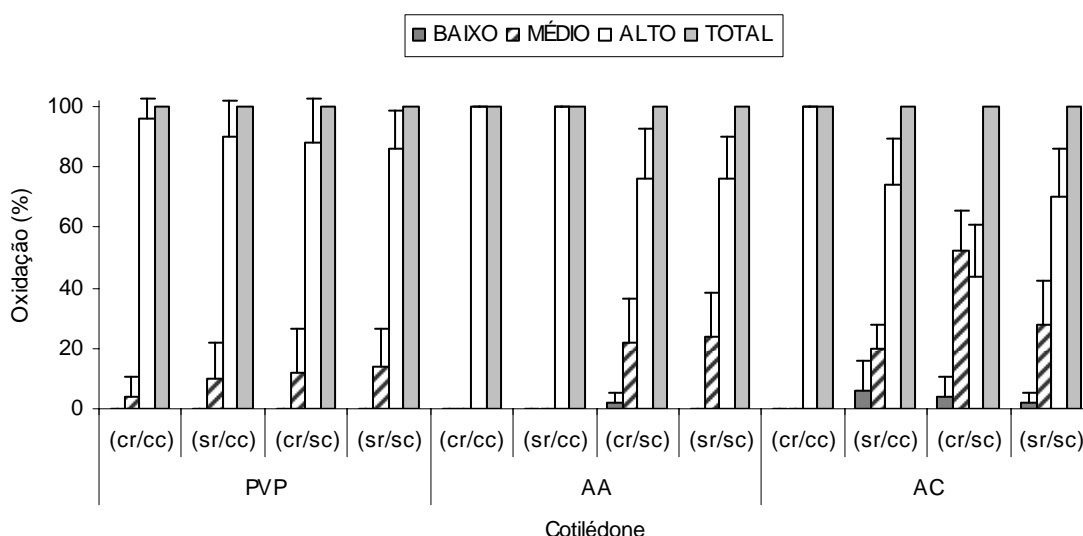


Figura 20- Nível de oxidação dos calos obtidos em explantes de cotilédones de *Eucalyptus urophylla* aos 60 dias de cultivo nos tratamentos de 0,8 g L<sup>-1</sup> de PVP, 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico (AA) e 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico (AC) com (cc) e sem (sc) adição de 10% (v/v) de água de coco e com (cr) e sem (sr) adição de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba. As barras indicam o desvio das médias.

#### 4- CONCLUSÕES

Os diferentes antioxidantes não foram eficientes em conter a oxidação fenólica de calos formados a partir de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla*, e o subcultivo dos calos para novo meio de cultura a cada 30 dias não conteve a progressão da oxidação fenólica.

A adição de 10% de água de coco afetou a textura e a intensidade de calejamento dos calos obtidos de cotilédones e hipocótilos de *E. urophylla*.

A transferência dos calos para meio sem regulador de crescimento acarretou um alto escurecimento dos explantes e do meio de cultura.

Não foi observada nenhuma resposta morfogênética em nenhum dos experimentos realizados.

## 5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONY, J. M.; SENARATNA, T.; DIXON, K. W.; SIVASITHAMPARAM, K. The role of antioxidants for initiation of somatic embryos with *Conostephium pendulum* Benth. (Ericaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.78, p.247-252, 2004

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.

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.

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.

DHAR, U.; UPRETI, J. *In vitro* regeneration of a mature leguminous liana *Bauhinia vahlii*. **Plant Cell Report**, v.18, p.664-669, 1999.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture - The technology**. 2. ed. England: Exegetics, 1993. v.1, 575 p.

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.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; REIS, M. 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.



KOMALAVALLI, N.; RAO, M. V. *In vitro* micropropagation of *Gymnema sylvestre*- A multipurpose medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.61, p.97-105, 2000.

LORENZO, J. C.; BLANCO, M. L. A.; PELÁEZ, O.; GONZÁLEZ, A.; CID, M.; IGLESIAS, A.; GONZÁLEZ, B.; ESCALONA, M.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane micropropagation and phenolic excretion. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.65, p.1-8, 2001.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO, J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (MART.) BECC.]. **Ciência Agrotécnica**, v.25, p.1301-1306, 2001.

MODGIL, M.; SHARMA, D. R.; BHARDWAJ, S. V. Micropropagation of apple cv.tydeman's early worcester. **Scientia Horticulturae**, v.81, p.179-188, 1999.

MURALIDHARAN, E. M.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *E. camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v.6, p.256-259, 1987.

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.

PAN, M. J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal in *in vitro* culture- A review. **Plant Growth Regulation**, v.26, p.155-163, 1998.

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

QURAIISHI, A.; MISHRA, S. K. Micropropagation of nodal explants from adult trees of *Cleistanthus collinus*. **Plant Cell Reports**, v.17, p.430-433, 1998.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 6 ED, 2001, 906p.

SIQUEIRA, E. R.; INQUE, M. T. Controle de oxidação na cultura de tecidos do coqueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, n. 7, p.949-953, 1991.

TANG, W.; LATOYA, C. H.; OUTHAVONG, V.; NEWTON, R. J. Antioxidants enhance *in vitro* plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). **Plant Cell Report**, v.22, p.871-877, 2004.

TERMIGNONI, R. R.; WANG, P. J.; HU, C. Y. 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. Indução de embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 107p. 2005.

VENGADESAN, G.; GANAPATHI, A.; AMUTHA, S.; SELVARAJ, N. *In vitro* propagation of *Acacia* species- a review. **Plant Science**, v.163, p.663-671, 2002.

VICIENT, C. M.; MARTÍNEZ, F. X. The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, n.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.

WHITE, P. R. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. **American Journal of Botany**, v.30, p.33-36, 1943.

## CAPÍTULO II

### **TDZ na indução de calos embriogênicos em folhas e segmentos internodais de dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla***

RESUMO: O presente trabalho objetivou avaliar o efeito do TDZ na indução de embriogênese somática em explantes internodais e foliares de dois clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. Os calos foram induzidos em meio de cultura MS contendo diferentes combinações de TDZ com zeatina, ANA, dicamba e picloran. Os resultados de calejamento obtidos foram diferentes entre os clones, sendo os melhores tratamentos com TDZ, ZEA e ANA. Não foi observada presença de raízes em nenhum experimento, assim como também não foi observada presença de estruturas embriogênicas.

### **1. INTRODUÇÃO**

A micropropagação de espécies lenhosas vem sendo estudada há várias décadas e tem como objetivo básico o estabelecimento de uma metodologia de multiplicação clonal de indivíduos superiores.

Como aplicação em programas silviculturais, a utilização da micropropagação permite o aprimoramento dessa técnica para a produção de genótipos selecionados com as vantagens da obtenção de material uniforme, assim como mediante a engenharia genética se incorporam características desejáveis (Sánchez et al., 2005). Nesse contexto, a micropropagação por embriogênese somática de *Eucalyptus* apresenta-se como ferramenta promissora no setor florestal, principalmente na propagação clonal em larga escala e na transformação genética de genótipos desejáveis.

Entre diferentes estímulos externos que induzem a uma rota embriogênica, os reguladores de crescimento vegetais como auxinas e citocininas utilizados nos meios de cultura têm sido mais freqüentemente considerados fatores de regulação do ciclo celular e gatilhos para as divisões celulares. Diferentes dados

documentam uma ligação entre o suprimento de reguladores de crescimento e a ativação de divisões celulares e subsequente diferenciação celular (Gaj, 2004).

Embora as auxinas, conhecidas por mediar a transição de células somáticas para células embriogênicas, sejam os agentes geralmente utilizados para induzir a embriogênese, o efeito de outros reguladores de plantas neste fenômeno não deve ser negligenciado (Jiménez, 2001). Os estudos de Visser et al. (1992) com hipocótilo de gerânio mostraram, pela primeira vez, que o TDZ pode ser utilizado para os propósitos de embriogênese somática, e que a alta eficiência com que o TDZ induziu à embriogênese neste estudo poderia ser uma reflexão da habilidade dos tecidos em adquirir níveis endógenos ótimos em cultura.

Uma possibilidade para explicar os efeitos fisiológicos do TDZ é a indução como respostas ao estresse, em que sob a influência do TDZ, um nível relativamente alto de acúmulo de minerais e outros metabólitos ocorre nos tecidos, e estes eventos predisporiam o explante ao estresse. Para superar este estresse fisiológico, o tecido modificaria seu processo metabólico, resultando na produção e no acúmulo de diversas substâncias, culminando na formação de regenerantes (Murthy et al., 1998). O mecanismo de indução da embriogênese somática pelo TDZ não é conhecido, mas é interessante notar que a embriogênese somática pode ser induzida em meio de cultura contendo apenas esta citocinina. Esta é uma indicação de que o TDZ possa ter uma atividade de auxina ou estar envolvido em seu metabolismo (Lu, 1993). Existe também a probabilidade de modulação pelo TDZ em biorregular auxinas endógenas ou compostos auxínicos com um sinergismo com citocininas, podendo constituir o sinal indutivo para a expressão embriogênica (Visser et al., 1992).

A utilização do TDZ tem se mostrado eficiente na iniciação da embriogênese somática em diversas culturas, principalmente em espécies lenhosas. Xie e Hong (2001) conseguiram embriogênese somática em *Acacia mangium*, utilizando meio contendo 2,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ mais 0,25 mg L<sup>-1</sup> de AIA. Calos embriogênicos produziram embriões em estágio globular e cordiforme, sendo que estes últimos, quando subcultivados em novo meio de cultura proporcionaram embriogênese secundária. A capacidade de embriogênese somática repetitiva foi mantida por seis meses, com subcultivos mensais.

Uma alta freqüência de embriões somáticos de *Santalum album* e *Santalum spicatum* foi induzida diretamente de vários explantes, utilizando meio de cultivo com TDZ (1 a 2  $\mu\text{M}$ ) ou indiretamente em meio contendo TDZ mais 2,4-D. No presente estudo, o TDZ sozinho ou em combinação com 2,4-D induziu a embriogênese somática a uma freqüência variando de 50 a 100% e com grande reprodutibilidade (Rugkhla e Jones, 1998).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito do TDZ em combinação com os reguladores de crescimento ZEA, ANA, picloran e dicamba na indução da embriogênese somática em tecidos foliar e caulinar de clones de *Eucalyptus* propagados *in vitro*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material experimental

Foram utilizados dois clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* provenientes 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

Os clones utilizados no presente estudo encontravam-se estabelecidos *in vitro*, em sistema de micropropagação por meio de proliferação de gemas axilares. O meio de cultura era constituído pelos sais minerais e vitaminas JADS (Correia et al., 1995), 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP (polivinilpirrolidona), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6,5 g L<sup>-1</sup> de ágar granulado Merck®, 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenoacético), com pH ajustado para 5,7  $\pm$  0,1.

Para o alongamento das gemas, utilizou-se a mesma composição do meio de cultura acima descrito, modificando-se a concentração dos reguladores de crescimento para 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA. As culturas foram

mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $27 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro, com irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes luz do dia, de 20 Watts.

Com aproximadamente 30 dias de cultivo, foram extraídos das gemas alongadas segmentos internodais com aproximadamente 0,3 cm e folhas sem pecíolo, sendo as folhas inoculadas com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

### **2.3. Indução de calos**

Para indução de calos em folhas e entrenós foi utilizado o meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) e Phytigel<sup>®</sup> ( $2,9 \text{ g L}^{-1}$ ). Foram montados três experimentos com diferentes concentrações de reguladores de crescimento. Após a confecção dos explantes, eles foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $27 \pm 2$  °C no escuro por um período de 30 dias. Após este período, os explantes foram transferidos para o mesmo meio de cultura, porém, variando o tipo e concentração de regulador, e sendo mantidos nas mesmas condições de cultivo. Foram utilizadas placas de Petri descartáveis (60 x 15 mm). Para cada experimento e tipo de explante utilizaram-se 5 placas com 10 explantes por placa.

#### **2.3.1. Experimento 1**

Neste experimento para indução de calos nos explantes foliar e caulinar, foram utilizadas quatro combinações dos reguladores TDZ, ZEA e ANA: T1=  $1 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ +  $1 \text{ mg L}^{-1}$  ZEA +  $1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA; T2=  $1 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ +  $1 \text{ mg L}^{-1}$  ZEA +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  ANA; T3=  $1 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  ZEA +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  ANA; e T4=  $1 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  ZEA +  $1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA. Após 30 dias de cultivo, os calos foram transferidos para o meio de cultura com  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA.

#### **2.3.2. Experimento 2**

No segundo experimento, foram utilizadas quatro combinações dos reguladores TDZ e ZEA na indução de calos: T1=  $1 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  ZEA;

T2= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> ZEA; T3= 0,5 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ZEA; e T4= 0,5 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> ZEA. Após 30 dias de cultivo, os calos foram transferidos para meio com 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

### **2.3.3. Experimento 3**

No terceiro experimento, foram utilizadas as auxinas dicamba e picloran em combinação com TDZ na indução de calos: T1= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,5 mg L<sup>-1</sup> dicamba; T2= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> dicamba; T3= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> picloran e T4= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 5 mg L<sup>-1</sup> picloran. Após 30 dias de cultivo, os calos foram transferidos para meio com 0,01 mg L<sup>-1</sup> de dicamba para os tratamentos 1 e 2, e 0,05 mg L<sup>-1</sup> de picloran para os tratamentos 3 e 4.

## **2.4. Condução e avaliações experimentais**

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o inteiramente casualizado. Após 30 dias de cultivo, os calos obtidos dos diferentes experimentos foram avaliados quanto aos níveis de oxidação, aspectos gerais do calo, presença de raízes, textura e presença de estruturas embriogênicas. Os calos obtidos foram subcultivados para novo meio de cultura, variando a concentração e o tipo de regulador, conforme cada experimento e mantidos no escuro, em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C. Aos 60 dias, foi realizada uma nova avaliação em relação ao aspecto dos calos e à presença de estruturas embriogênicas.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

**Combinação dos reguladores de crescimento TDZ, Zeatina (ZEA) e ANA na indução de calos embriogênicos de clones de *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla***

Para um clone, os maiores índices de calejamento foram observados na intensidade média em folhas e na intensidade baixa para entrenós; para o outro clone, predominou a intensidade baixa em todos os tratamentos. Apenas um pequeno número de explantes foliares experimentou intensidade alta de calejamento, assim mesmo observado somente no clone 1 (Figura 1). No explante foliar, o calejamento se deu em todo o limbo, tendo iniciado na parte abaxial em contato com o meio de cultura. No explante caulinar, o calejamento também se deu em todo o explante, tendo iniciado principalmente nas suas extremidades.

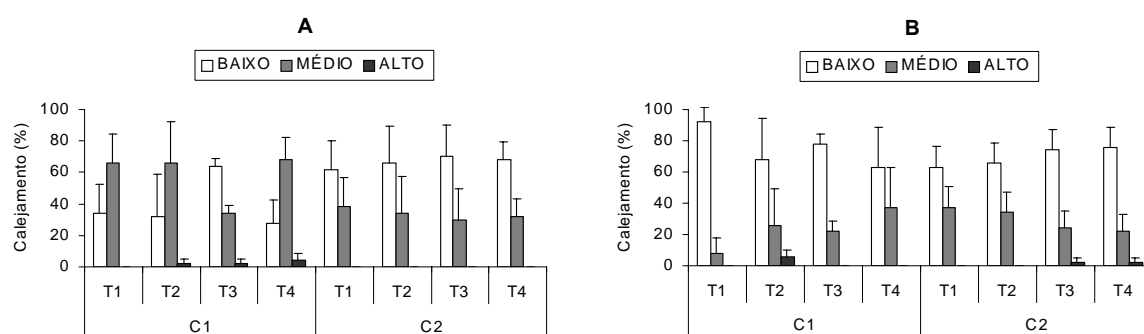


Figura 1- Porcentual de calejamento em folhas (A) e entrenós (B) de dois clones (C1 e C2) de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em meio de cultura MS nos tratamentos T1= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> ZEA + 1 mg L<sup>-1</sup> ANA; T2= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> ZEA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA; T3= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ZEA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA; e T4= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ZEA + 1 mg L<sup>-1</sup> ANA. As barras indicam o desvio das médias.

Nos calos obtidos de explantes foliares, independentemente do tratamento, a textura predominante foi a semicompacta para os dois clones em estudo, com uma porcentagem menor de calos semifriáveis. Nos calos internodais, calos friáveis foram observados somente no clone 1 (Figura 2), predominando, contudo, a textura semifriável. No clone 2, predominou a textura semicompacta. Os calos formados no explante foliar apresentavam coloração esbranquiçada, enquanto naqueles formados em entrenós, a coloração variou de branco a amarelo. Segundo Murthy et al. (1998), existem poucas informações disponíveis concernentes aos tipos de calos induzidos por TDZ, contudo, em baixas concentrações, o TDZ geralmente tende a promover a formação de calos mais compactos quando comparado com outras citocininas.



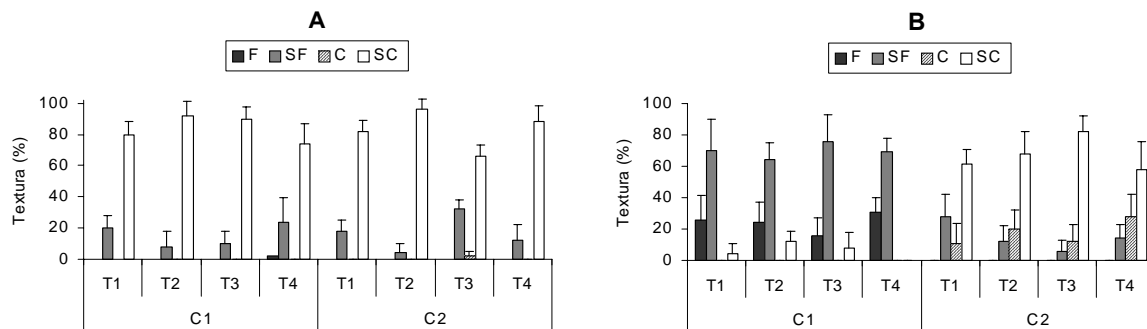


Figura 2- Textura observada em folhas (A) e entrenós (B) de dois clones (C1 e C2) de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, em meio de cultura MS nos tratamentos T1= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> ZEA + 1 mg L<sup>-1</sup> ANA; T2= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> ZEA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA; T3= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ZEA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA; e T4= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ZEA + 1 mg L<sup>-1</sup> ANA, sendo F (friável), SF (semifriável), C (compacto) e SC (semicompacto). As barras indicam o desvio das médias.

No trabalho de Hosokawa et al. (1996) para cultura de *Gentiana*, diferentes citocininas como TDZ, BAP e zeatina foram testadas. Os autores demonstraram, para esta espécie, uma maior eficiência do TDZ comparado com os demais reguladores de crescimento, e que a presença de uma auxina foi essencial para a morfogênese, e nenhuma planta foi obtida em meio de cultura contendo somente citocinina. Contudo, Murch et al. (2000) relataram que a adição de AIA (ácido indolacético) ao meio de cultura contendo TDZ, para cultura de *Hypericum perforatum*, reduziu significativamente a resposta de regeneração. A formação de embriões somáticos em *Leucopogon verticillatus* obteve maior êxito utilizando a combinação de 10 μM de TDZ mais 5 μM de AIA, porém, embriões foram formados sem a presença de uma auxina, mas não sem uma citocinina (Anthony et al., 2004). No presente estudo, a combinação das citocininas TDZ e ZEA com a auxina ANA não promoveu nenhuma resposta morfogênica, não tendo sido observada formação de embriões somáticos ou raízes em nenhum dos tratamentos utilizados.

O clone 1 apresentou as menores porcentagens de oxidação aos 30 dias de cultivo, em folha, enquanto no clone 2 os índices foram em sua grande maioria altos (Figura 3). Os calos obtidos de entrenós no clone 1 apresentaram somente calos no nível baixo de oxidação, com o melhor resultado no tratamento 1 com 6% de oxidação somente. Para o clone 2, os índices foram médios e altos.

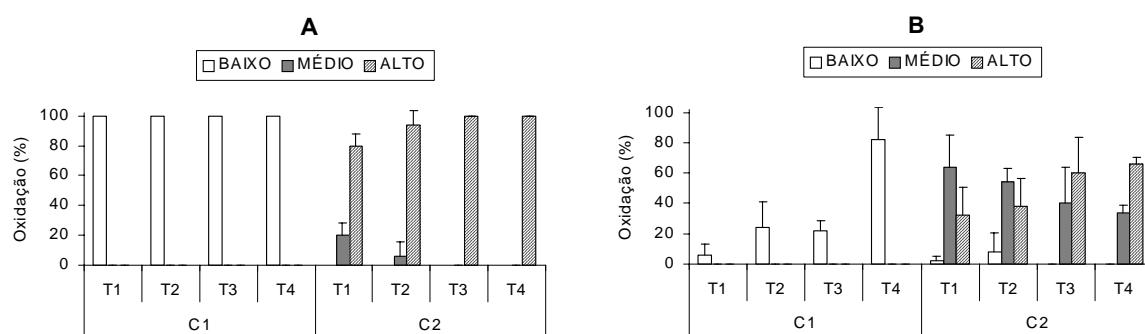


Figura 3- Nível de oxidação em folhas (A) e entrenós (B) de dois clones (C1 e C2) de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em meio de cultura MS nos tratamentos T1= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> ZEA + 1 mg L<sup>-1</sup> ANA; T2= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> ZEA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA; T3= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ZEA + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ANA; e T4= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ZEA + 1 mg L<sup>-1</sup> ANA. As barras indicam o desvio das médias.

### **Combinação dos reguladores de crescimento TDZ e Zeatina (ZEA) na indução de calos embriogênicos de clones de *Eucalyptus grandis* x *E.urophylla***

Foi observado que o clone 2 apresentou pior resultado em termos de calejamento, tanto para explante foliar, quanto internodal (Figura 4). Em explantes foliares houve predominância de calejamento nas extremidades cortadas do explante e na face abaxial, e calejamento praticamente não ocorreu na face adaxial desse explante. No clone 1, pôde ser observada para explante foliar uma expansão do limbo, com maior intensidade de calejamento na face abaxial e extremidades, contudo, em uma intensidade maior que no clone 2. Calejamento na intensidade alta foi observado em pequenas porcentagens somente no clone 1. Os calos formados em explante foliar apresentavam coloração esbranquiçada, enquanto naqueles formados nos entrenós, a coloração variou de branco a amarelo.

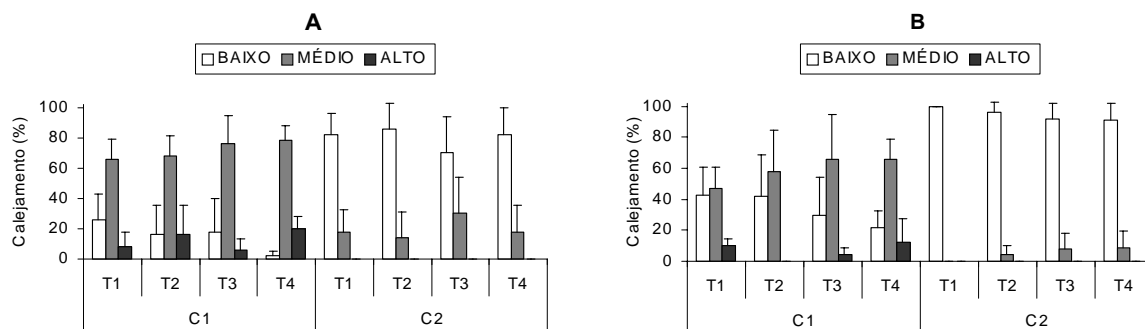


Figura 4- Percentual de calejamento em folhas (A) e entrenós (B) de dois clones (C1 e C2) de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em meio de cultura MS nos tratamentos T1= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ZEA; T2= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> ZEA; T3= 0,5 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ZEA; e T4= 0,5 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> ZEA. As barras indicam o desvio das médias.

Com relação à textura dos calos, em explante foliar predominou a textura semicompacta, e somente os tratamento T1, T2 e T4 do clone 2 apresentaram respectivamente 4, 2 e 24% de calos com textura semifriável. Em explantes internodais, para o clone 1, houve predominância de calos semifriáveis, com pequenas porcentagens de calos friáveis e semicompactos. Para o clone 2, predominou a textura semicompacta, seguida pela compacta nos tratamentos T1 e T2 e semifriável nos tratamentos T3 e T4 (Figura 5).

O TDZ é mais usualmente utilizado para regeneração de gemas adventícias (Lu, 1993), contudo, no trabalho de Visser et al. (1992), foi demonstrada alta eficiência do TDZ na estimulação de embriogênese somática em cultura de hipocótilo de gerânio. A combinação do TDZ com outras citocininas na produção de embriões somáticos em explantes foliares e internodais de *Paulownia elongate* foi utilizada por Ipekci e Gozukirmizi (2004), em que calos friáveis se diferenciaram em aglomerados embriogênicos brancos que subsequentemente desenvolveram embriões nos estádios globular, cordiforme e torpedo, obtidos em meio com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ mais 1 mg L<sup>-1</sup> de cinetina.

A combinação do TDZ com diferentes concentrações de zeatina proporcionou calos friáveis em pequenas porcentagens somente no clone 1 para explante foliar, contudo, não foram observadas estruturas embriogênicas nem formação de raízes em nenhum dos explantes e tratamentos utilizados.

O nível de oxidação em calos obtidos de explante foliar foi predominante no nível médio para os dois clones, com 10% de calos no nível baixo no tratamento 2

do clone 1. Em entrenós houve também uma predominância de calos no nível médio de oxidação para os dois clones, com calos no nível alto em todos os tratamentos para o clone 1 (Figura 5).

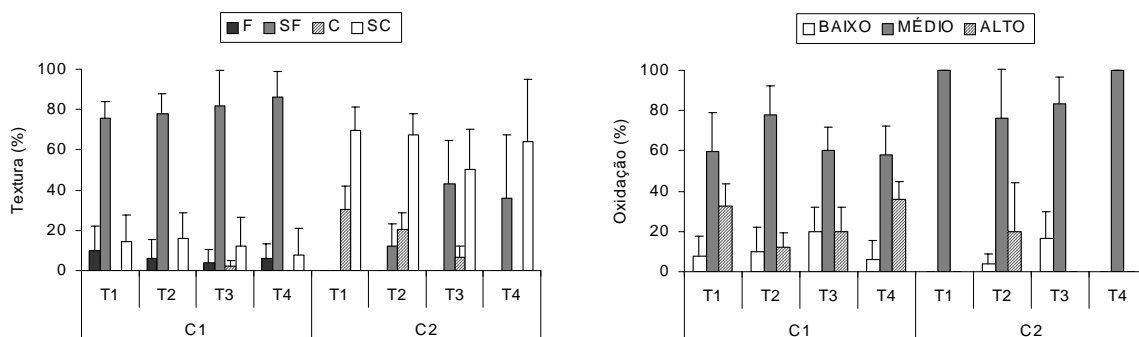


Figura 5- Textura e oxidação observados em entrenós de dois clones (C1 e C2) de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em meio de cultura MS nos tratamentos T1= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ZEA; T2= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> ZEA; T3= 0,5 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,5 mg L<sup>-1</sup> ZEA; e T4= 0,5 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> ZEA, sendo F (friável), SF (semifriável), C (compacto) e SC (semicompacto). As barras indicam o desvio das médias.

### Efeito do TDZ em combinação com picloran e dicamba na indução de calos embriogênicos de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*.

A intensidade de calejamento em explante foliar e caulinar em todos os tratamentos para o clone 2 foi baixa. Para o clone 1 predominou a intensidade baixa, com as porcentagens de 12, 28, 14 e 32% na intensidade média em explante foliar nos tratamentos T1, T2, T3 e T4, respectivamente, e as porcentagens de 12, 8, 22 e 4% na intensidade média em explante internodal nos tratamentos T1, T2, T3 e T4, respectivamente.

Independentemente do tratamento, a textura em calos foliares para o clone 2 foi semifriável, sendo que para o mesmo explante no clone 1, os tratamentos com dicamba (T1 e T2) apresentaram, respectivamente, 18 e 22% de calos compactos, e o restante semifriável. Para calos internodais, no clone 2, também predominou a textura semifriável, com as porcentagens 24, 4 e 8% de calos compactos nos tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente. Calos friáveis somente foram observados em calos internodais do clone 1 (Figura 6).

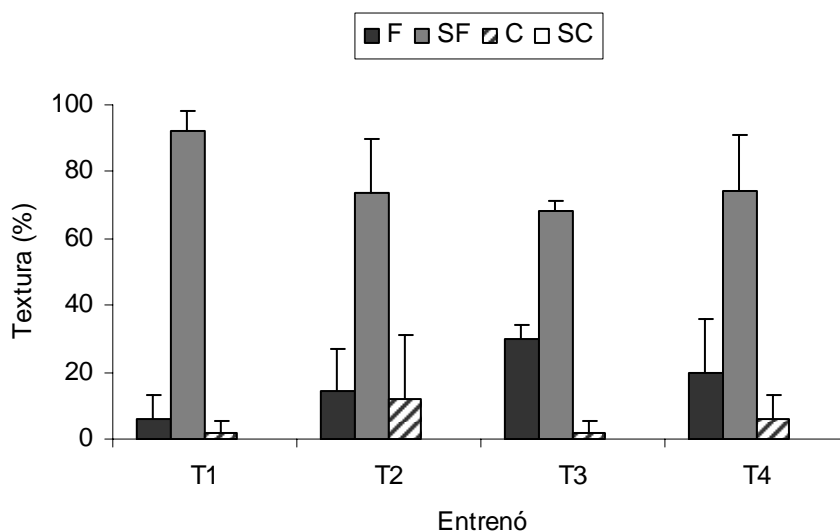


Figura 6- Textura observada em entrenós do clone 1 em meio de cultura MS nos tratamentos T1= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,5 mg L<sup>-1</sup> dicamba; T2= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> dicamba; T3= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 1 mg L<sup>-1</sup> picloran; e T4= 1 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 5 mg L<sup>-1</sup> picloran, sendo F (friável), SF (semifriável), C (compacto) e SC (semicompacto). As barras indicam o desvio das médias.

Na morfogênese de *Xanthosoma sagittifolium*, o TDZ promoveu um efeito na proliferação de calos apenas em altas concentrações de dicamba, mas retardou a formação de calos no explante inteiro e sua proliferação por seis semanas quando comparado com meio de cultura contendo somente dicamba. A combinação de TDZ com dicamba proporcionou calos mais compactos quando comparado a calos formados em meio com apenas dicamba, que se apresentavam mais friáveis (Nyochembeng e Garton, 1998). No presente estudo, a textura predominante nos diferentes tratamentos foi a semifriável, com menores porcentagens de calos compactos e semifriáveis, com calos formados em explantes foliares e internodais apresentando coloração de amarelo claro a amarelo escuro.

Com relação aos níveis de oxidação, em explante foliar, foram de 100% no nível médio em todos os tratamentos para os dois clones. Em explante caulinar, 100% de nível baixo foi verificado em todos os tratamentos para o clone 1, sendo predominante no clone 2, com 19, 12, 2 e 21% de calos na intensidade média para os tratamentos T1, T2, T3 e T4, respectivamente.

A utilização do TDZ associado a uma auxina para fins de embriogênese somática foi experimentada por Rugkhla e Jones (1998) em *Santalum album* e

*Santalum spicatum*, com uma alta freqüência de embriões somáticos induzidos diretamente de vários explantes utilizando meio MS com TDZ (1 a 2 µM) ou indiretamente em meio contendo TDZ mais 2,4-D, em que o TDZ sozinho ou em combinação com 2,4-D pôde espontaneamente induzir a embriogênese numa freqüência variando de 50 a 100% e com grande reprodutibilidade.

No presente estudo, a combinação do TDZ com as auxinas dicamba e picloran não logrou êxito na produção de embriões somáticos em explantes adultos de *Eucalyptus*, não tendo sido visualizadas estruturas embriogênicas nos tratamentos testados neste experimento. Da mesma forma que nos experimentos anteriores, não houve formação de raízes em nenhum tratamento e explante utilizado.

#### 4. CONCLUSÕES

Calos foliares obtidos nos tratamentos com TDZ + ZEA e ANA e TDZ + ZEA apresentaram coloração esbranquiçada em sua maioria, e calos formados nos tratamentos com TDZ + dicamba ou picloram apresentaram coloração amarelo claro a amarelo escuro.

Os melhores resultados de calejamento foram obtidos para o clone 1 nos tratamentos com TDZ, ZEA e ANA.

Calos friáveis foram obtidos somente no clone 1 para explante foliar nos tratamentos com TDZ + ZEA e internodais nos tratamentos com TDZ + ZEA + ANA e combinações de TDZ com dicamba e picloram.

No presente estudo, nas dosagens e combinações utilizadas com TDZ, não foi observada presença de raízes em nenhum dos experimentos, assim como também não foi observada presença de estruturas embriogênicas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTHONY, J. M.; SENARATNA, T.; DIXON, K. W.; SIVASITHAMPARAM, K. Somatic embryogenesis for mass propagation of Ericaceae- a case study with *Leucopogon verticillatus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.76, p.137-146, 2004.

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)

GAJ. M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v.43, p.27-47, 2004.

HOSOKAWA, K.; NAKANO, M.; OIKAWA, Y.; YAMAMURA, S. Adventitious shoot regeneration from leaf, stem and root explants of commercial cultivars of *Gentiana*. **Plant Cell Reports**, v.15, p.578-581, 1996.

IPEKCI, Z.; GOZUKIRMIZI, N. Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internode explants of *Paulownia elongata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.341-345, 2004.

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.

LU, C-YI. The use of thidiazuron in tissue culture. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.29, p.92-96, 1993.

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

MURCH, S. J.; CHOFFE, K. L.; VICTOR, J. M. R.; SLIMMON, T. Y.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P. K. Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyls cultures of st. John's wort (*Hypericum perforatum*. Cv 'Anthos'). **Plant Cell Reports**, v.19, p.576-581. 2000.

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.34, p.267-275, 1998.

NYOCHEMBENG, L. M.; GARTON, S. Plant regeneration from cocoyam callus derived from shoot tips and petioles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.53, p.127-134, 1998.

RUGKHLA, A.; JONES, M. G. K. Somatic embryogenesis and plantlet formation in *Santalum album* and *S. spicatum*. **Journal of Experimental Botany**, v.49, n.320, p.563-571, 1998.

SÁNCHEZ-OLATE, M. E.; LEAL, D. G. R.; RODRIGUES, E. R. La biotecnología vegetal y el mejoramiento genético de especies leñosas de interés forestal y sus proyecciones en Chile. In: SÁNCHEZ-OLATE, M. E.; LEAL, D. G. R. (eds.). **Biotecnología Vegetal en Especies Leñosas de Interés Forestal**. Concepción: Inprenta Austral, 2005. p.17-28.

VISSER, C.; QURESHI, A.; GILL, R.; SAXENA, P. K. Morphoregulatory role of thidiazuron. **Plant Physiology**, v.99, p.1704-1707, 1992.

XIE, D.; HONG, Y. Regeneration of *Acacia mangium* through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.20, p.34-40, 2001.



## CAPÍTULO III

### **Pré-tratamento com temperatura em explantes de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* na indução da embriogênese somática.**

RESUMO: Este trabalho objetivou avaliar o efeito de 4 tipos de reguladores de crescimento em 4 tratamentos de estresse proporcionados às plantas doadoras de explantes na indução de embriogênese somática em dois clones híbridos de *Eucalyptus*. Os calos foram induzidos em 5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba, 5 mg L<sup>-1</sup> de picloran, 1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ e 2 mg L<sup>-1</sup> TDZ + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA. As plantas doadoras de explante foram submetidas a 4 pré-tratamentos na temperatura de 4°C (0 dias, 1 dia, 2 dias e 4 dias). O pré-tratamento com frio como estímulo por estresse não influenciou na obtenção de resposta morfogênética. A utilização de 1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ proporcionou maiores índices de calos friáveis em explante internodal, e no tratamento sem exposição ao frio foi observada formação de aglomerados celulares assemelhando-se a massas pró-embriogênicas.

## 1. INTRODUÇÃO

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 posterior conversão em plantas, passando por estádios semelhantes aos observados na embriogênese zigótica (Guerra et al., 1999). Na última década, foi dispensado um interesse especial aos estudos de indução de embriogênese somática em espécies consideradas anteriormente recalcitrantes (Rodrigues et al., 2005), sendo que a formação de embriões somáticos ou estruturas embriogênicas tem sido reportada para algumas espécies de *Eucalyptus*. Contudo, observa-se na maioria dos trabalhos a inexistência de um protocolo eficiente de propagação *in vitro* com base nesta técnica.

Nos trabalhos sobre embriogênese somática em *Eucalyptus*, tem predominado a utilização de materiais juvenis como fonte de explantes, tais como,

embriões zigóticos maduros (Muralidharan e Mascarenhas, 1987; Pinto et al., 2002; Prakash e Gurumurthi, 2005), sementes maduras germinadas (Termignoni et al., 1996), cotilédones (Ruad et al., 1997; Bandyopadhyay et al., 1999; Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002; Titon, 2005), hipocótilos (Tibok et al., 1995; Ruad et al., 1997; Bandyopadhyay et al., 1999; Arruda et al., 2000; Nugent et al., 2001; Pinto et al., 2002) e folhas provenientes de plântulas (Watt et al., 1991; Ruad et al., 1997).

A utilização de explantes tomados de árvores adultas torna-se necessária quando o objetivo é propagar árvores selecionadas de reconhecido valor genético. Isso porque a propagação de genótipos elites só é possível a partir da seleção de fenótipos de interesse, seleção possível somente na fase adulta. Contudo, a iniciação de cultivos a partir de explantes procedentes de indivíduos adultos implica a necessidade de utilizar tecidos em crescimento ativo que apresentam altos conteúdos de compostos fenólicos, além de, em algumas espécies, serem necessários longos períodos de cultivo para obter as respostas desejadas. Devido a isso, é de se supor que a maior parte das espécies lenhosas, sobretudo durante a fase adulta, seja considerada recalcitrante com relação à embriogênese somática (Rodrigues et al., 2005).

Ao lado de uma grande variação de tipos indutores, a embriogênese somática não pode ser definida como uma resposta específica a um ou mais reguladores de crescimento aplicados. Muitas das observações indicam um papel crítico do estresse como um estímulo embriogênico (Fehér et al., 2003). Células somáticas podem adquirir competência embriogênica como resultado de diferentes estímulos externos tanto químicos como físicos, geralmente chamados de fatores de estresse, como pressão osmótica, metais pesados, pH, baixa ou alta temperatura e altos níveis de auxina. Contudo, os mecanismos moleculares do efeito estimulatório dos tratamentos de estresse na diferenciação celular e morfogênese permanecem obscuros (Gaj, 2004).

Níveis toleráveis de estresse aumentam o metabolismo e induzem as células a um mecanismo de adaptação que inclui reprogramação da expressão gênica, tanto quanto mudanças na sua fisiologia e metabolismo. Este estado celular passageiro induzido pelas condições de estresse pode ser caracterizado por uma extensiva reorganização celular que permitiria uma mudança no

desenvolvimento, quando sinais apropriados são percebidos. O estresse não apenas promove a desdiferenciação, mas também pode ser usado para induzir a formação do embrião (Fehér et al., 2003).

O regulador de crescimento TDZ apresenta efeito morfogênico similar àquele produzido pelo estresse, como mudanças morfogênicas que são precedidas pelo acúmulo de vários minerais, incluindo sódio, cobre e zinco (Visser et al., 1992; Von Aderkas e Bonga, 2000), além de exibir alto nível de atividade em concentrações relativamente baixas, quando comparado com outras citocininas (Murthy et al., 1998). Com relação às auxinas, uma situação de estresse pode ser desencadeada quando altos níveis desses reguladores são utilizados para induzir a embriogênese somática em algumas espécies (Jiménez, 2001; Gaj, 2004).

É bem aceito que sistemas eficientes de embriogênese somática requerem reguladores de crescimento como auxinas e citocininas para iniciação da grande maioria das culturas embriogênicas (Gaj, 2004), contudo, o desenvolvimento de tipos celulares embriogênicos pode ser influenciado por diferentes tratamentos de estresse (Feher et al., 2002). Os mecanismos, pelos quais o estresse afeta a embriogênese somática, não estão bem elucidados, com a maioria dos estudos neste sentido sendo conduzidos com plantas herbáceas em detrimento das espécies lenhosas (Von Aderkas e Bonga, 2000).

Em culturas de suspensão celular, tem sido sugerido que o tratamento com frio possa estimular a formação de massas pró-embriogênicas, resultando em aumento na embriogênese somática, contudo, o papel do pré-tratamento com frio em regular o aumento na embriogênese somática é desconhecido (Luo et al., 2003). Gemas florais em *Linum usitatissimum* armazenadas em refrigerador por 7 dias a 8 °C promoveram um aumento na morfogênese em anteras (Obert et al., 2004). Períodos de armazenamento de 7 a 14 dias, à temperatura de 4 °C em espigas de trigo, demonstraram ser eficientes na indução de embriogênese somática em cultura de micrósporos, sinalizando que este tipo de estresse pode ser aplicado no aumento da eficiência da embriogênese somática desta espécie (Indrianto et al., 1999).

A produção de culturas embriogênicas obtidas de árvores adultas para *Eucalyptus* trará grande impacto em programas de melhoramento e clonagem,

uma vez que apresenta potencial na preservação de genótipos-elite, rejuvenescimento de material selecionado de difícil enraizamento e na transformação genética.

No presente trabalho investigou-se o efeito do armazenamento de plantas doadoras de explante em temperatura de 4 °C pelo período de até 4 dias e posterior indução de calos embriogênicos em explantes de folhas e segmentos internodais tomados de dois clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* micropropagados.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material experimental

Foram utilizados dois clones no presente estudo, sendo um híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (Clone 1) e um híbrido de *E. urophylla* (clone 2) provenientes 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

Os clones utilizados no presente estudo encontravam-se estabelecidos *in vitro*, micropropagados por meio de proliferação de gemas axilares, em meio de multiplicação composto pelos sais minerais e vitaminas JADS (Correia et al., 1995) e contendo 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 800 mg L<sup>-1</sup> de PVP (polivinilpirrolidona), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6,5 g L<sup>-1</sup> de ágar granulado Merck®, 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético), com pH ajustado para 5,7 ± 0,1.

Para o alongamento das gemas, utilizou-se a mesma composição do meio acima descrito, modificando-se apenas a concentração dos reguladores de crescimento para 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA. As culturas foram

mantidas em sala de crescimento com temperatura de  $27 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro, com irradiância de  $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes luz do dia, de 20 Watts.

Com aproximadamente 30 dias de cultivo para a obtenção dos explantes, as gemas alongadas foram armazenadas em geladeira a 4 °C por um período de até quatro dias, dependendo do tratamento, quando foram retirados segmentos internodais com aproximadamente 0,3 cm e folhas sem pecíolo, sendo as folhas inoculadas com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

### **2.3. Indução de calos**

Para indução de calos em folhas e entrenós, foi utilizado o meio de cultura contendo os sais minerais de MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas de White (White, 1943) e ainda mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) e Phytigel® ( $2,9 \text{ g L}^{-1}$ ), e pH ajustado para 5,7. Foram utilizados 4 tratamentos com regulador de crescimento ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de dicamba,  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de picloran,  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ e  $2 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ +  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA) e 4 períodos de tempo em temperatura de 4 °C (0 dias, 1 dia, 2 dias e 4 dias). As plantas doadoras de explante foram colocadas na geladeira nos períodos de tempo acima citados e em seguida foram preparados os explantes e inoculados nos diferentes tratamentos com regulador de crescimento e mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $27 \pm 2$  °C no escuro por um período de 30 dias, quando se avaliaram o percentual de explantes calejados, a intensidade de calejamento, oxidação, textura e a presença de estruturas embriogênicas.

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (4 períodos de tempo em temperatura de 4 °C e 4 tipos de regulador de crescimento), e os explantes foram colocados em placas de Petri descartáveis estéreis (60 x 15 mm) com 15 ml de meio de cultura em cada placa, sendo 5 placas por tratamento com 10 explantes em cada placa.

Após a avaliação, os calos originados dos segmentos internodais e folhas foram transferidos para novo meio de cultura sem regulador de crescimento (MS0), permanecendo no escuro por mais uma semana e em seguida transferidos

para a condição de fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro por mais 30 dias, quando foram novamente avaliados em relação ao aspecto.

#### **2.4. Análise histológica**

Calo friável com agrupamentos celulares diferenciando-se do restante do calo obtido no tratamento com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ para explante caulinar foi fixado em FAA<sub>50</sub>, durante 24 horas no dessecador, sob vácuo e estocado em etanol 70%. O calo foi em seguida desidratado em série etílica e incluído em metacrilato (Historesin, Leica), preparado conforme instrução do fabricante. O bloco foi cortado longitudinalmente (5 $\mu\text{m}$  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<sup>®</sup>).

As observações e a documentação fotográfica foram feitas 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 E DISCUSSÃO**

Com relação à porcentagem de calejamento em explante foliar do clone 1, nos tratamentos com dicamba e picloran, esta porcentagem foi, em sua maioria, baixa para todos os tratamentos com frio (Figura 1). Melhores índices de calejamento foram observados no tratamento com apenas TDZ em explantes obtidos de plantas que foram mantidas por 1 dia na temperatura de 4 °C, com 88% dos calos com intensidade média de calejamento e 11% dos calos com intensidade alta. Para este tratamento, o tempo de 4 dias na geladeira afetou a intensidade de calejamento, tendo sido observado um aumento de calos na intensidade baixa. Para o tratamento com TDZ + ZEA, com o aumento do tempo em temperatura de 4 °C houve uma diminuição no calejamento dos explantes. Para o clone 2 predominou a intensidade baixa de calejamento em todos os

tratamentos, com os melhores resultados observados nos tratamentos com TDZ + ZEA em 1 dia de temperatura baixa e com apenas TDZ em 4 dias na temperatura de 4°C.

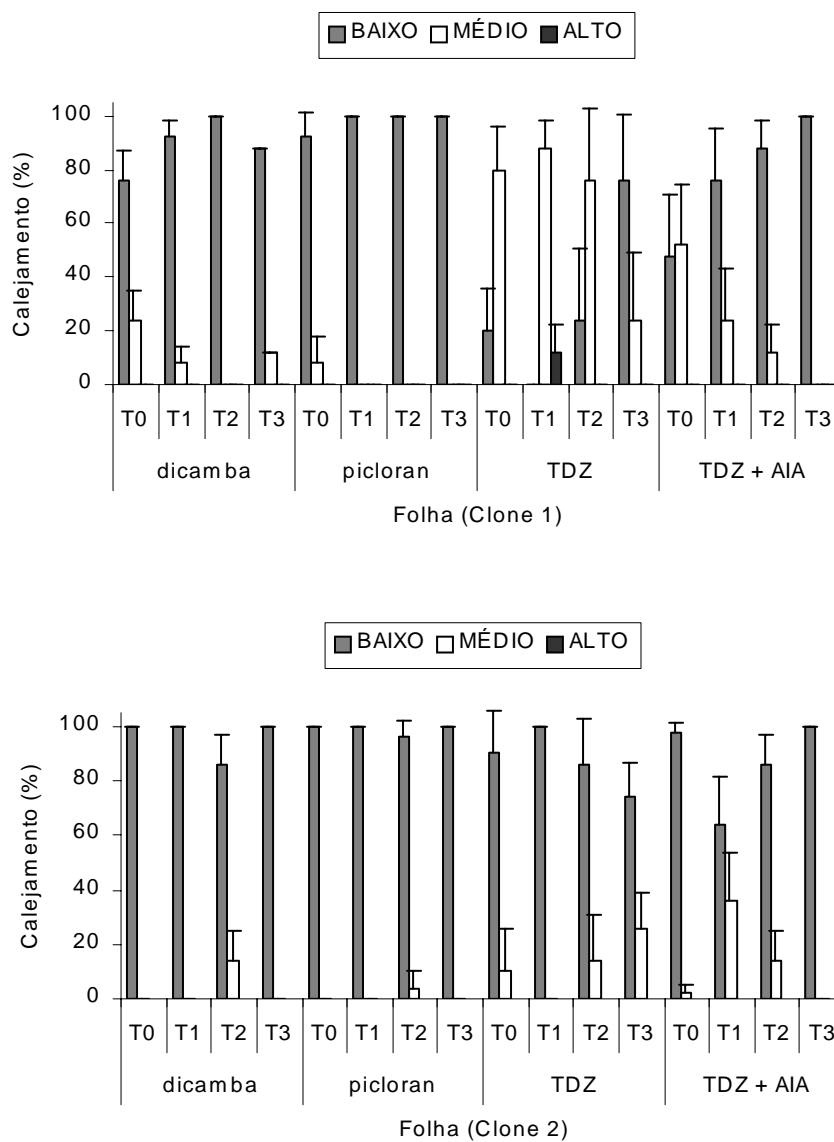


Figura 1- Porcentual de calejamento em folhas de dois clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* em meio de cultura MS, nos pré-tratamentos a 4°C (0= testemunha; 1= 1 dia; 2= 2 dias e 3= 4 dias) e reguladores de crescimento (0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba; 5 mg L<sup>-1</sup> de picloran; 1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ e 2 mg L<sup>-1</sup> de TDZ +0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA). As barras indicam o desvio das médias.

Em explante caulinar, nos tratamentos com dicamba e picloran para os dois clones e diferentes pré-tratamentos com frio, observou-se, em sua maioria, intensidade baixa de calejamento (Figura 2). Para o tratamento com TDZ no clone

1, os pré-tratamentos com frio de 1 e 2 dias apresentaram calos na intensidade alta de calejamento e, respectivamente, 30 e 49% de calos na intensidade média, mostrando melhor resposta no calejamento, quando comparado com o tratamento de TDZ + AIA. Para o clone 2, nos tratamentos com TDZ e TDZ + AIA, observou-se calejamento nas três intensidades, com exceção do pré-tratamento com frio de 1 dia em TDZ + AIA, em que predominou o calejamento na intensidade baixa.

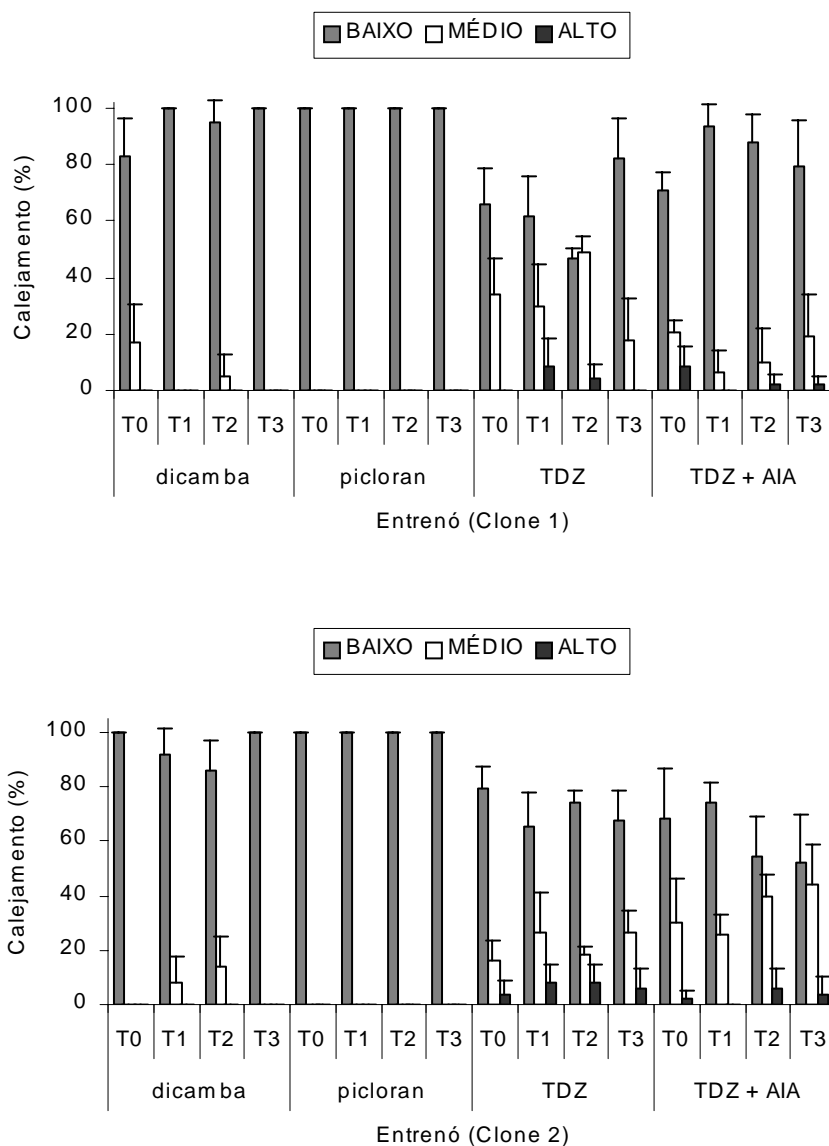


Figura 2- Porcentual de calejamento em entrenós de dois clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* em meio de cultura MS, nos pré-tratamentos a 4°C (0= testemunha; 1= 1 dia; 2= 2 dias e 3= 4 dias) e reguladores de crescimento (0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba; 5 mg L<sup>-1</sup> de picloran; 1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ e 2 mg L<sup>-1</sup> de TDZ +0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA). As barras indicam o desvio das médias.



Com relação à textura dos calos nos diferentes tratamentos, verificou-se para o clone 1, tanto para explantes foliares quanto para internodais, que os calos formados nos tratamentos com dicamba e picloran apresentaram, em sua maioria, calos compactos e semicompactos, e, nos tratamentos com dicamba para os dois tipos de explantes, observou-se aumento na formação de calos compactos com 2 e 3 dias de pré-tratamento a 4 °C (Figura 3).

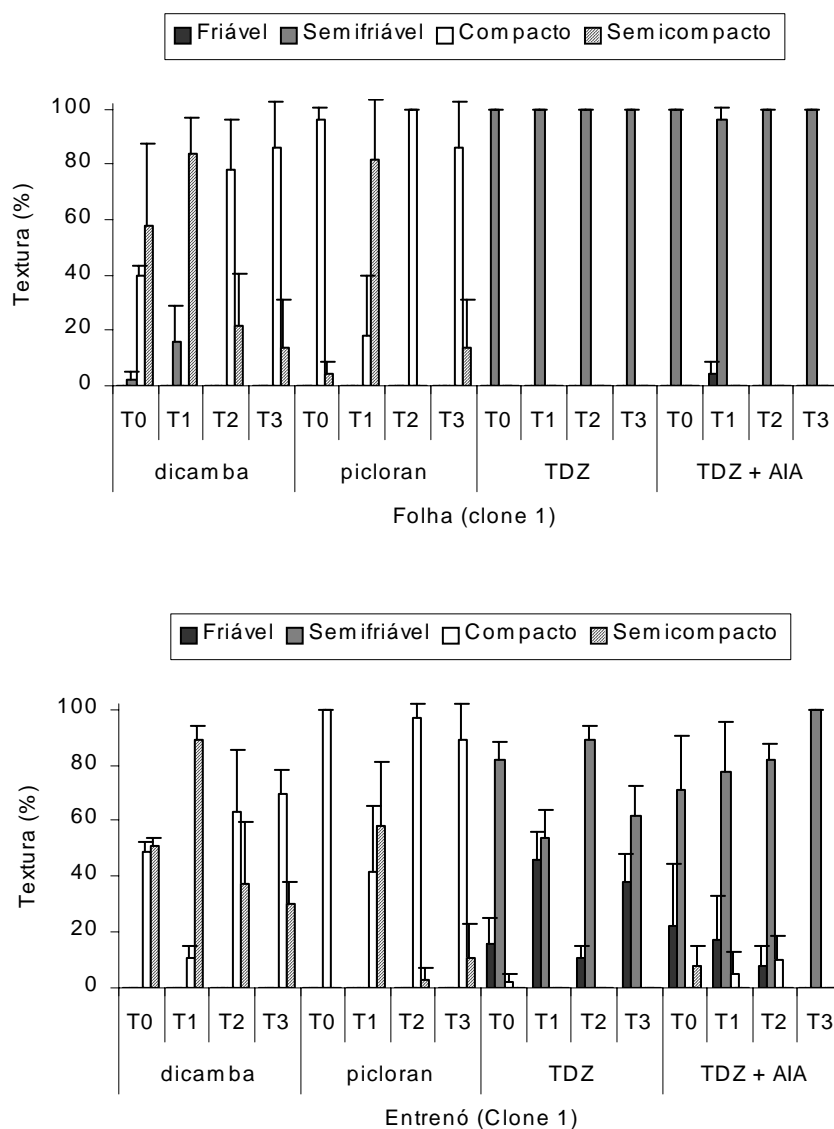


Figura 3- Textura observada em calos obtidos de folhas e entrenós do clone 1 híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* em meio MS nos pré-tratamentos a 4 °C (0= testemunha; 1= 1 dia; 2= 2 dias e 3= 4 dias) e reguladores de crescimento (0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba; 5 mg L<sup>-1</sup> de picloran; 1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ e 2 mg L<sup>-1</sup> de TDZ +0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA). As barras indicam os desvios das médias.

Nos tratamentos com picloran, a maior porcentagem de calos semicompactos foi observada no pré-tratamento de 2 dias a 4 °C para os dois tipos de explantes, predominando nos demais tratamentos calos compactos. Para os tratamentos com TDZ e TDZ + AIA, em explante foliar predominou a textura semifriável; no explante internodal, observou-se a formação de calos friáveis e semifriáveis para estes reguladores, sendo que a maior porcentagem de calos friáveis foi observada com pré-tratamento de 1 dia a 4°C, para TDZ.

Para o clone 2, a textura para os tratamentos com dicamba e picloran nos dois explantes foi a compacta nos diferentes pré-tratamentos a 4 °C. Nos tratamentos com TDZ e TDZ + AIA, para folha, a textura observada em sua totalidade foi a semifriável, e, para entrenós, observou-se a formação de calos friáveis e semifriáveis, com a maior porcentagem de calos friáveis (48,4%) no tratamento com TDZ sem pré-tratamento com frio (Figura 4).

Com relação à oxidação fenólica, para explante foliar do clone 1, nos tratamentos com picloran e dicamba, observou-se predominância de calos com nível médio de oxidação nos diferentes pré-tratamentos com frio. Contudo, no tratamento de 4 dias a 4 °C para dicamba, 58% dos calos apresentavam níveis baixos de oxidação. Não foi observada oxidação fenólica nos tratamentos com TDZ, exceto para 1 dia a 4 °C com 22% de calos oxidados somente no nível baixo. Nos tratamentos com TDZ + AIA, o tratamento sem exposição ao frio não apresentou oxidação fenólica, e nos demais somente nível baixo de oxidação. Para explante internodal no clone 1, predominou nível médio de oxidação, salvo para os tratamentos com TDZ + AIA, nos quais foram observados somente calos com nível baixo de oxidação (Figura 5).

No clone 2, para calos obtidos de folhas, 100% de nível alto de oxidação foi observado em todos os tratamentos com picloran e dicamba sem pré-exposição ao frio. Nos demais tratamentos com dicamba, predominaram níveis médios de oxidação. Para calos formados em meio com TDZ, predominaram níveis baixos de oxidação, enquanto para calos em TDZ + AIA, apenas no tratamento com 4 dias a 4 °C os calos estavam 100% na classe baixa de oxidação. Nos demais tratamentos com frio para este regulador, predominou o nível médio. Em calos obtidos de segmentos internodais, foram observadas altas porcentagens de calos com nível alto de oxidação nos diferentes tratamentos com frio para dicamba,

picloran e TDZ, predominando o nível médio de oxidação nos 4 tratamentos com frio para TDZ + AIA (Figura 6).

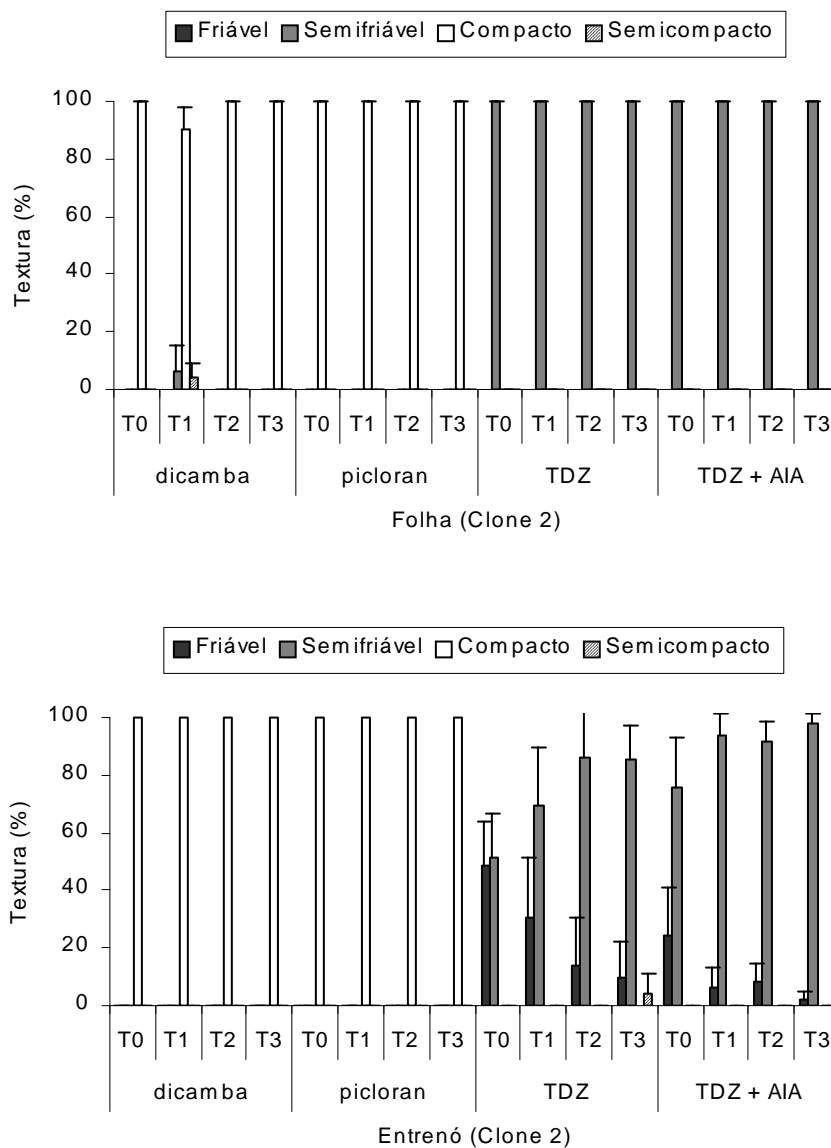


Figura 4- Textura observada em calos obtidos de folhas e entrenós do clone 2 híbrido de *Eucalyptus urophylla* em meio MS nos pré-tratamentos a 4°C (0= testemunha; 1= 1 dia; 2= 2 dias; e 3= 4 dias) e reguladores de crescimento (0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba; 5 mg L<sup>-1</sup> de picloran; 1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ; e 2 mg L<sup>-1</sup> de TDZ +0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA). As barras indicam os desvios das médias.

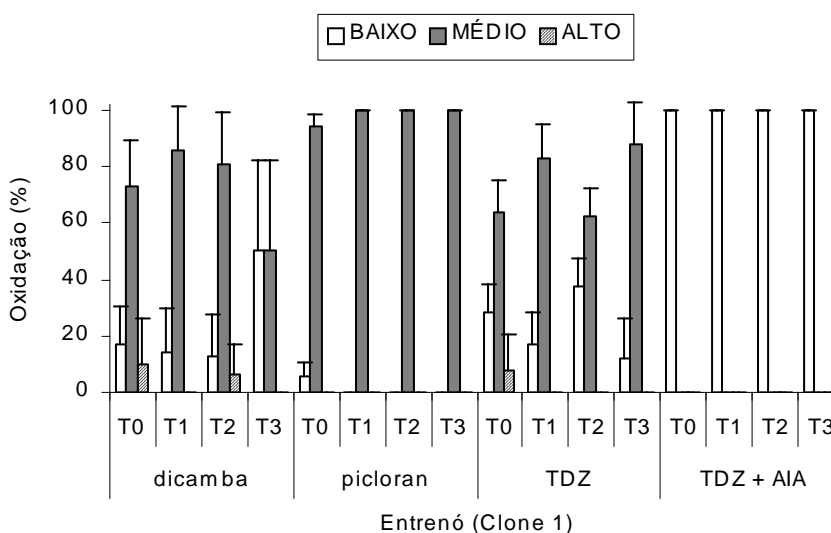
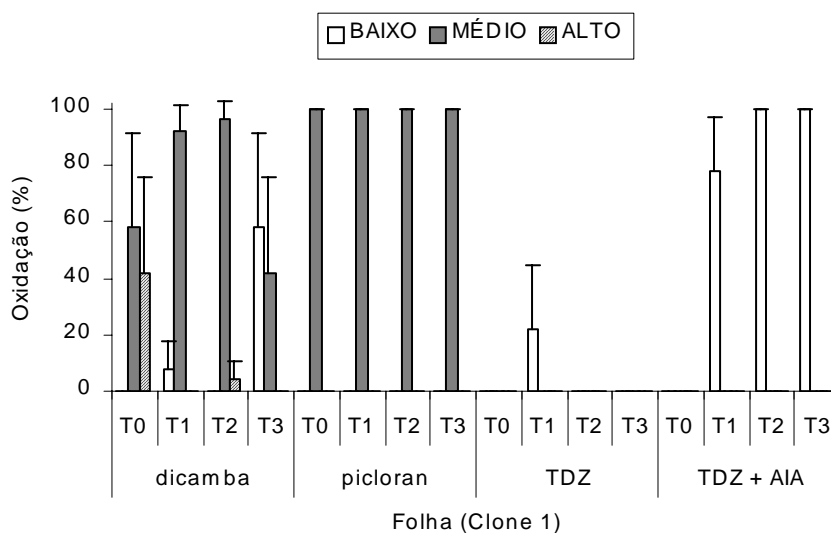


Figura 5- Oxidação observada em calos obtidos de folhas e entrenós do clone 1 híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* em meio MS nos pré-tratamentos a 4°C (0= testemunha; 1= 1 dia; 2= 2 dias; e 3= 4 dias) e reguladores de crescimento (0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba; 5 mg L<sup>-1</sup> de picloran; 1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ; e 2 mg L<sup>-1</sup> de TDZ +0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA). As barras indicam os desvios das médias.

Somente o clone 1 apresentou rizogênese nos tratamentos com dicamba, em que para explantes foliares observou-se a formação de raízes nas intensidades baixa e média (Figura 7). Nos explantes internodais houve a formação de raízes em nível baixo de intensidade em meio com dicamba em 2% dos calos com a exposição de 1 dia à temperatura de 4 °C e 2% com a exposição

de 2 dias à temperatura de 4 °C. Não foi observada formação de raízes em nenhum tratamento para o clone 2.

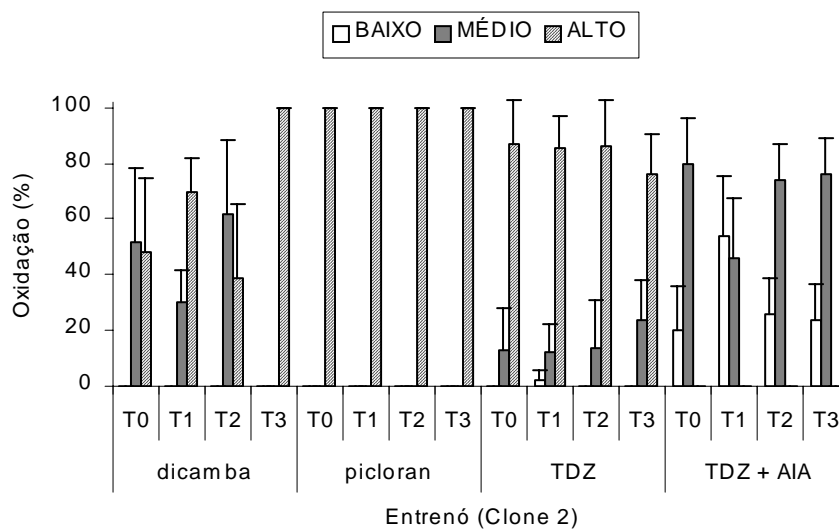
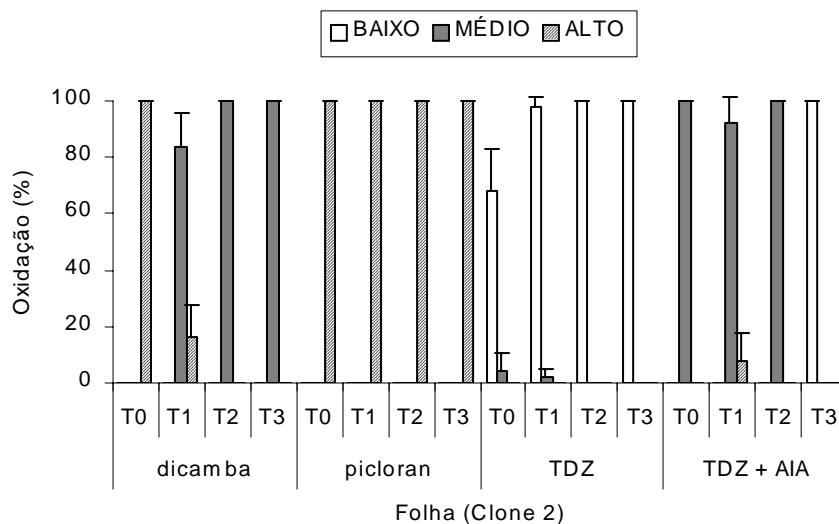


Figura 6- Oxidação observada em calos obtidos de folhas e entrenós do clone 2 híbrido de *Eucalyptus urophylla* em meio MS nos pré-tratamentos a 4°C (0= testemunha; 1= 1 dia; 2= 2 dias; e 3= 4 dias) e reguladores de crescimento (0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba; 5 mg L<sup>-1</sup> de picloran; 1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ; e 2 mg L<sup>-1</sup> de TDZ +0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA). As barras indicam os desvios das médias.

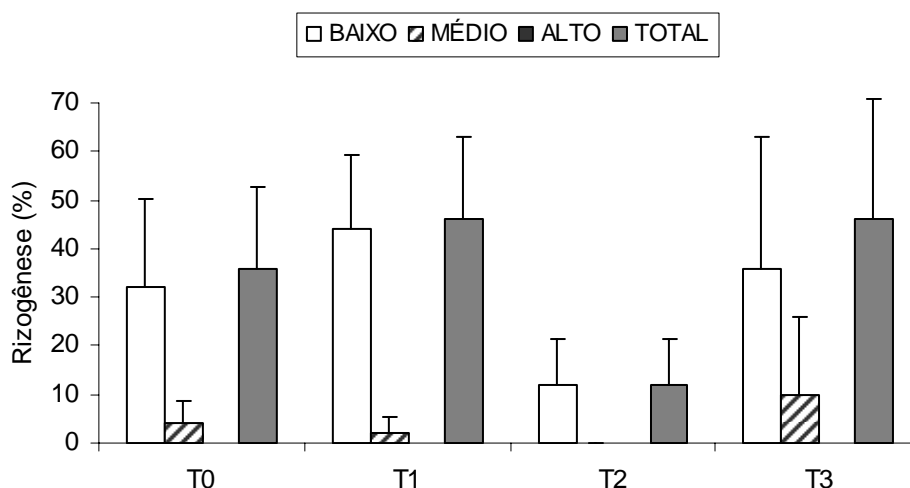


Figura 7- Formação de raízes em calos formados de explante foliar para o clone de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* em meio MS com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de dicamba nos pré-tratamentos a  $4^{\circ}\text{C}$  (T0= testemunha; T1= 1 dia; T2= 2 dias; e T3= 4 dias). As barras indicam os desvios das médias.

Dois calos friáveis obtidos a partir de explantes internodais de um dos clones e cultivados na presença de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ sem pré-tratamento a  $4^{\circ}\text{C}$  apresentaram aglomerados celulares diferenciados do restante do calo. Através de análise histológica de um dos calos, foi possível observar regiões celularizadas assemelhando-se a massas pró-embriogênicas que se distinguiram do restante do calo por apresentar células menores com citoplasma denso e núcleo proeminente, indicando divisão celular ativa (Figura 8).

Figuerola et al. (2002) demonstraram que o primeiro estágio embriogênico alcançado dentro da primeira semana de cultura em um meio de indução embriogênico para *Coffea arabica* foi caracterizado por células com proeminentes núcleos e nucléolos, um citoplasma denso e parede celular mais densa que o normal. Estas células eram relativamente isodiamétricas e pequenas em relação às células vizinhas. Os autores sugerem que os embriões tenham sido desenvolvidos de células individuais de aglomerações previamente formadas, ficando claro para cafeeiro que os centros meristemáticos que conduziram a estádios globulares foram originados de células individuais na região do mesófilo.

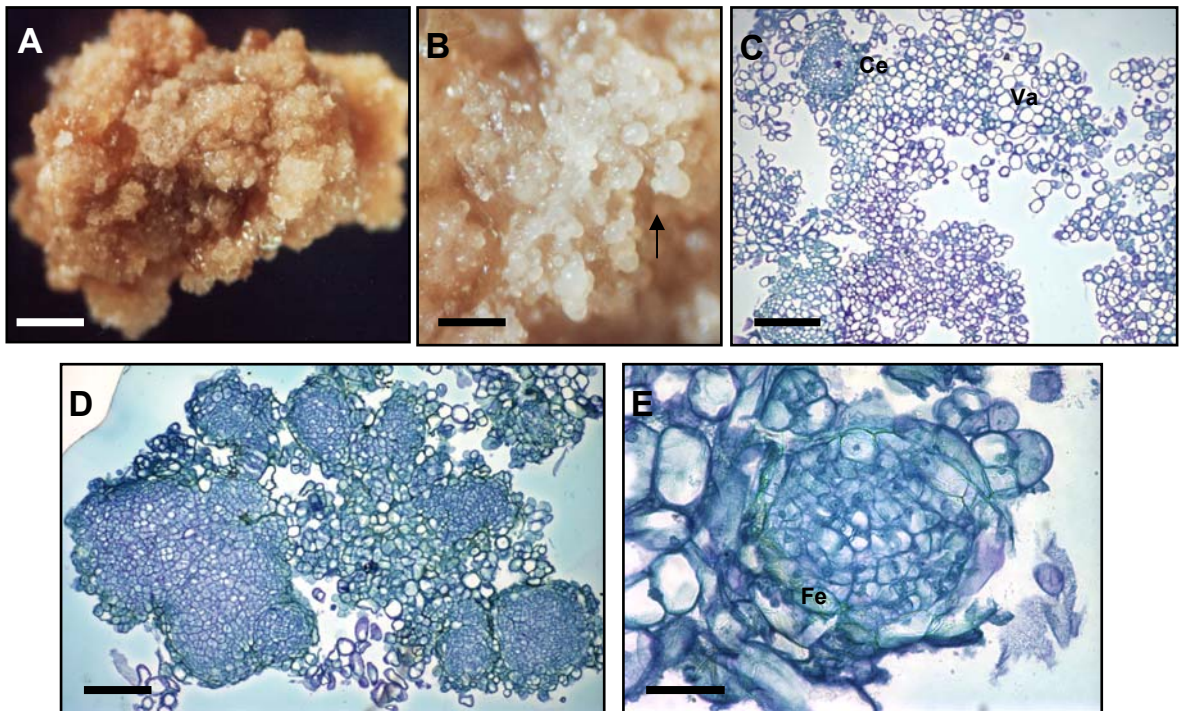


Figura 8- Calo friável e secção longitudinal corada com azul de toluidina obtida de entrenó de clone híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. A) aspecto geral de calo friável (Barra= 20  $\mu$ m); B) regiões diferenciadas na superfície do calo (Barra= 80  $\mu$ m); C) Regiões celularizadas (Ce) apresentando células menores com citoplasma denso e núcleo proeminente indicando intensa divisão celular, diferenciando-se de regiões com células maiores e grandes vacúolos (Va) (Barra= 450  $\mu$ m); D) detalhe de regiões celularizadas (Barra= 250  $\mu$ m); e E) Presença de compostos fenólicos (Fe) circundando região celularizada (Barra= 50  $\mu$ m).

No presente trabalho foram obtidas em calos de entrenós regiões celularizadas que se diferenciavam do restante do calo por apresentar células pequenas com citoplasma denso e núcleos proeminentes, sugerindo tratar-se de regiões pró-embriogênicas.

Para *Foeniculum vulgare*, calos esbranquiçados formados na superfície de calos primários, após 12 meses de cultura, apresentavam aglomerações de células muito compactas ou massas pró-embriogênicas que depois de transferidos para meio isento de regulador davam origem a estruturas pró-embriogênicas que, posteriormente, formavam embriões somáticos maduros. Os autores afirmam que o processo que conduziu à embriogênese somática parece consistir de uma formação progressiva de numerosos grupos celulares meristemáticos que tornaram zonas embriogênicas iniciais hábeis para se desenvolver em embriões somáticos (Anzidei et al., 2000).

Um dos calos apresentando nestas regiões diferenciadas foi transferido para meio MS sem reguladores de crescimento (MS0) e, após o período de uma semana no escuro, transferido para condição luminosa. No entanto, não houve desenvolvimento dessas regiões em estruturas pró-embriogênicas, provavelmente devido à intensa produção de compostos fenólicos após a transferência para a luz. Os calos dos demais tratamentos após ser transferidos para meio MS0 também apresentaram intensa produção de compostos fenólicos, não sendo observadas estruturas embriogênicas.

Baixas temperaturas como fator de estresse na indução de embriogênese somática foram utilizadas por Luo et al. (2003) em suspensão celular de *Astragalus adsurgens* obtida de calos embriogênicos, tendo esta planta apresentado um aumento na capacidade de formar embriões somáticos após tratamento a 8 °C por 2 a 3 semanas. A iniciação de embriogênese somática em *Asparagus officinalis*, tendo como fonte de explantes micrósporos, melhorou quando as gemas florais foram submetidas a um pré-tratamento a 4 °C por um período de 7 a 9 dias (Peng e Wolyn, 1999). Espigas de trigo armazenadas por até 2 semanas em temperatura de 4 °C melhoraram a indução de calos embriogênicos e a frequência de sua conversão em embriões imaturos de determinados genótipos (Maës et al., 1996).

No presente trabalho, a utilização de um pré-tratamento com frio das plantas doadoras de explantes não proporcionou variação de resposta quanto ao efeito deste nível de estresse na obtenção de embriões somáticos. Embora tenha havido diferenças quanto à intensidade de calejamento, textura e oxidação nos diferentes tratamentos com reguladores utilizados, a pré-exposição das plantas doadoras de explante à temperatura de 4 °C não exerceu influência de forma significativa nestas respostas.

O TDZ tem se mostrado eficiente na iniciação de embriogênese somática em espécies lenhosas, como em *Acacia mangium* (Xie e Hong, 2001). Os resultados obtidos demonstraram ser essa citocinina um importante regulador de crescimento para fins de embriogênese somática para explantes adultos de *Eucalyptus*, e na concentração utilizada no presente estudo promoveu a formação de regiões celularizadas semelhantes a regiões pró-embriogênicas.



#### 4. CONCLUSÕES

A utilização de estresse proporcionado pelo pré-tratamento a 4 °C das plantas doadoras de explantes não apresentou resultado satisfatório na indução da embriogênese somática em explantes foliares e internodais obtidos dos dois clones de híbridos de *Eucalyptus urophylla*.

Para um dos clones, foi observada formação de aglomerados celulares em calos friáveis, cultivados em meios de cultura contendo 1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ, assemelhando-se a massas pró-embriogênicas, demonstrando ser esta citocinina promissora no desenvolvimento de um protocolo de embriogênese somática para material adulto de *Eucalyptus*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZIDEI, M.; BENNICI, A.; SCHIFF, S.; TANI, C.; MORI, B. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*: histological observations of developing embryogenic callus. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.61, p.69-79, 2000.

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.

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.

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)

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; ÖTVÖS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia, Bratislava**, v.57, n.1, p.5-12, 2002.

FIGUEROA, F. R. Q.; CERDA, C. F. J. F.; HERRERA, R. R.; VARGAS, V. M. L. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports**, v.20, p.1141-1149, 2002.

GAJ. M. D. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Growth Regulation**, v.43, p.27-47, 2004.

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.

INDRIANTO, A.; BORS, E. H.; TOURAEV, A. Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores. **Plant Science**, v.143, p.71-79, 1999.

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.

LUO, J. P.; JIANG, S. T.; PAN, L. J. Cold-enhanced somatic embryogenesis in cell suspension cultures of *Astragalus adsurgens* Pall.: relationship with exogenous calcium during cold pretreatment. **Plant Growth Regulation**, v.40, p.171-177, 2003.

MAËS, O. C.; CHIBBAR, R. N.; CASWELL, K.; LEUNG, N.; KARTHA, K. K. Somatic embryogenesis from isolated scutella of wheat: effects of physical, physiological and genetic factors. **Plant Science**, v.121, p.75-84, 1996.

MURALIDHARAN, E. M.; MASCARENHAS, A. F. *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. **Plant Cell Reports**, v.6, p.256-259, 1987.

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v.34, p.267-275, 1998.

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.

OBERT, B.; DEDICOVÁ, B.; HRICOVÁ, A.; SAMAJ, J.; PRET'OVÁ, A. Flax anther culture: effect of genotype, cold treatment and media. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.233-238, 2004.

O'BRIEN, T.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure principles and selected methods**. Melbourne: Temarcarphi Pty Ltda, 1981. 45p.

PENG, M.; WOLYN, D. J. Improved callus formation and plant regeneration for shed microspore culture in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). **Plant Growth Regulation**, v.40, p.171-177, 2003.

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

PRAKASH, M. G.; GURUMURTHI, K. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis* Sm. **Current Science**, v.88, n.8, p.1311-1316, 2005.

RODRÍGUES, R.; ALVAREZ, C.; CENTENO, M. L.; BERROS, B.; RODRÍGUES, A. Embriogénesis somática y estrategias para superar las limitaciones en leñosas. In: SÁNCHEZ-OLATE, M. E.; LEAL, D. G. R. (eds.). **Biología Vegetal en Especies Leñosas de Interés Forestal**. Concepción: Inprenta Austral, 2005. p. 63-77.

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

TERMIGNONI, R. R.; WANG, P. J.; HU, C .Y. 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. **Indução de embriogênese somática em *Eucalyptus grandis***. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2005. 106p. Tese (Doutorado em Ciência Florestal)-Universidade Federal de Viçosa, 2005.

VISSER, C.; QURESHI, A.; GILL, R.; SAXENA, P. K. Morphoregulatory role of thidiazuron. **Plant Physiology**, v.99, p.1704-1707, 1992.

VON ADERKAS, P.; BONGA, J. M. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. **Tree Physiology**, v.20, p.921-928, 2000.

XIE, D.; HONG, Y. Regeneration of *Acacia mangium* through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.20, p.34-40, 2001.

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. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. **American Journal of Botany**, v.30, p.33-36, 1943.

## CAPÍTULO IV

### **TIBA, ácido salicílico e ácido acetil salicílico na indução de calos embriogênicos em cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus urophylla***

RESUMO: Este trabalho objetivou avaliar o efeito da utilização da anti-auxina TIBA (2,3,5-ácido triodobenzóico) e dos ácidos salicílico e acetil salicílico na indução de calos embriogênicos de *Eucalyptus urophylla*. Quatro concentrações de TIBA (0; 0,25; 0,75; e 1 mg L<sup>-1</sup>) foram utilizadas em calos obtidos de cotilédones e hipocótilos induzidos em meio MS contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba, 5 mg L<sup>-1</sup> de picloram e 5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. A utilização da anti-auxina proporcionou aumento na intensidade de calejamento, principalmente em calos friáveis e semifriáveis. Nas concentrações de 0,75 e 1 mg L<sup>-1</sup>, pôde ser observado que calos semifriáveis passaram para a textura friável e adquiriram uma coloração amarelo brilhante principalmente em calos provenientes de tratamento com dicamba. A utilização dos ácidos salicílico e acetil salicílico não promoveu nenhuma resposta adicional em calos obtidos de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba. Não foi observada formação de embriões somáticos ou estruturas embriogênicas.

### **1. INTRODUÇÃO**

A embriogênese somática é um importante método para propagação de plantas-elite *in vitro*, em larga escala (Guerra et al., 1999), sendo apontada como uma técnica de clonagem em massa de baixo custo, desde que superadas as limitações inerentes a algumas espécies, tais como baixa frequência de embriões somáticos, fidelidade genética e crescimento normal de plântulas e plantas (Bajaj, 1995). Na propagação clonal de *Eucalyptus*, a embriogênese somática tem sido apontada como uma tecnologia promissora na área florestal, principalmente no que se refere à multiplicação de clones selecionados que apresentem dificuldades de ser propagados por outras técnicas, aliada à possibilidade de obter plantas geneticamente modificadas.

Alguns compostos que em testes em plantas inteiras ou partes de plantas parecem agir como anti-auxinas ou inibir o movimento de transporte de auxinas têm sido utilizados em experimentos com cultura de tecidos, mas a compreensão do modo de ação destas substâncias não está completamente esclarecida. Compostos como TIBA (2,3,5-ácido triodobenzóico) se ligam aos transportadores de auxina, impedindo seu movimento, agindo diretamente nos sítios de receptores de auxinas que podem deslocar auxinas como AIA e ANA (Taiz e Zeiger, 2002).

O efeito das substâncias inibidoras do transporte polar de auxinas na embriogênese somática tem sido confuso, em alguns casos TIBA tem sido mais efetivo que auxinas em induzir a formação de calos e embriões somáticos. Em contrapartida, a necessidade de auxinas na embriogênese somática tem sido estabelecida em diversas plantas pelo uso de inibidores do transporte polar de auxina e de substâncias com propriedades anti-auxínicas (Jiménez, 2005).

Tem sido reportado que substâncias inibidoras do transporte de auxina, como TIBA, estimulam o aumento dos níveis de AIA dentro da célula em suspensões celulares, particularmente quando o pH do meio está baixo. O efeito dessas substâncias na embriogênese somática tem sido confuso. Em alguns casos, TIBA tem sido mais efetivo que auxinas em induzir a formação de calos e embriões somáticos (George, 1993). A presença de TIBA como uma substância anti-auxínica poderia conduzir as células a encontrar um balanço hormonal que favorecesse o surgimento de linhas celulares embriogênicas e sua evolução conversiva em plantas inteiras (Moghaddam et al., 2000).

Chen e Chang (2004), trabalhando com *Oncidium*, alcançaram embriogênese direta em meio de cultura contendo apenas TIBA (0,5  $\mu$ M), após 8 semanas de cultura. Esta substância anti-auxínica também tem sido utilizada na organogênese, como formação de gemas axilares. Singh e Syamal (2000), micropropagando gemas em roseira, observaram que o tratamento com TIBA proporcionou um aumento no número de folhas por gemas e conteúdo de clorofila foliar, assim como um efeito significativo no comprimento médio das gemas e número de folhas por explante. Meio de cultura contendo TIBA aumentou a resposta organogênica, assim como melhorou, a longo prazo, o potencial organogênico de calos de *Morus alba* (Bhau e Wakhlu, 2001).

Outros compostos como ácido salicílico e ácido acetil salicílico também têm sido utilizados em trabalhos de cultura de tecidos vegetais. O modo de ação do

ácido acetil salicílico e do ácido salicílico ainda não é conhecido e existe a necessidade de identificar sistemas regulados por estas substâncias, com maior ênfase na elucidação de seus papéis em respostas morfogênicas nas plantas (Hutchinson e Saxena, 1996).

Estudos têm demonstrado que o ácido salicílico e o ácido acetil salicílico desempenham ampla gama de funções nas plantas. Em várias espécies estes compostos são conhecidos por estimular o florescimento, formação de gemas e iniciação de raízes adventícias (Leslie e Romani, 1986). O ácido salicílico é uma importante molécula sinalizadora envolvida em respostas de defesa a patógenos e estresses abióticos. Estas substâncias têm sido utilizadas em trabalhos com embriogênese somática em espécies como milho, aveia, café e gerânio. Hao et al. (2006) observaram um aumento na embriogênese somática em aveia em meio enriquecido com ácido salicílico. Em cafeeiro, concentrações da ordem de picomolares de ácido salicílico proporcionaram um efeito positivo em culturas de suspensão celular, resultando em um incremento de duas vezes no crescimento celular e embriogênese somática, como também melhorou a sincronização do processo embriogênico (Figuerola et al., 2001).

Neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito da substância anti-auxínica TIBA, do ácido salicílico e do ácido acetil salicílico na indução de embriogênese somática em cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus urophylla*.

## **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 urophylla* oriundas da empresa International Paper do Brasil, localizada no município de Mogi Guaçu, São Paulo.

## 2.2. Obtenção dos explantes

As sementes utilizadas no presente trabalho foram inicialmente lavadas em água corrente por cerca de um minuto e, em seguida, levadas à câmara de fluxo laminar e desinfetadas com solução de álcool 70% (v/v) por 30 segundos e hipoclorito de sódio 5% (v/v), durante 15 minutos, sendo posteriormente enxaguadas seis vezes com água desionizada e autoclavada.

No processo de germinação das sementes, foi utilizado o meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), contendo metade da concentração dos sais e vitaminas, 50 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 1,5% de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar Merck®, o pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1 e autoclavado por 15 minutos.

As sementes foram transferidas para placas de Petri descartáveis estéreis (60 x 15 mm) contendo 15 mL de meio de cultura e vedadas com filme de PVC. Estas placas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro, com irradiância de 36 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, sendo utilizada lâmpada “luz do dia” branca fluorescente de 20 Watts, por um período 10 dias, até a completa germinação das sementes.

Foram utilizados como fonte de explantes segmentos de hipocótilos com cerca de 1,0 cm de comprimento e cotilédones totalmente expandidos, sendo estes explantes dispostos com a face abaxial em contato com o meio de cultura.

## 2.3. Indução de calos

Na indução de calos para os dois experimentos foi utilizado o meio de cultura composto pelos sais MS (Murashige e Skoog, 1962) e vitaminas White (White, 1943), acrescidos de 100 mg L<sup>-1</sup> mio inositol, 3% de sacarose, 2,9 g L<sup>-1</sup> de Phytigel® (Sigma), 0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba e pH ajustado para 5,7 ± 0,1.

No experimento com TIBA (2,3,5-ácido triodobenzóico), foram utilizados 3 reguladores de crescimento na indução de calos (0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba, 5 mg L<sup>-1</sup> de picloran e 5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D). Os explantes obtidos de cotilédones e hipocótilos foram colocados em placas de Petri descartáveis contendo 15 mL de meio de cultura e mantidas no escuro em sala de crescimento com temperatura de 27 ± 2 °C, por um período de 20 dias. Para esta fase do experimento, foi utilizado um número suficiente de explantes a fim de que se pudessem ter quantidades

necessárias de calos para serem subcultivados para os diferentes tratamentos com TIBA.

No experimento com ácido salicílico e ácido acetil salicílico, foi utilizado o regulador de crescimento dicamba na concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Os explantes foram colocados em meio de cultura com dicamba e 3 concentrações de ácido salicílico e ácido acetil salicílico ( $1, 3$  e  $6 \text{ mg L}^{-1}$ ) e mantidos por 3 dias no escuro em sala de crescimento com temperatura de  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após este período, os explantes foram transferidos para novo meio de cultura sem os ácidos salicílico e acetil salicílico e colocados nas mesmas condições anteriores.

#### **2.4. Condução e avaliações experimentais**

O delineamento estatístico utilizado nos dois experimentos foi o inteiramente casualizado.

Para o experimento com TIBA, após 20 dias de cultivo, foi feita uma avaliação de uma fração do material com relação ao percentual de calejamento, intensidade de calejamento, oxidação, textura, coloração e presença de estruturas embriogênicas. Os calos formados nos 3 tratamentos com reguladores foram transferidos para novo meio de cultura com 4 concentrações de TIBA ( $0; 0,25; 0,75; \text{ e } 1 \text{ mg L}^{-1}$ ), utilizando placas de Petri descartáveis ( $60 \times 15 \text{ mm}$ ) contendo  $15 \text{ mL}$  de meio de cultura com 10 explantes por placa e 5 placas por tratamento. Os calos foram mantidos no escuro em sala de crescimento com temperatura de  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por mais 30 dias, quando foi realizada nova avaliação quanto ao aspecto geral dos calos e à presença de estruturas embriogênicas.

No experimento com os ácidos salicílico e acetil salicílico, foram utilizadas placas de Petri descartáveis ( $60 \times 15 \text{ mm}$ ) contendo  $15 \text{ mL}$  de meio de cultura com 10 explantes por placa e 5 placas por tratamento. Após 30 dias de cultivo, foi realizada uma avaliação com relação ao percentual e à intensidade de calejamento, oxidação, textura, coloração e presença de estruturas embriogênicas. Os calos foram então transferidos para novo meio com  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  de dicamba e mantidos no escuro em sala de crescimento com temperatura de  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .



Para as avaliações visuais, foi utilizada lupa binocular com aumento de 10 vezes, e as avaliações dos níveis foram feitas por comparação, sendo discriminadas como baixa, média e alta. Para avaliação da textura, os calos foram classificados como friáveis (células frouxamente ligadas), compactos (células firmemente ligadas) e texturas

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. TIBA (2,3,5-ácido triodobenzóico)

A intensidade de calejamento nos 3 tratamentos com os reguladores de crescimento picloran, dicamba e 2,4-D foi, em sua maioria, baixa para os explantes cotiledonares e de hipocótilo. Não foram observados, aos 20 dias de cultura, calos com nível alto de oxidação (Figura 1). Em geral a textura dos calos variou pouco com relação às 3 auxinas utilizadas. Para cotilédones predominaram as texturas compacta e semicompacta nos tratamentos com dicamba e picloran, e semicompacta e semifriável para 2,4-D. Em hipocótilos predominou a textura compacta, contudo, foram observados calos nas 4 categorias de textura (Figura 2).

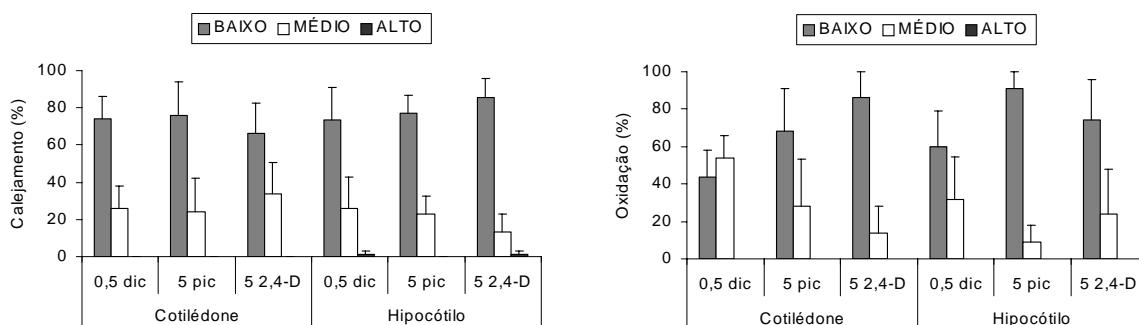


Figura 1- Intensidade de calejamento e níveis de oxidação dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus urophylla* aos 20 dias de cultivo em meio MS nos tratamentos com os reguladores de crescimento dicamba ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), picloran ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) e 2,4-D ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ). As barras indicam o desvio das médias

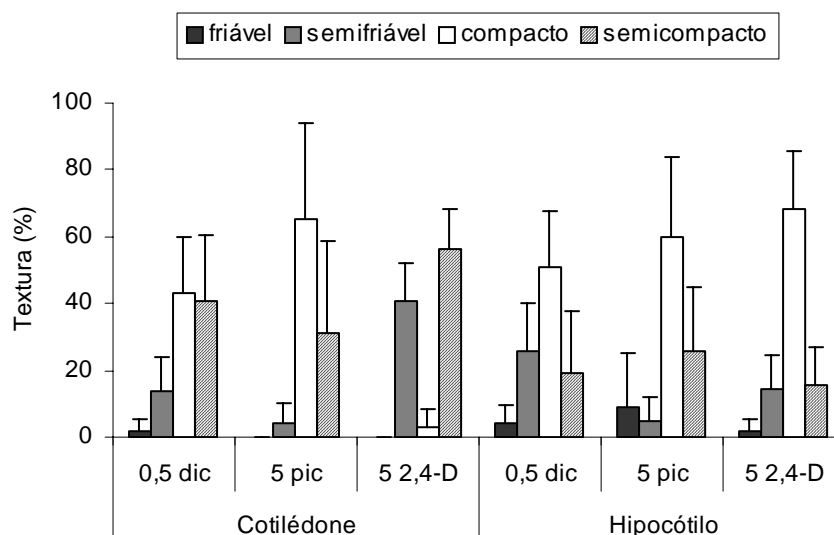


Figura 2- Textura dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus urophylla* aos 20 dias de cultura em meio MS nos tratamentos com os reguladores de crescimento dicamba ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), picloran ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) e 2,4-D ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ). As barras indicam o desvio das médias.

Após a transferência para o meio com diferentes concentrações de TIBA, observou-se aumento do calejamento nos dois tipos de explantes se comparado com o controle, principalmente nos calos friáveis e semifriáveis, assim como uma modificação na sua textura. Observou-se que, na concentração de  $0,75 \text{ mg L}^{-1}$  de TIBA, uma porcentagem de calos semifriáveis passou para a textura friável (Figura 3), fato também observado com a concentração de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , porém, em menor intensidade. Esta modificação na textura e intensidade de calejamento foi observada para os 3 reguladores de crescimento utilizados, porém, foi mais intenso nos tratamentos com dicamba.

Os calos de textura friável e semifriável nos tratamentos de  $0,75$  e  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de TIBA apresentaram, ao final de 50 dias, melhor aspecto quando comparados aos de textura compacta e semicompacta. Estes calos tenderam a se oxidar menos ou a não exibir oxidação. E, em geral, especialmente com relação aos calos friáveis, eles se apresentaram em sua maior parte na classe de intensidade alta de calejamento. No trabalho de Moghaddam et al. (2000), folhas jovens de beterraba germinadas em meio de cultura contendo  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de TIBA, utilizadas como fonte de explantes e induzidas à calogênese em meio de cultura com  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP, proporcionaram calos amarelos brilhantes e de bom aspecto,

contrastando com plântulas obtidas de sementes germinadas em meio sem TIBA, que eram marrom- escuras em sua maioria.



Figura 3- Aspecto geral de calo friável obtido de hipocótilo de *Eucalyptus urophylla* induzido em meio com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba e transferido para 0,75 mg L<sup>-1</sup> de TIBA. Barra= 20µm.

Os calos friáveis e semifriáveis, quando subcultivados em novo meio com TIBA, mantiveram a tendência de se multiplicar a uma alta taxa, porém, após o segundo subcultivo no meio com TIBA, os calos não apresentaram mais crescimento e tenderam a se oxidar. Observou-se maior oxidação na parcela dos calos colocados em condição de fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro, com irradiância de 36 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

A utilização de TIBA em trabalhos com embriogênese somática foi reportada por Kulshreshtha e Coutts (1997) para a cultura de beterraba, em que um breve tratamento de 2 semanas em meio com 2,4-D e BAP e subsequente exposição dos explantes ao TIBA foi crucial para a indução direta de embriões somáticos. Esses autores demonstraram que não somente é necessário remover auxinas adicionadas ao meio de cultura, como também bloquear a disponibilidade de auxinas endógenas para induzir à embriogênese somática nesta espécie. Em *Eleutherococcus senticosus*, contudo, a presença de TIBA suprimiu a formação de embriões em células embriogênicas, porém, não afetou a divisão celular (Choi et al., 2001) em *Picea abies*. Ramarosandratana e Van Staden (2004) concluíram

que a adição de TIBA não afetou de forma significativa as taxas de iniciação de embriogênese somática, não importando a auxina utilizada.

Explantos obtidos de cotilédones e hipocótilos em *Eucalyptus urophylla* e induzidos à calogênese em 0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba, 5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 5 mg L<sup>-1</sup> de picloran e transferidos para novos meios de cultura com TIBA não proporcionaram a formação de embriões somáticos. Entretanto, a presença de TIBA nas concentrações de 0,75 e 1 mg L<sup>-1</sup> promoveu um aumento na intensidade de calejamento e mudança na textura dos calos.

### **3.2 Ácidos salicílico e acetil salicílico**

Os calos formados nos diferentes tratamentos com ácido salicílico e ácido acetil salicílico para explantes obtidos de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus urophylla* foram, em sua maioria, de baixa intensidade, e as diferentes concentrações dessas substâncias não influenciaram na formação e crescimento dos calos obtidos (Figura 4). Figueroa et al. (2001), trabalhando com culturas de suspensão celular embriogênica em cafeeiro tratadas com 10<sup>-12</sup> M de ácido salicílico, observaram um efeito significativo nas taxas de crescimento, quando comparado com o controle sem essa substância. A utilização do ácido salicílico proporcionou um efeito dramático, tanto no número, quanto na qualidade de embriões somáticos formados, em termos de tamanho e desenvolvimento de embriões, causando um aumento de duas vezes em ambos os processos.

A utilização de ácido salicílico e ácido acetil salicílico na cultura de tecidos tem sido reportada em algumas espécies. Hutchinson e Saxena (1996), trabalhando com hipocótilo de gerânio, observaram que a utilização de 10 µM de TDZ + 10 µM de ácido acetil salicílico por 3 dias e posterior transferência para meio sem regulador e sem o ácido acetil salicílico proporcionou um aumento em duas vezes o número de embriões somáticos e sincronização durante o desenvolvimento do embrião se comparado ao tratamento utilizando somente o regulador; e que o ácido salicílico foi ineficiente em modular resposta embriogênica similar ao ácido acetil salicílico.

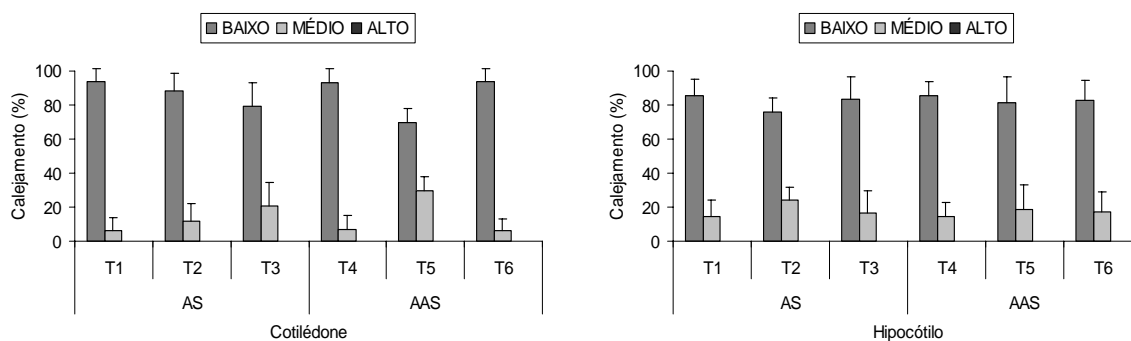


Figura 4- Intensidade de caleijamento dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus urophylla* em meio com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de dicamba expostos aos pré-tratamentos com ácido salicílico AS (T1=  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ; T2=  $3 \text{ mg L}^{-1}$ ; T3=  $6 \text{ mg L}^{-1}$ ) e ácido acetil salicílico AAS (T4=  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ; T5=  $3 \text{ mg L}^{-1}$ ; T6=  $6 \text{ mg L}^{-1}$ ). As barras indicam o desvio das médias.

No presente trabalho, o pré-tratamento com ácido salicílico e ácido acetil salicílico não afetou de forma significativa a textura dos calos (Figura 5), sendo produzidos, em sua maioria, calos compactos, não sendo observado nenhum calo com textura friável. O uso dessas substâncias também se mostrou ineficiente na indução da embriogênese somática não sendo observada a formação de estruturas embriogênicas em nenhum tratamento utilizado.

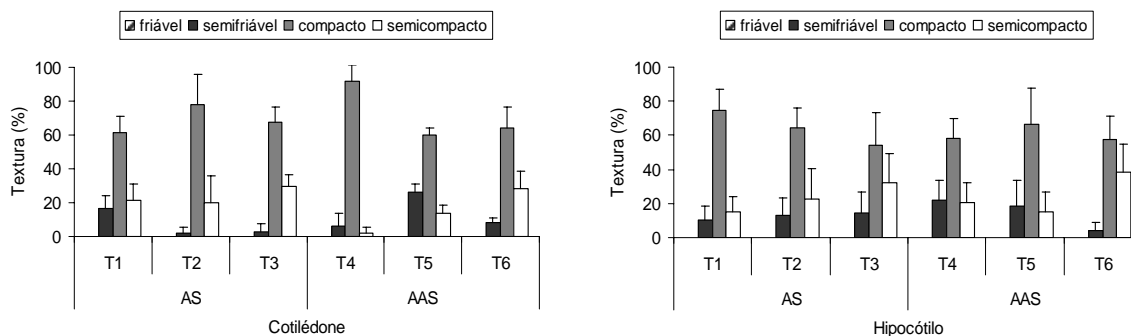


Figura 5- Textura dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus urophylla* em meio com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de dicamba expostos aos pré-tratamentos com ácido salicílico AS (T1=  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ; T2=  $3 \text{ mg L}^{-1}$ ; T3=  $6 \text{ mg L}^{-1}$ ) e ácido acetil salicílico AAS (T4=  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ; T5=  $3 \text{ mg L}^{-1}$ ; T6=  $6 \text{ mg L}^{-1}$ ). As barras indicam o desvio das médias.

Com relação à oxidação fenólica, predominou o nível baixo de oxidação para hipocótilo, com exceção do T4. Calos formados de explante cotiledonar apresentaram níveis maiores de oxidação e uma maior porcentagem de calos no nível alto de oxidação (Figura 6). Para este tipo de explante, o tratamento T4

exibiu as menores porcentagens de calos com nível baixo e as maiores porcentagens no nível alto de oxidação.

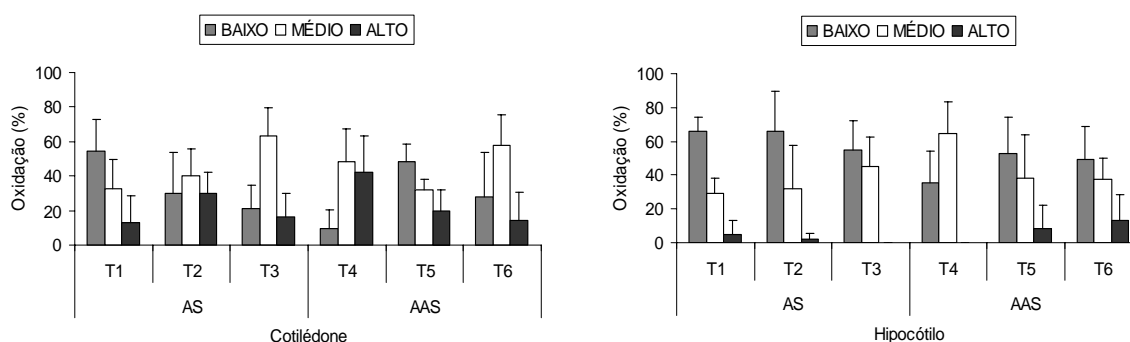


Figura 6- Oxidação dos calos obtidos em explantes de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus urophylla* em meio com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de dicamba expostos aos pré-tratamentos com ácido salicílico AS (T1=  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ; T2=  $3 \text{ mg L}^{-1}$ ; T3=  $6 \text{ mg L}^{-1}$ ) e ácido acetil salicílico AAS (T4=  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ; T5=  $3 \text{ mg L}^{-1}$ ; T6=  $6 \text{ mg L}^{-1}$ ). As barras indicam o desvio das médias.

#### 4. CONCLUSÕES

As concentrações de  $0,75$  e  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de TIBA proporcionaram um aumento na intensidade de calejamento com mais intensidade em calos friáveis e semifriáveis.

Especialmente na concentração de  $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ , houve uma modificação na textura dos calos friáveis e semifriáveis.

Calos friáveis e semifriáveis que apresentaram um crescimento mais intenso também apresentaram menores níveis de oxidação.

A utilização dos ácidos salicílico e acetil salicílico não proporcionou nenhuma mudança significativa em calos obtidos de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de dicamba.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAJAJ, Y. P. S. **Somatic embryogenesis and synthetic seed**. Biotechnology in agriculture and forestry. New York, Springer-Verlag, 1995. 472p. (v.30).

BHAU, B. S.; WAKHLU, A. K. Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.66, p.25-29, 2001.

CHEN, J. T.; CHANG, W. C. TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.315-320, 2004.

CHOI, Y. E.; KATSUMI, M.; SANO, H. Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. **Plant Science**, v.160, p.1183-1190, 2001.

FIGUEROA, F. Q.; ZEEL, M. M.; SAAVEDRA, A. L.; VARGAS, V. M. L. Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. **Plant Cell Reports**, v.20, p.679-684, 2001.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture - The technology**. 2. ed. England: Exegetics, 1993. v. 1, 575 p.

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. v2, p-533-568.

HAO, L.; ZHOU, L.; XU, X.; CAO, J.; XI, T. The role of salicylic acid and carrot embryogenic callus extracts in somatic embryogenesis of naked oat (*Avena nuda*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Research note, 1996.

HUTCHINSON, M. J.; SAXENA, P. K. Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum Bailey*) tissue cultures. **Plant Cell Reports**, v.15, p.512-515, 1996.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v.47, p.91-110, 2005.

KULSHRESHTHA, S.; COUTTS, R. H. A. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from mature sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) zygotic cotyledons. **Plant Growth Regulation**, v.22, p.87-92, 1997.

LESLIE, C. A.; ROMANI, R. J. Salicylic acid: A new inhibitor of ethylene biosynthesis. **Plant Cell Reports**, v.5, p.144-146, 1986.

MOGHADDAM, B. E.; MESBAH, M.; YAVARI, N. The effect of *in planta* TIBA and proline treatment on somatic embryogenesis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **Euphytica**, v.112, p.151-156, 2000.

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

RAMAROSANDRATANA, A. V.; VAN STADEN, J. Effects of auxins and 2,3,5-triiodobenzoic acid on somatic embryo initiation from Norway spruce zygotic embryos (*Picea abies*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.105-107, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant physiology. Sunderland, Sinauer, 2002, 690p.

WHITE, P. R. Further evidence on the significance of glycine, pyridoxine and nicotinic acid in the nutrition of excised tomato roots. **American Journal of Botany**, v.30, p.33-36, 1943.



#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

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

- As substâncias L-cisteína, sulfato de adenina, ácido cítrico, ácido ascórbico e PVP, nas concentrações testadas, não foram eficientes para conter a oxidação fenólica em calos formados a partir de cotilédones e hipocótilos de *Eucalyptus spp.* A adição de 10% de água de coco (v/v) não influenciou de forma significativa a oxidação fenólica, porém, afetou a textura e a intensidade de calejamento em cotilédones e hipocótilos de *E. urophylla*.
- Utilizando-se TDZ em combinações com ZEA, ANA, dicamba e picloram, os melhores resultados de calogênese foram observados nos tratamentos com TDZ + ZEA + ANA para um dos clones. A utilização de TDZ em combinação com dicamba e picloran proporcionou a formação de calos amarelados e em sua maioria semifriáveis. A maior parte dos calos foliares obtidos nos tratamentos com TDZ + ZEA e ANA e TDZ + ZEA apresentou coloração esbranquiçada. Não foi observada presença de raízes em nenhum experimento, assim como também não foi observada presença de estruturas embriogênicas.
- Em relação ao efeito do estresse proporcionado às plantas doadoras de explante com o armazenamento das mesmas por diferentes períodos em temperatura de 4 °C, este efeito não apresentou resultado satisfatório na

indução da embriogênese somática em explantes foliares e internodais nos dois clones de híbridos de *Eucalyptus urophylla*. Contudo, para um clone em meio contendo TDZ e sem pré-tratamento com frio, foi observada formação de regiões assemelhando-se a massas pró-embriogênicas em calos obtidos de entrenós.

- Quanto à utilização de TIBA, as concentrações de 0,75 e 1 mg L<sup>-1</sup> proporcionaram aumento na intensidade de calejamento com mais intensidade em calos friáveis e semifriáveis. A utilização dos ácidos salicílico e acetil salicílico não proporcionou nenhuma mudança significativa em calos obtidos de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de dicamba. Em nenhum dos tratamentos e explantes utilizados foram obtidas estruturas embriogênicas.
- Considerando os resultados obtidos no presente trabalho e em conformidade com a literatura existente sobre o tema, nota-se que para espécies de *Eucalyptus* existem dificuldades na propagação vegetativa pela técnica de embriogênese somática. Contudo, as informações geradas neste trabalho mostraram ser muito úteis para que se somem conhecimentos a respeito da embriogênese somática em *Eucalyptus*, tendo em vista a importância da técnica e o potencial de sua aplicação na silvicultura clonal, a fim de que possam ser obtidos protocolos eficientes e reproduzíveis de embriogênese somática para esta espécie.